

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

(21) PI0707848-0 A2



* B R P I 0 7 0 7 8 4 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 16/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) Int.CI.:

C07K 16/18
A61K 39/395
C07K 1/22
G01N 33/68
A61P 25/28

(54) Título: MÉTODOS PARA SELECCIONAR PELO MENOS UMA MOLÉCULA, PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO, PARA INCREMENTAR DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E / OU ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM INDIVÍDUO, PARA INIBIR, PELO MENOS EM PARTE, EFEITOS MEDIADOS POR PROTEÍNA MAL-DOBRADA E / OU ESTRUTURA B CRUZADA, PARA PREVENÇÃO PELO MENOS PARCIAL E / OU TRATAMENTO DE UMA DOENÇA, DE UM DISTURBIO E / OU DE UMA INFECÇÃO, PARA REMOVER, PELO PARCIALMENTE, PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS, ESTRUTURAS B CRUZADAS E / OU PROTEÍNAS, PARA DETERMINAR SE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, E / OU UMA PROTEÍNA E / OU PEPTÍDEO COMPREENDENDO UMA ESTRUTURA B CRUZADA ESTÁ PRESENTE EM UMA SOLUÇÃO AQUOSA, PARA REDUZIR E / OU PREVENIR EFEITOS SECUNDÁRIOS INDESEJADOS DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E / OU INCREMENTAR A ATIVIDADE ESPECÍFICA POR GRAMA DE PROTEÍNA, PARA INTERFERIR NA COAGULAÇÃO DO SANGUE, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS E / OU ESTRUTURAS B CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO, PARA DETERMINAR UMA DIFERENÇA NO TEOR DE ESTRUTURA B CRUZADA, PARA DETERMINAR A IDENTIDADE DE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, DE UMA ESTRUTURA B CRUZADA OU DE UMA PROTEÍNA, E PARA TRATAR UM SUJEITO QUE SOFRE DE, OU EM RISCO DE SOFRER DE, UMA DOENÇA, UM DISTURBIO E / OU UMA INFECÇÃO, COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IgIV, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COLEÇÃO DE MOLÉCULAS IgIV E / OU DE UMA COMPOSIÇÃO, KIT DIAGNÓSTICO, DISPOSITIVO DE SEPARAÇÃO, COMPOSTO, E, USO DE UM COMPOSTO

(30) Prioridade Unionista: 16/02/2002 EP 06075355.5

(73) Titular(es): Crossebeta Biosciences B.V.

(72) Inventor(es): BAREND BOUMA, MARTIJN FRANS BEN GERARD GERBINK

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007050063 de 16/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007094668de 23/08/2007

(57) Resumo: METODOS PARA SELECCIONAR PELO MENOS UMA MOLÉCULA, PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO, PARA INCREMENTAR DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E / OU ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM INDIVÍDUO, PARA INIBIR, PELO MENOS EM PARTE, EFEITOS MEDIADOS POR PROTEÍNA MAL-DOBRADA E / OU ESTRUTURA B CRUZADA, PARA PREVENÇÃO PELO MENOS PARCIAL E / OU TRATAMENTO DE UMA DOENÇA, DE UM DISTURBIO E / OU DE UMA INFECÇÃO, PARA REMOVER, PELO MENOS PARCIALMENTE, PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS, ESTRUTURAS B CRUZADAS E / OU PROTEÍNAS, PARA DETERMINAR SE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, E / OU UMA PROTEÍNA E / OU PEPTÍDEO COMPREENDENDO UMA ESTRUTURA B CRUZADA ESTÁ PRESENTE EM UMA SOLUÇÃO AQUOSA, PARA REDUZIR E / OU PREVENIR EFEITOS SECUNDÁRIOS INDESEJADOS DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E / OU INCREMENTAR A ATIVIDADE ESPECÍFICA POR GRAMA DE PROTEÍNA, PARA INTERFERIR NA COAGULAÇÃO DO SANGUE, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS E / OU ESTRUTURAS B CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO, PARA DETERMINAR UMA DIFERENÇA NO TEOR DE ESTRUTURA B CRUZADA, PARA DETERMINAR A IDENTIDADE DE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, DE UMA ESTRUTURA B CRUZADA OU DE UMA PROTEÍNA, E PARA TRATAR UM SUJEITO QUE SOFRE DE, OU EM RISCO DE SOFRER DE, UMA DOENÇA, UM DISTURBIO E / OU UMA INFECÇÃO, COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IgIV, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IgIV E / OU DE UMA COMPOSIÇÃO, KIT DIAGNÓSTICO, DISPOSITIVO DE SEPARAÇÃO, COMPOSTO, E, USO DE UM COMPOSTO A presente invenção proporciona um Método para selecionar pelo menos uma molécula de IgIV, de uma coleção de moléculas de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e / ou com um epítopo de uma estrutura 13 cruzada e / ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura 13 cruzada, em que referido método compreende contactar uma coleção de moléculas de IgIV com uma proteína dobrada incorretamente e / ou com uma estrutura 13 cruzada e / ou com uma proteína compreendendo uma estrutura 13 cruzada, e coletar pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade interagindo com referido epítopo e / ou proteína dobrada incorretamente.

“MÉTODOS PARA SELECIONAR PELO MENOS UMA MOLÉCULA, PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO, PARA INCREMENTAR DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E/OU ELIMINAÇÃO DE PROTEÍNA EM UM INDIVÍDUO, PARA INIBIR, PELO MENOS EM 5 PARTE, EFEITOS MEDIADOS POR PROTEÍNA MAL-DOBRADA E/OU ESTRUTURA B CRUZADA, PARA PREVENÇÃO PELO MENOS PARCIAL E/OU TRATAMENTO DE UMA DOENÇA, DE UM DISTÚRBIO E/OU DE UMA INFECÇÃO, PARA REMOVER, PELO MENOS PARCIALMENTE, PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS, 10 ESTRUTURAS B CRUZADAS E/OU PROTEÍNAS, PARA DETERMINAR SE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, E/OU UMA PROTEÍNA E/OU PEPTÍDEO COMPREENDENDO UMA ESTRUTURA B CRUZADA ESTÁ PRESENTE EM UMA SOLUÇÃO AQUOSA, PARA REDUZIR E/OU PREVENIR EFEITOS SECUNDÁRIOS INDESEJADOS DE UMA 15 COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E/OU INCREMENTAR A ATIVIDADE ESPECÍFICA POR GRAMA DE PROTEÍNA, PARA INTERFERIR NA COAGULAÇÃO DO SANGUE, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS E/OU ESTRUTURAS B CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO, PARA 20 DETERMINAR UMA DIFERENÇA NO TEOR DE ESTRUTURA B CRUZADA, PARA DETERMINAR A IDENTIDADE DE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, DE UMA ESTRUTURA B CRUZADA OU DE UMA PROTEÍNA, E PARA TRATAR UM SUJEITO QUE SOFRE DE, OU EM RISCO DE SOFRER DE, UMA DOENÇA, UM DISTÚRBIO E/OU 25 UMA INFECÇÃO, COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IGIV, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IGIV E/OU DE UMA COMPOSIÇÃO, KIT DIAGNÓSTICO, DISPOSITIVO DE SEPARAÇÃO, COMPOSTO, E, USO DE UM COMPOSTO”

A invenção refere-se aos campos da bioquímica, biologia

molecular, biologia estrutural e medicina.

Imunoglobulina intravenosa (IgIV) consiste de imunoglobulinas de animais ou de humanos aparentemente saudáveis cujas imunoglobulinas são coletadas do soro ou do sangue. IgIV são prescritas a animais e humanos que apresentam uma falta de anticorpos. A causa de falta de anticorpos pode ser uma doença que afeta o sistema imunológico, como por exemplo AIDS, ou um erro inato que causa hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia completa ou parcial, como, por exemplo, uma síndrome de imunodeficiência primária ou síndrome de imunodeficiência combinada grave (SCIDS, *severe combined immunodeficiency syndrome*). Imunoglobulinas coletadas de soro ou de sangue humano são comercialmente obteníveis sob muitos nomes diferentes, como por exemplo, "imunoglobulinas humanas intravenosas" (IgIV [*intravenous human immunoglobulines*], ou IVIg). Como IgIV foram introduzidas primeiramente em 1981 para a terapia de substituição de imunoglobulina de humanos imunodeficientes como descrito acima, eles também foram aplicados off label/em forma ainda não aprovada pelo FDA* a pacientes que sofrem de uma ampla variedade de doenças e em um grande número de casos, tratamento experimental com IgIV mostrou ser bem sucedido.

Como o mecanismo de ação ainda não foi elucidado até aqui, muitos dos tratamentos realizados ainda sem aprovação do FDA com IgIV foram experimentos de tentativa e erro, e o resultado foi um tanto impredizível.

O tratamento com IgIV não é isento de riscos. Desde 1981, a Administração Federal de Drogas e Alimentos, FDA, *Food and Drug Administration*) recebeu mais de 114 relatos de eventos adversos vindos do mundo todo (aproximadamente 83 dos E.U.A.) de disfunção renal e/ou falha renal aguda associada com a administração destes produtos. Embora a falha renal aguda tenha sido controlada de maneira bem sucedida na maior parte

dos casos, reportou-se mortes em 17 pacientes por todo o mundo. Muitos dos pacientes que morreram apresentavam graves condições subjacentes, com referência a efeitos colaterais reportados adicionais relacionados com a administração de IgIV em pacientes, ver Tabela 1.

5 Em conclusão, o tratamento de humanos com IgIV não é claramente limitado a uma condição de doença específica, falta ainda um claro entendimento do modo de ação, e o resultado de um tratamento com IgIV para uma nova entidade de doença é impredizível. A administração de grandes quantidades de IgIV envolve o risco de efeitos colaterais adversos.
10 Assim, há uma necessidade de melhoramento do tratamento com IgIV corrente.

Constitui um objeto da presente invenção proporcionar meios e métodos para melhorar terapia com IgIV. Constitui um objeto adicional proporcionar uma seleção e/ou purificação de um grupo de imunoglobulinas 15 de um combinado de IgIV, e um modo alternativo de preparação de imunoglobulinas ou um equivalente funcional das mesmas para se obter uma imunoglobulina ou equivalente da mesma, vantajosa para tratamento de uma doença ou um grupo de doenças, com pelo menos uma propriedade melhorada em comparação com IgIV, como por exemplo, um risco reduzido de efeitos 20 colaterais adversos e/ou uma ação terapêutica melhorada. Até aqui, uma pessoa versada na arte não teria condições de saber como iniciar e que seleção realizar.

A presente invenção proporciona a compreensão de que uma seleção de IgIV que é enriquecida com moléculas de IgIV capazes de interagir 25 com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente, um epítopo de uma estrutura beta cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada apresenta propriedades melhoradas em comparação com IgIV correntemente usada. Referida seleção é preferida relativamente à IgIV correntemente usada, entre outras coisas, porque efeitos colaterais

adversos são prevenidos, ao menos em parte, e/ou a ação terapêutica é melhorada.

Uma proteína dobrada incorretamente é definida aqui como uma proteína com uma estrutura diferente de uma estrutura não β cruzada, 5 nativa, não-amilóide. Assim, uma proteína dobrada incorretamente é uma proteína apresentando uma estrutura tridimensional não-nativa, e/ou uma estrutura β cruzada, e/ou uma estrutura amilóide. O mal dobramento da proteína tem importância etiológica em um grande número de doenças, freqüentemente relacionadas com o envelhecimento (como doenças 10 amilóides). Doenças de mal dobramento também são referidas como doenças conformacionais. Presentemente, descreveu-se como tais mais de 30 doenças de mal dobramento, incluindo, embora sem limitação, amiloidoses localizadas e sistêmicas, como doença de Alzheimer e amiloidose relacionada com diálise, mal de Parkinson, e doença de Huntington. Nós descrevemos 15 previamente que, adicionalmente a estas conhecidas doenças de mal dobramento, muitas outras, dentre as quais uma variedade com etiologia ainda parcialmente ou grandemente desconhecida, incluindo doenças (auto-)imunes e aterosclerose, estão associadas com mal dobramento de proteína (patente WO 2004 004698 (EP1536778) e patentes relacionadas). Para muitas destas 20 doenças nenhum tratamento de cura encontra-se disponível. Nós também revelamos que outros processos, dos quais vários podem ser relacionados com doença, como a eliminação-do-corpo de proteínas obsoletas ao término de sua meia-vida, coagulação do sangue, agregação de plaquetas e fibrinólise, estão associados com mal dobramento de proteínas.

25 Além do papel de proteínas dobradas incorretamente no início da doença e/ou progressão da doença, o mal dobramento de proteínas também é subjacente a complicações, como geração adversa de auto-anticorpos, respostas anafiláticas e outras reações inflamatórias de alérgicas, associadas com o uso de farmacêuticos de proteínas. Por esta razão, a mal dobramento de

proteína suscita grande preocupação durante a produção, armazenamento e uso de drogas à base de proteínas.

Finalmente, proteínas dobradas incorretamente contribuem para a indução de imunidade, e proteínas dobradas incorretamente podem ser usadas para disparar e/ou potencializar uma resposta imune, por exemplo, para o uso em vacinas.

Proteínas dobradas incorretamente tendem a multimerizar e podem iniciar fibrilização. Isto pode resultar na formação de agregados amorfos que podem variar muito de tamanho. Em determinados casos, proteínas dobradas incorretamente têm natureza mais regular e fibrilar. O termo amilóide foi introduzido inicialmente para definir os fibrilos, que são formados de proteínas dobradas incorretamente, e que são encontrados em órgãos e tecidos de pacientes com as diversas doenças de mal dobramento conhecidas, denominadas coletivamente amiloidoses. Comumente, amilóide ocorre como fibrilos de comprimento indefinido e com um diâmetro médio de 10 nm, é depositado extracelularmente, mancha-se com corantes vermelho Congo e Tioflavina T (ThT), apresenta bi-refringência verde característica sob luz polarizada quando vermelho Congo é ligado, compreende estrutura secundária β -sheet/*, e contém a conformação crossbeta/* característica (ver abaixo) como determinado por meio de análise de difração de raios-X por fibras. No entanto, como se determinou que o mal dobramento de proteína é um fenômeno mais geral e, porque muitas características de proteínas dobradas incorretamente são compartilhadas com amilóide, o termo amilóide tem sido usado em um escopo mais amplo. Agora, o termo amilóide também é usado para definir fibrilos intracelulares e fibrilos formados *in vitro*. Os termos *similar a amilóide* e *amilog* são usados para indicar proteínas dobradas incorretamente com propriedades compartilhadas com amilóides, mas que não preenchem todos os critérios para amilóide, como listado acima.

Em conclusão, proteínas dobradas incorretamente têm natureza

altamente heterogênea, compreendendo desde proteínas dobradas incorretamente monoméricas, até espécies oligoméricas pequenas, referidas algumas vezes como protofibrilos, agregados maiores com aspecto amorfó, até fibrilos grandes altamente ordenados, em que todos os seus aspectos 5 podem compartilhar características estruturais reminiscentes de amilóide. Como usado aqui, o termo "*misfoldome*" compreende qualquer coleção de proteínas dobrada incorretamente s.

Proteínas dobradas incorretamente e amilóides que não preenchem todos os critérios para identificação como amilóides podem 10 compartilhar características estruturais e funcionais com amilóide e/ou com outras proteínas dobrada incorretamente s. Estas características comuns são compartilhadas com várias proteínas dobrada incorretamente s, independentemente de suas seqüências variáveis de aminoácidos. Características estruturais compartilhadas incluem, por exemplo, a ligação 15 com determinados corantes, como vermelho Congo, ThT, Tioflavina S, acompanhadas de fluorescência incrementadas dos corantes, multimerização, e a ligação a determinadas proteínas, como ativador de plasminogênio de tipo tissular (tPA [*Tissue-type Plasminogen Activator*], o receptor para produtos finais de glicosamento avançado (RAGE, *receptor for advanced glycation 20 end-products*) e guias, como proteína de choque de calor, como BiP (grp78 ou proteína de ligação de cadeia longa de imunoglobulina). Atividades funcionais compartilhadas incluem a ativação de tPA e a indução de respostas celulares, como respostas inflamatórias, e indução de toxicidade celular.

Uma característica única de um subconjunto de proteínas 25 dobrada incorretamente s, como por exemplo, amilóide é a presença da conformação β cruzada ou uma forma precursora da conformação β cruzada.

Uma estrutura β cruzada é um elemento estrutural secundário em peptídeos e proteínas. Uma estrutura β cruzada (também referida como uma estrutura "*cross- β* ", uma " β cruzada" ou uma "estrutura β cruzada") é

definida como uma parte de uma proteína ou peptídeo, ou uma particularmente de um conjunto de peptídeos e/ou proteínas, que compreende filamentos β simples (estágio 1) e/ou um grupo (ordemadp) de filamentos β (estágio 2), e/ou, tipicamente, um grupo de filamentos β dispostos em uma 5 lâmina- β (estágio 3), e/ou, em particular, um grupo de lâminas- β empilhadas (estágio 4), também referida como um "amilóide". Uma estrutura β cruzada forma-se após a formação de uma forma de precursor de estrutura β cruzada quando do dobramento incorreto de proteína, como por exemplo, 10 desnaturação, proteólise ou desdobramento de proteínas. Um precursor de estrutura β cruzada é definido como qualquer conformação de proteína que precede a formação de qualquer um dos estágios estruturais previamente indicados de uma estrutura β cruzada. Estes elementos estruturais presentes na estrutura β cruzada (precursor) estão tipicamente ausentes em regiões 15 globulares de (partes nativas de) proteínas. A presença de estrutura β cruzada é demonstrada, por exemplo, com difração de raios-X por fibras ou ligação de Tioflavina T ou ligação de vermelho Congo, acompanhada de fluorescência incrementada dos corantes.

Uma forma típica de um precursor de estrutura β cruzada é uma proteína parcialmente ou completamente dobrada incorretamente. Uma 20 forma típica de uma proteína dobrada incorretamente é uma proteína parcialmente ou completamente não-dobrada, uma proteína parcialmente redobrada, uma proteína parcialmente ou completamente agregada, uma proteína oligomerizada ou multimerizada, ou uma proteína parcialmente ou completamente desnaturada. Uma estrutura β cruzada ou um precursor de 25 estrutura β cruzada pode ocorrer como moléculas monoméricas, conjuntos diméricos, triméricos até oligoméricos de moléculas, e pode ocorrer como estruturas multiméricas e/ou conjuntos de moléculas.

(Precursor de) estrutura β cruzada em qualquer um dos estados previamente indicados em forma solúvel em soluções aquosas e/ou solventes

orgânicos e/ou quaisquer outras soluções. (Precursors de) estrutura β cruzada também podem estar presentes como material em esatdo sólido em soluções, como por exemplo, agregados insolúveis, fibrilos, partículas, como por exemplo, uma suspensão, ou separados em uma fase sólida de estrutura β cruzada e uma fase de solvente.

Mal dobramento de proteína, formação de precursor de estrutura β cruzada, formação de agregados ou multímeros e/ou estrutura β cruzada pode ocorrer em qualquer composição compreendendo peptídeos, com pelo menos 2 aminoácidos, e/ou proteína(s). O termo "peptídeo" destina-se a incluir oligopeptídeos e também polipeptídeos, e o termo "proteína" inclui moléculas proteináceas incluindo peptídeos, com e sem modificações pós-tradução, como glicosilação e glicação. Ele também inclui lipoproteínas e complexos compreendendo uma parte proteinácea, como complexos de proteína-ácido nucleico (RNA e/ou DNA), complexos membrana-proteína, etc. Como usado aqui, o termo "proteína" também compreende moléculas proteináceas, peptídeos, oligopeptídeos e polipeptídeos. Conseqüentemente, o uso de "proteína" ou "proteína e/ou peptídeo" neste pedido têm o mesmo significado.

Uma forma típica de lâminas- β empilhadas é uma estrutura similar a fibrilos em que as lâminas- β são empilhadas no sentido do eixo da fibrila ou perpendicular ao sentido do eixo do fibrila. O sentido do empilhamento das lâminas- β em estruturas β cruzadas é perpendicular ao sentido da fibra longa. Uma conformação de estrutura β cruzada é um sinal que dispara uma cascata de eventos que induz eliminação e degradação do peptídeo ou proteína obsoleta. Quando a eliminação é inadequada, proteínas e/ou peptídeos indesejados agregam-se e formam estruturas tóxicas compreendendo desde oligomeros solúveis até fibrilos precipitantes e placas amorfas. Referida conformação de estrutura β cruzada compreendendo agregados é subjacente a várias doenças, como para exemplo, doença de

Huntington's, doença de tipo amiloidose, atherosclerose, diabetes, sangramento, trombose, câncer, sépsis e outras doenças inflamatórias, artrite reumatóide, encefalopatias espongiformes transmissíveis, como doença de Creutzfeldt-Jakob, esclerose múltipla, doenças auto-imunes, doenças associadas com perda de memória, como doença de Alzheimer, mal de Parkinson e outras doenças neuronais (epilepsia), encefalopatia e amiloidoses sistêmicas.

Uma estrutura β cruzada é formada, por exemplo, durante o desdobramento e redobramento de proteínas e peptídeos. O desdobramento de peptídeos e proteínas ocorre regularmente em um organismo. Por exemplo, peptídeos e proteínas freqüentemente desdobram-se e redobram-se espontaneamente ao final de seu ciclo de vida. Além disso, o desdobramento e/ou redobramento é induzido por fatores ambientais, como por exemplo, pH, glicação, estresse oxidativo, calor, irradiação, esforço mecânico, proteólise etc. Como usado aqui, o termo "estrutura β cruzada" também compreende qualquer precursor de estrutura β cruzada e qualquer proteína dobrada incorretamente, muito embora uma proteína dobrada incorretamente não compreenda necessariamente uma estrutura β cruzada. O termo "molécula de ligação β cruzada" ou "molécula capaz de ligar-se especificamente uma estrutura β cruzada" também compreende uma molécula capaz de ligar-se especificamente a qualquer proteína dobrada incorretamente.

Os termos desdobramento, redobramento e dobramento incorreto referem-se à estrutura tridimensional de uma proteína ou peptídeo. Desdobramento significa que uma proteína ou peptídeo perde pelo menos parte de sua estrutura tridimensional. O termo redobramento refere-se ao reembolinamento no mesmo tipo de estrutura tridimensional. Por meio de redobramento, uma proteína ou peptídeo pode recuperar sua configuração nativa, ou pode ocorrer um redobramento incorreto. O termo "redobramento incorreto" refere-se a uma situação quando se forma uma estrutura

tridimensional diferente de uma configuração nativa. Redobramento incorreto também é denominado dobramento incorreto. Desdobramento e redobramento de proteínas e peptídeos envolve o risco de formação de estrutura β cruzada. A formação de estruturas β cruzadas ocorre algumas vezes diretamente após a 5 síntese de proteína, sem um intermediário de proteína dobrado de forma incorreta.

Via β cruzada: resposta a proteínas dobrada incorretamente s

Nós revelamos previamente um mecanismo biológico que percebe a ocorrência de proteínas dobrada incorretamente s, resultando em degradação e eliminação das proteínas dobrada incorretamente s, denominado a 10 Via β cruzada (patente WO 2004 004698). Nós identificamos experimentalmente uma quantidade de proteínas, incluindo tPA e o fator XII de proteínas estreitamente relacionado, ativador de fator de crescimento de hepatócitos (HGFA, *hepatocyte growth factor activator*) e fibronectina, que 15 reconhecem proteínas dobrada incorretamente s, com características estruturais comuns a proteínas compreendendo estrutura β cruzada ou forma de um precursor de estrutura β cruzada. Nós também revelamos que, com base na análise da literatura, diversas proteínas adicionais, incluindo receptores de superfície celular, estão implicados na resposta do corpo a 20 proteínas dobrada incorretamente s, incluindo eliminação de proteínas dobrada incorretamente s, e, portanto, são parte da via β cruzada. Nós revelamos que várias destas proteínas, como tPA e seus elementos relacionados, são capazes de reconhecer diretamente proteínas dobrada incorretamente s. Referidas proteínas são conhecidas por ligarem-se a uma 25 grande quantidade de ligantes que pareciam não-relacionados com respeito à estrutura 3D e/ou seqüência de aminoácidos. Estes ligantes de proteína estão freqüentemente implicados em doenças, porém a presença de um modo estrutural comum ou seqüencial de reconhecimento não foi identificado previamente. Coletivamente, tPA, seus elementos relacionados e outras

proteínas que reconhecem proteínas dobradas incorretamente são, portanto, parte de mecanismos que facilitam a eliminação de proteínas dobrada incorretamente s, i.e. a Via β cruzada. Exemplos de processos fisiológicos em que a Via β cruzada está envolvida são potencialização de longo prazo, 5 imunidade inata, imunidade adaptativa, angiogênese, coagulação do sangue, formação de trombos e fibrinólise. O mal funcionamento da Via β cruzada resultará em proteínas que formam perigosas proteínas dobrada incorretamente s, acompanhadas ou não por características estruturais comumente observadas no amilóide, como por exemplo, agregados ou fibrilos de conformação β cruzada. Como indicado acima e previamente no pedido de 10 patente WO 2004 004698, proteínas dobradas incorretamente subjazem a vários problemas de saúde e doenças, alguns dos quais estão previamente associados com mal dobramento de proteína e outros que ainda não foram associados como tais. Estes problemas de saúde incluem doença de 15 Huntington, amiloideoses localizadas, aterosclerose, diabetes, sangramento, trombose, câncer, sépsis, doenças inflamatórias, artrite reumatóide (RA), esclerose múltipla (MS), outras doenças auto-imunes, doenças associadas com perda de memória, como doença de Alzheimer (AD), mal de Parkinson e outras doenças neuronais, como por exemplo, epilepsia, encefalopatia, 20 encefalite, catarata, amiloideoses sistêmicas, encefalopatias espongiformes transmissíveis, como doença de Creutzfeldt-Jakob, e amiloidose relacionada com diálise com pacientes que sofrem de insuficiência renal. Em conclusão, a Via β cruzada compreende moléculas, algumas das quais se ligam diretamente a proteínas dobrada incorretamente s, denominados de compostos 25 de estrutura β cruzada ou compostos de ligação de β cruzada ou compostos de ligação de proteína dobrada incorretamente , que contribuem para a percepção, a degradação e/ou a eliminação de proteínas dobrada incorretamente s. A Via β cruzada percebe qualquer dobragem em 3D não-nativa de uma proteína e responde de diversas maneiras. A Via β cruzada

também comprehende moléculas, como guias, que são capazes de interagir com proteínas dobradas incorretamente para auxiliar no dobramento e/ou redobramento, para prevenir o acúmulo de agregados, fibrilos, e/ou precipitados de proteínas dobrada incorretamente s.

5 Por exemplo, tPA é uma serina protease que é ativada em resposta à ligação direta com proteínas dobrada incorretamente s. Uma proteína dobrada incorretamente do tipo referido é fibrina, presente em um coágulo de sangue. Quando da ativação, tPA gera plasmina do plasminogênio de zimogênio. A plasmina protease plasmina, por sua vez, cliva muitos substratos, como proenzimas, como procolagenases, e também proteínas de matriz extracelular, como fibrina. Como referida tPA inicia uma cascata de eventos para degradar agregados de proteínas dobrada incorretamente s, como coágulos sanguíneos.

10 Outro exemplo é RAGE. Este receptor está envolvido na ligação de proteínas glicadas, amilóide e outros ligantes, que comprehendem propriedades amilóides, e está implicado na patologia de muitas doenças, como amiloidose, diabetes e doenças auto-imunes. A administração de uma forma solúvel deste receptor possui efeitos benéficos em modelos animais de várias das doenças de mal dobramento de proteínas previamente indicadas.

15 Outro exemplo adicional de moléculas de ligação de proteína dobrada incorretamente que estão envolvidas na Via β cruzada são as guias, ou proteínas de choque de calor (HSPs), ou proteínas de estresse. O fato de que guias como, por exemplo, haptoglobina e clusterina, contribuem para a prevenção da formação de agregados de proteínas dobradas incorretamente de uma maneira independente de ATP tornam-nas candidatas a desempenharem um papel importante na Via β cruzada. É provável que uma série de proteínas que apresentam conformação de proteína atue em concerto. Entre estas proteínas que atuam em concerto na Via β cruzada encontram-se guias, como por exemplo, HSP60, HSP90, DNAK, clusterina, haptoglobina, gp96, BiP,

outras HSPs (localizadas extracelularmente), proteases, como por exemplo, HGFA, tPA, plasminogênio, fator XII, IVIg, e receptores de superfície celular. Receptores de superfície celular implicados na Via β cruzada incluem proteína relacionada com receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP, 5 CD91) e elementos relacionados, CD36, receptor de aglutinador A, receptor de aglutinador B-I, RAGE, também referidos coletivamente na literatura como receptores de multi-ligantes.

Em resumo, a Via β cruzada é capaz de impedir que proteínas dobradas incorretamente formem estrutura tóxicas, como por exemplo, fibrilos e oligomeros de estrutura β cruzada amilóide, e é capaz de degradar e eliminar (agregados de) proteínas dobrada incorretamente s. Como parte da Via β cruzada, proteínas dobradas incorretamente ligam-se a receptores de ligação de proteínas dobradas incorretamente de multi-ligantes, resultando em endocitose e subsequente degradação proteolítica. Assim, a modulação da Via 10 β cruzada proporciona oportunidades de tratamento para doenças de mal dobramento de proteínas.

Doenças de mal dobramento

Como mencionado acima, doenças associadas com mal dobramento de proteínas, denominadas *doenças de dobramento incorreto de proteínas, doenças de proteína dobrada incorretamente, desordem de dobramento incorreto de proteína, doenças conformacionais, doenças associadas e/ou relacionadas com proteínas dobrada incorretamente s, ou desordens de dobramento de proteínas*, incluem amiloidoses, e dobramento incorreto de proteína também está associado com muitas outras doenças e 15 problemas de saúde e processos fisiológicos, não necessariamente definidos pelo termo amiloidose ou desordem de dobramento incorreto de proteína, dos quais vários são mencionados acima.

De acordo com a presente invenção, uma seleção de IgIV que é enriquecida com moléculas de IgIV capazes de interagir com uma proteína

dobrada incorretamente e/ou com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada apresenta pelo menos uma propriedades aperfeiçoada em comparação com IgIV correntemente usada. A invenção proporciona, portanto, um método para

5 selecionar de uma coleção de moléculas de IgIV pelo menos uma molécula de IgIV capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Isto é realizado, de preferência, contactando-se uma coleção de moléculas de IgIV com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada e coletando-se pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade que interage com referida proteína e/ou epítopo. Proporciona-se, portanto, um método para

10 selecionar de uma coleção de moléculas de IgIV, pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, em que referido método compreende contactar uma coleção de moléculas de IgIV com uma proteína dobrada incorretamente e/ou

15 com uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada e coletar pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade que interage com referido epítopo.

20

Uma região de afinidade influencia a afinidade com que uma proteína ou peptídeo se liga a um epitope e é definida aqui como pelo menos particularmente de um anticorpo que é capaz de ligar-se especificamente a um epítopo. Referida região de afinidade compreende, por exemplo, pelo menos parte de uma imunoglobulina (como em IgIV), pelo menos parte de um anticorpo monoclonal e/ou pelo menos parte de um anticorpo humanizado. Referida região de afinidade compreende, de preferência, pelo menos parte de

uma cadeia pesada e/ou pelo menos parte de uma cadeia leve de um anticorpo. Em uma concretização, referida região de afinidade compreende um fragmento Fab de forma dupla $F(ab')_2$ ou simples.

5 Geralmente, regiões de afinidade ocorrem sobre a superfície de células, como células T ou células B ou outras células imunes, em que neste caso eleas são freqüentemente parte de um receptor celular. Regiões de afinidade também ocorrem em forma sintética em bibliotecas de apresentação de fagos.

Uma concretização da invenção compreende contactar uma coleção de imunoglobulinas de uma solução de IgIV com uma coleção de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas, de preferência, com uma dada estrutura β cruzada selecionada, e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, de preferência, uma dada proteína selecionada compreendendo uma estrutura β cruzada. Um epítopo reconhecido por uma região de afinidade encontra-se localizado, em uma concretização, em uma estrutura β cruzada propriamente dita. Assim, uma concretização da invenção proporciona um método de acordo com a invenção para selecionar de uma coleção de moléculas de IgIV, pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, em que referido epítopo é pelo menos parte de uma estrutura β cruzada de uma proteína. Em outra concretização, referido epítopo é exposto em referida proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Em que referido não se encontra localizado necessariamente em referida estrutura β cruzada. De uma maneira geral, uma estrutura β cruzada induz um dobramento diferente de uma proteína, que freqüentemente resulta na indução e/ou revelação de epítopos até aqui desconhecidos, ou a alteração ou deleção de epítopos conhecidos de referida proteína. Assim, é possível que uma proteína em que uma estrutura β

cruzada é formada durante o dobramento incorreto, apresenta um epitopo que está relacionado com a presença de uma estrutura β cruzada. Em uma concretização, seleciona-se uma molécula de IgIV capaz de ligar-se especificamente com referido epítopo induzido e/ou revelado.

5 Como descrito acima, proteínas dobrada incorretamente s, proteínas com estruturas β cruzadas e/ou (dobrada incorretamente s) compreendendo uma estrutura β cruzada são uma causa subjacente de sintomas de muitas doenças. Referidos sintomas de doença, relacionados com a presença de estruturas β cruzadas, são diminuídos, pelo menos em parte, 10 pela administração de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a presente invenção. Uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a presente invenção é particularmente vantajosa para se remover proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas ou peptídeos compreendendo uma estrutura β cruzada, de preferência, relacionada com e/ou associada com uma 15 doença, de uma amostra, como por exemplo, um fluido corporal ou amostra de tecido, diminuindo com isso a quantidade de proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas ou peptídeos (circulantes) compreendendo uma estrutura β cruzada. Como usado aqui, o termo "remover uma proteína dobrada incorretamente e/ou proteína ou peptídeo compreendendo uma 20 estrutura β cruzada" compreende separar referida proteína e/ou peptídeo de uma amostra, e também ligar, cobrir, blindar e/ou neutralizar uma proteína dobrada incorretamente e/ou a estrutura β cruzada e/ou qualquer outra parte de uma proteína ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada, prevenindo com isso, pelo menos em parte, a interação de referida proteína 25 dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou proteína ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada com outras moléculas de ligação. Desta maneira, diminui-se, pelo menos em parte, efeitos adversos relacionados com a presença de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com a presença de uma proteína ou peptídeo

compreendendo uma estrutura β cruzada, como por exemplo, infecções e/ou inflamação na AIDS, e/ou sintomas de doenças de doenças dolorosas e devastadoras, como por exemplo, artrite reumatóide e esclerose múltipla. O mesmo princípio também é aplicável a condições inflamatórias em que 5 proteínas são alteradas pela presença de uma estrutura β cruzada (seja uma estrutura β cruzada gerada pelo corpo ou gerada e/ou induzida por um patógeno).

Em virtude da baixa concentração e da ampla variedade de anticorpos que reagem com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, seria necessário administrar quantidades relativamente grandes de IgIV para se obter um resultado positivo, o que aumenta o risco de efeitos colaterais adversos. Adicionalmente, em tratamentos correntes de IgIV, o corpo é desnecessariamente estressado pela administração de um lote de 10 proteínas que não tem função para a doença para a qual estão sendo administradas. Constitui, portanto, uma vantagem importante que uma seleção seja feita agora com um método de acordo com a invenção a partir do combinado de IgIV para moléculas de IgIV capazes de se ligarem especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. 15 Preparações de IgIV de acordo com a invenção compreendendo frações enriquecidas de imunoglobulinas capazes de se ligarem especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, são particularmente vantajosas para se administrar a um animal não-humano ou humano em risco 20 de sofrer ou já sofrendo de uma doença relacionada com estrutura β cruzada. Devido, agora, a uma seleção enriquecida de IgIV que é administrada, 25 compreendendo moléculas de IgIV capazes de reagir especificamente com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com

uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, tornou-se possível usar uma concentração total de moléculas de IgIV que é inferior do que em tratamentos de IgIV correntes e que ainda exercem os mesmos efeitos terapêuticos, ou mesmo efeitos terapêuticos melhores do que com IgIV 5 correntemente usada.

Uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é selecionado de uma coleção de moléculas de IgIV de diversas maneiras. Por exemplo, referida molécula de IgIV é selecionada contactando-se um combinado de moléculas de IgIV com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Subseqüentemente, coleta-se moléculas de IgIV ligadas. Em uma concretização referida estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é relacionada com uma doença. Por exemplo, mielina, 10 proteína básica de mielina e/ou glicoproteína de oligodendrócito de mielina é usada, de preferência, para selecionar moléculas de IgIV para o uso, pelo menos em parte, no tratamento e/ou prevenção de esclerose múltipla. Da 15 mesma forma, usa-se, de preferência, fator de colágeno e/ou reumatismo para selecionar moléculas de IgIV para o uso, pelo menos em parte, no tratamento e/ou prevenção da artrite reumatóide. Encontram-se disponíveis na arte vários 20 métodos alternativos para selecionar uma molécula de IgIV capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, e que são vantajosos para uso em um método de acordo 25 com a invenção.

Em uma concretização preferida da presente invenção, uma molécula de IgIV capaz de interagir com qualquer dada proteína dobrada

incorretamente de interesse e/ou com qualquer dado epítopo de estrutura β cruzada de interesse e/ou com qualquer dado epítopo de interesse de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, é selecionada usando-se qualquer tipo de proteína mal dobrada, epítopo de estrutura β cruzada e/ou epítopo de um proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. De acordo com a presente invenção, com o uso de uma ou várias matrizes de afinidade compreendendo proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo estrutura β cruzada ou amilóide, regiões de afinidade são selecionadas de qualquer composição de regiões de afinidade, que são capazes de ligar-se, preferivelmente, seletivamente e com maior afinidade, a proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada, que não foram incluídas necessariamente no conjunto de regiões de afinidade usadas para a seleção. Os Exemplos demonstram que, com o uso de um suporte sólido com proteínas dobradas incorretamente selecionadas imobilizadas, isola-se regiões de afinidade que apresentam afinidade por virtualmente qualquer proteína mal dobrada.

Adicionalmente, de acordo com a presente invenção, tanto com proteínas dobradas incorretamente com aspecto fibrilar, e também como agregados de proteínas dobradas incorretamente não apresentando características fibrilares, seleciona-se regiões de afinidade que apresentam especificidade de amplo espectro por proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo estrutura β cruzada. Por exemplo, com matriz de afinidade por fibrilos A β é possível selecionar regiões de afinidade que apresentam afinidade por multímeros não-fibrilares de, por exemplo, BSA-AGE dobrada incorretamente, agregados de A β e dOVA. Por outro lado, com o uso de matriz de HbAGE não-fibrilar ou com matriz de IgIV mal dobrada não-fibrilar, seleciona-se regiões de afinidade que se ligam eficientemente a fibrilos A β .

Nos Exemplos, com o uso de uma matriz de AGE-albumina de

soro bovino, foi possível selecionar regiões de afinidade com afinidade por AB humana, albumina humana e ovalbumina de frango. Com o uso de uma matriz A β humana, foi possível selecionar regiões de afinidade que são capazes de ligação com albumina de soro bovino glicado e ovalbumina de frango. Com uma matriz Hb humana glicada, foi possível selecionar regiões de afinidade capazes de ligação com IgG de mouse mal dobrada. Conseqüentemente, de acordo com a presente invenção, com proteínas dobradas incorretamente que se originam de uma espécie, é possível selecionar regiões de afinidade que têm afinidade por proteínas dobradas incorretamente que se originam de outras espécies.

Além disso, de acordo com a invenção, de uma coleção de regiões de afinidade de uma IgIV humana é possível selecionar uma seleção de regiões de afinidade que se originam de pelo menos quatro diferentes clones de células B produzindo isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que apresentam propriedades de ligação no sentido de uma ampla faixa de proteínas, em que referidas proteínas originam-se de várias espécies de não precisam apresentar homologia substancial de seqüências de aminoácidos, tampouco comprimento similar de seqüências de aminoácidos, nem estrutura 3D similar ou congruente em sua dobra nativa, embora elas compartilhem uma característica comum a proteínas dobrada incorretamente s. As regiões de afinidade selecionadas com especificidade para proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo estrutura β cruzada são úteis para uma variedade de aplicações. Abaixo, delineia-se com mais detalhe regiões de afinidade enriquecidas usadas para terapia contra doenças de dobramento incorreto de proteínas.

Os métodos de acordo com a invenção permitem a seleção, entre outras coisas, de regiões de afinidade que são aplicáveis na terapêutica e/ou diagnóstico de doenças associadas com mal dobramento de proteínas. Um sumário delineando concretizações preferidas de um método de acordo

com a invenção é descrito na Figura 26. Qualquer proteína dobrada incorretamente de escol (mistura X e Y na Figura 26, representando o *Misfoldome*) é vantajosa para uso na seleção de regiões de afinidade, porém, de preferência, usa-se proteínas dobradas incorretamente (mistura A na Figura 5 26) que estão associadas com doença. Como proteínas dobradas incorretamente compartilham características comuns, de uma forma geral, selecionar-se-á regiões de afinidade que se ligam a não mais que uma proteína mal dobrada particular. No entanto, como divulgado neste pedido, também é 10 possível selecionar regiões de afinidade que se ligam, de preferência, a um subconjunto ou mesmo a um tipo único de proteína mal dobrada. Combinando um conjunto de colunas, uma pessoa versada na arte é capaz de selecionar aquelas regiões de afinidade de interesse que são aplicáveis para terapêuticas e/ou diagnósticos de dobramento incorreto em geral, ou que são aplicáveis, de preferência, para uma doença particular ou para um conjunto de doenças em 15 que a doença em particular está implicada, ou o conjunto de doenças em que a proteína dobrada incorretamente de escol está implicada. Como descrito na Figura 26, a aplicação de coluna I (mistura de proteínas dobradas incorretamente não necessariamente relacionadas com uma doença) resultará 20 em regiões de afinidade (preparação 1) com afinidade por proteínas dobradas incorretamente em geral, i.e. o *Misfoldome*. Referidas regiões de afinidade são vantajosas para diagnósticos e também para terapia. No entanto, o uso de referidas regiões de afinidade para fins terapêuticos implica no risco potencial 25 de efeitos colaterais, devido ao fato de que se introduz no paciente regiões de afinidade que não só se ligam à proteína dobrada incorretamente relacionada com a doença (efeitos terapêuticos desejados), mas também a outras proteínas dobradas incorretamente presentes (efeitos colaterais impredizíveis da terapia). Combinando-se colunas I e III, e, mais preferivelmente, colunas II e IV, seleciona-se aquelas regiões de afinidade que interagem, de preferência, com proteínas dobradas incorretamente específicas para uma doença ou um

conjunto de doenças. A coluna IV é usada para remover aquelas regiões de afinidade que interagem com proteínas dobradas incorretamente que não são relacionadas com a doença-alvo de escol. Conseqüentemente, preparações 3 e 4 são selecionadas, de preferência, para fins terapêuticos específicos.

5 Conseqüentemente, para selecionar regiões de afinidade capazes de ligar-se especificamente a proteínas dobradas incorretamente associadas com uma doença de interesse, usa-se, de preferência, duas colunas. Uma coluna ("a coluna geral") comprehende proteínas dobradas incorretamente que não são associadas necessariamente com referida doença. A outra coluna 10 ("a coluna específica") comprehende mais proteínas dobradas incorretamente que são associadas com referida doença, em comparação com a coluna geral. De preferência, as proteínas dobradas incorretamente de referida coluna específica consistem substancialmente de proteínas dobradas incorretamente associadas com referida doença.

15 Em uma concretização, a coluna geral é usada primeiramente. Nesta etapa, isola-se regiões de afinidade capazes de se ligarem especificamente a qualquer proteína dobrada incorretamente. Subseqüentemente, de acordo com esta concretização, usa-se a coluna específica. Nesta etapa, a composição compreendendo as regiões de afinidade 20 é enriquecida em regiões de afinidade específicas para proteínas dobradas incorretamente associadas com uma doença de interesse.

Em outra concretização, as colunas indicadas acima são usadas na ordem invertida. Em primeiro lugar, a coluna específica é usada para isolar regiões de afinidade capazes de ligar-se especificamente a proteínas dobradas incorretamente associadas com uma doença de interesse. Na prática, a composição resultante também compreende regiões de afinidade capazes de se ligarem especificamente a proteínas dobradas incorretamente que não estão associadas com referida doença de interesse. Portanto, usa-se subseqüentemente uma coluna geral. Uma característica importante desta

segunda coluna é que ela não comprehende, ou só comprehende em menor grau, 5 proteínas dobradas incorretamente que estão associadas com referida doença de interesse. Referida segunda coluna ligará regiões de afinidade capazes de se ligar especificamente a proteínas dobradas incorretamente que não estão associadas com referida doença de interesse, porém não ligará, ou só ligará 10 em menor grau, regiões de afinidade que são específicas para proteínas dobradas incorretamente associadas com referida doença de interesse. Assim, o fluxo através da da fração é enriquecido em regiões de afinidade específicas para proteínas dobradas incorretamente associadas com referida doença de interesse.

Em uma concretização, moléculas de IgIV selecionadas são testadas quanto a sua reatividade com uma dada proteína e/ou peptídeo de interesse em uma amostra corporal de um humano ou animal que sofre de referida doença. A capacidade de uma coleção de IgIV selecionada de acordo 15 com a invenção ligar-se a uma proteína de interesse específica de uma amostra corporal é medida, por exemplo, com um teste de agregação de plaquetas sanguíneas, um teste de opsonofagocitose, e/ou um teste de inibição ou de ativação de complemento.

Uma concretização adicional proporciona um método de 20 seleção de acordo com a invenção em que uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo, em que uma estrutura β cruzada ou um epítopo de uma proteína comprehende uma estrutura β cruzada, é ligada a um suporte, como por exemplo, esferas ou partículas ou pérolas ou lâminas ou 25 filamentos de látex ou agarose ou Sefarose ou vidro ou plástico ou metal ou qualquer outra substância vantajosa ou composto ou material ou molécula vantajosa para acentuar a eficiência da seleção, como por exemplo pérolas magnéticas. Portanto, a invenção proporciona um método como descrito aqui, em que referida proteína dobrada incorretamente e/ou referido epítopo é ligado a um suporte sólido.

A invenção proporciona adicionalmente uma coleção de moléculas de IgIV, enriquecidas em moléculas de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir especificamente com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Como explicado acima, referida coleção de moléculas de IgIV apresenta pelo menos uma propriedade aperfeiçoada em comparação com IgIV correntemente usada. Uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção é selecionada, de preferência, de IgIV correntemente usada, com um método de seleção de acordo com a invenção. Com um método da invenção, uma pessoa versada na arte é capaz de selecionar de uma grande coleção de IgIV, uma seleção menor de moléculas de IgIV que é enriquecida com moléculas de IgIV compreendendo regiões de afinidade capazes de se ligarem especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo sobre uma estrutura β cruzada e/ou um epítopo sobre uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Portanto, uma concretização proporciona uma coleção de moléculas de IgIV, enriquecida com moléculas de IgIV compreendendo uma região de afinidade capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, selecionada por um método de acordo com a presente invenção. Uma coleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção é vantajosa para administrar a um paciente que necessita de referido medicamento em uma quantidade menor do que preparações de IgIV correntemente usadas, devido ao aumento relativo de regiões de afinidade em referida coleção enriquecida capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com um epítopo em uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo em uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

A invenção proporciona adicionalmente uma composição

compreendendo pelo menos 5 moléculas isoladas, sintéticas e/ou recombinantes compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo 5 uma estrutura β cruzada. De preferência, referida composição compreende pelo menos 8, mais preferivelmente pelo menos 10 das moléculas isoladas, sintéticas e/ou recombinantes indicadas acima. Em uma concretização preferida, usa-se moléculas sintéticas e/ou recombinantes. Uma vantagem de 10 uma composição de moléculas sintéticas e/ou recombinantes é o fato de que a necessidade de IgIV é eliminada. Isto é, entre outras coisas, vantajoso porque os suprimentos de a disponibilidade de IgIV não são suficientes, e porque há determinados riscos na administração de produtos biológicos derivados de sangue humano (como, por exemplo, o risco de infecção com doença de príons e com patógenos, como vírus da hepatite ou HIV). Agora que a 15 presente invenção proporcionou uma seleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, tornou-se possível gerar moléculas sintéticas e/ou recombinantes com pelo menos uma propriedade similar à referida seleção enriquecida de moléculas de IgIV, no que se refere ao tipo, não necessariamente à quantidade. Uma vez que se preparou uma seleção 20 enriquecida de determinadas imunoglobulinas de IgIV, uma pessoa versada na arte é capaz de determinar, por meio de métodos conhecidos na arte (como, por exemplo, embora sem limitação, o método de Maldi-Toff) a seqüência de aminoácidos de referidas imunoglobulinas, ou pelo menos de uma região de afinidade de referidas imunoglobulinas. Referida seqüência de aminoácidos é 25 então usada, de preferência, para selecionar ou produzir moléculas sintéticas ou parcialmente sintéticas que apresentam a mesma característica de ligação em termos de tipo, não necessariamente de quantidade, que pelo menos uma região de afinidade de uma molécula de IgIV selecionada de acordo com a invenção. Um exemplo não-limitante de uma molécula sintética ou

parcialmente sintética é um produto obtido por meio de síntese recombinante ou química de peptídeos, proteínas ou outras moléculas. É até mesmo possível selecionar uma biblioteca de apresentação de fago com proteínas dobradas incorretamente e/ou com estruturas β cruzadas e/ou com proteínas

5 compreendendo uma estrutura β cruzada, ou epítopos de referidas proteínas, para selecionar moléculas de ligação apresentando uma região de afinidade reagindo com referida proteína mal dobrada, estrutura β cruzada e/ou proteína

10 compreendendo uma estrutura β cruzada. Portanto, uma concretização proporciona um método para produzir uma composição de acordo com a invenção, compreendendo definir a seqüência de aminoácidos de uma região de afinidade de pelo menos uma molécula de IgIV capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente, um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, e produzir moléculas sintéticas ou recombinantes compreendendo

15 referida seqüência de aminoácidos. Em outra concretização, a invenção também proporciona uma molécula sintética ou recombinante compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente, um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, em que referida

20 molécula produzida de acordo com um método como descrito acima.

Conseqüentemente, regiões de afinidade análogas àquelas isoladas de IgIV são preparadas, por exemplo, recombinantemente ou sinteticamente, por meio de aplicação de técnicas sintéticas, conhecidas por uma pessoa versada na arte, incluindo análise de seqüência de proteínas,

25 clonagem de DNA e tecnologia de expressão. Uma concretização da invenção compreende as seguintes etapas: (1) a seqüência de aminoácidos, pelo menos das regiões variáveis das correntes pesada e leve, ou pelo menos das regiões determinadoras de complementaridade de 1 a 3 (CDRs), ou pelo menos de CDR3 da cadeia pesada (HC, *heavy chain*) de regiões de afinidade isoladas, é

obtida por meio de análise de seqüência de proteínas. (2) Uma seqüência de ácidos nucleicos, de preferência, uma seqüência de DNA, codificando a seqüência de aminoácidos identificada é preparada sinteticamente. Como uma alternativa para a seqüência exata determinada por meio de análise de 5 proteína, é possível produzir uma seqüência em que uma ou mais mutações são introduzidas, de preferência, na CDR3, e, ainda mais preferivelmente na CDR3 da cadeia pesada (HC), para produzir regiões de afinidade com especificidade alterada, de preferência, afinidade incrementada e/ou afinidade mais específica. (3) O ácido nucleico é clonado em um vetor de expressão 10 apropriado. Referido vetor já contém as seqüências que codificam as regiões constantes de imunoglobulinas do tipo desejado, como por exemplo, para se obter IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM, IgA, IgE etc. (4) Referido vetor é transduzido de qualquer maneira em um sistema de expressão de escol, de preferência, uma célula mamífera. (5) Seleciona-se células expressando a região de 15 afinidade. (6) Regiões de afinidade produzidas de forma recombinante são purificadas a partir de referidas células ou sobrenadante de cultura derivado de células. Caso se introduza mutações na seqüência original de região de afinidade para otimizar a afinidade, as regiões de afinidade recentemente preparadas são opcionalmente re-selecionadas, de preferência, usando-se um 20 método de acordo com a presente invenção. Referida geração de regiões de afinidade semissintéticas com um repertório ainda maior de regiões de afinidade, de preferência, nas regiões determinadoras de complementaridade, de preferência, na CDR3, ainda mais preferivelmente na CDR3 da HC, é realizada, de preferência, por meio de geração de uma biblioteca semi- 25 sintética, como uma biblioteca de apresentação de fago (ver abaixo).

Além de uma coleção de imunoglobulinas humanas, como IVIg obtida de sangue, também é possível obter uma biblioteca combinatorial de sangue, uma biblioteca combinatorial também pode ser obtida de qualquer outro conjunto de regiões de afinidade, de preferência, um conjunto de

regiões de afinidade recombinantes, como aquelas presentes em uma biblioteca de apresentação de fago (Winter *et al.* 1994; Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005). De preferência, uma biblioteca do tipo referido constitui-se de seqüências relacionadas com regiões de afinidade mamíferas,

5 de preferência, regiões de afinidade humanas, como imunoglobulinas. Em uma concretização preferida, uma biblioteca de apresentação de fago do tipo referido compreendendo uma coleção de regiões de afinidade é preparada como a seguir (Winter *et al.* 1994, de Kruif *et al.* 1995a, 1995b): primeiramente, RNA é extraído de células B ou de um tecido compreendendo

10 células B. Subseqüentemente, prepara-se cDNA. Em seguida, cDNA que codifica as regiões variáveis é amplificado, clonado em um vetor de fagomídeo apropriado e transformado em um hospedeiro apropriado, como por exemplo, uma cepa de *Escherichia coli*. Desta maneira expressa-se regiões de afinidade, i.e. apresentadas por fagos, como proteínas de fusão na

15 superfície de bacteriófagos filamentosos. Uma biblioteca de apresentação de fago é preparada, por exemplo, a partir de células B obtidas de um mamífero saudável, de preferência, um humano, camundongo, rato ou lhama, ou, alternativamente, de um mamífero imunizado com uma proteína dobrada incorretamente . Em uma concretização, prepara-se uma biblioteca de

20 apresentação de fago a partir de células B de um mamífero, de preferência, um humano, que sofre de uma doença particular, de preferência, uma doença de mal dobramento, como por exemplo, RA. Desta maneira, prepara-se uma coleção de regiões de afinidade com um objetivo específico de compreender aquelas regiões de afinidade específicas para proteínas dobrada

25 incorretamente s. Por exemplo, em uma concretização, um camundongo é imunizado uma vez ou várias vezes com uma ou uma seleção de proteínas dobradas incorretamente (como no Exemplo 20), células B são isoladas do baço e usadas para preparar uma biblioteca de apresentação de fago. Em outra concretização, células B são isoladas de um humano com uma doença

particular, por exemplo, artrite (reumatóide). cDNA preparado a partir destas células B é usado, então, de forma preferível para preparar uma biblioteca de apresentação de fago. Desta maneira, prepara-se uma biblioteca de apresentação de fago compreendendo regiões de afinidade com especificidade para proteínas dobradas incorretamente envolvidas na doença de mal dobramento selecionada. Por exemplo, prepara-se uma biblioteca com regiões de afinidade para o domínio Fc de Ig's, i.e. regiões de afinidade, como Fator Reumatóide (RF, *Rheumatoid Factor*) (van Esch *et al.* 2003, *Clin Exp Immunol.*). Da forma descrita acima uma pessoa versada na arte é capaz de projetar e preparar uma biblioteca de apresentação de fago com qualquer coleção de regiões de afinidade com ênfase numa aplicação ou doença particular.

Em uma concretização, prepara-se sinteticamente uma biblioteca de apresentação de fago com uma coleção de regiões de afinidade do tipo referido com um repertório incrementado (Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005; de Kruif *et al.* 1995a, 1995b). Desta maneira uma pessoa versada na arte é capaz de projetar uma biblioteca compreendendo regiões de afinidade de considerável diversidade adicional. De preferência, implementando-se seqüências adicionais nas regiões hipervariáveis, as CDRs que interagem com o antígeno, prepara-se regiões de afinidade adicionais, remodelando-se os domínios variáveis. Além das regiões de afinidade obtidas de seqüências humanas, uma coleção de regiões de afinidade é criada em uma concretização de qualquer outra espécie, como lhama, camelo, alpaca ou camelídeo, para se obter regiões de afinidade, como anticorpos de lhama, também referidos como nanocorpos, com propriedades relacionadas com estas espécies. Assim, uma biblioteca de apresentação de fago e/ou uma coleção de regiões de afinidade é preparada de muitas maneiras, por exemplo, de um mamífero imunizado com uma ou com um conjunto de proteínas dobrada incorretamente s. Em uma concretização particularmente preferida,

uma biblioteca de apresentação de fago e/ou uma coleção de regiões de afinidade é preparada de um mamífero com uma doença, de preferência, uma doença de mal dobramento. Regiões de afinidade específicas para proteínas dobradas incorretamente são selecionadas, de preferência, de uma biblioteca de apresentação de fago usando-se meios e métodos de acordo com a invenção, de preferência, combinados com procedimentos convencionais para isolar fagos. Da forma mais direta, em uma concretização preferida, proteínas dobradas incorretamente são preparadas e são imobilizadas, de preferência, de acordo com qualquer um dos procedimentos divulgados nesta aplicação, e, 5 subsequente, deixadas ligar-se a fagos. Após lavagem extensiva, fagos ligados são recuperados e amplificados por meio de reinfecção do hospedeiro. Para permitir a recuperação apenas de fagos específicos, o procedimento de 10 seleção é repetido, de preferência, por várias vezes. Finalmente, isola-se aqueles fagos que são capazes de ligar-se especificamente a alvos mal dobrados. Em uma concretização particularmente preferida, proteínas dobradas incorretamente são isoladas de uma amostra de tecido obtida de um 15 indivíduo ou de uma combinação de indivíduos com uma doença. Por exemplo, proteínas dobradas incorretamente são isoladas empregando-se uma proteína que é capaz de ligar-se especificamente a proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada, como tPA, RAGE ou um 20 equivalente funcional do mesmo (ver a Tabela 4), de fluido sinovial de um paciente com artrite (reumatóide). De forma análoga, é possível usar qualquer outra amostra.

Empregando abordagens como descritas acima obtém-se por 25 via recombinante regiões de afinidade para proteínas dobrada incorretamente s.

Após seleção dos fagos apropriados, DNA codificando as regiões variáveis das regiões de afinidade isoladas são isoladas, de preferência, do DNA de fagomídeo de forma a gerar anticorpos plenos. Isto é

realizado facilmente de acordo com procedimentos convencionais. O DNA é clonado, de preferência, em vetores que codificam as regiões constantes para as cadeias pesada e leve. É possível usar qualquer vetor e qualquer tipo desejado de região constante. O vetor é transduzido, de preferência, de 5 qualquer forma conhecida em um sistema de expressão de escol, de preferência, uma célula mamífera. Células expressando a região de afinidade são selecionadas preferivelmente. Regiões de afinidade preparadas por via recombinante são purificadas, de preferência, das células ou de sobrenadante de cultura derivado de células. Desta maneira, prepara-se qualquer região de 10 afinidade de imunoglobulina para proteínas dobradas incorretamente (Bloemendal *et al* 2004; Huls *et al* 1999a, 1999b; Boel *et al* 2000).

Para uso em humanos, gera-se, de preferência, regiões de afinidade recombinantes "quiméricas" ou "humanizadas". Regiões de afinidade obtidas de outras espécies são modificadas, de preferência, de tal 15 forma que seqüências não-humanas sejam substituídas por seqüências humanas, onde possível, enquanto que as propriedades de ligação da região de afinidade de preferência não são influenciadas demais. Em uma concretização, prepara-se regiões de afinidade durante estratégicas de imunização clássicas, de preferência, usando camundongos ou ratos, ainda 20 mais preferivelmente usando-se ratos transgênicos que codificam imunoglobulinas humanas. Após imunização, prepara-se, de preferência, linhas de células de hibridoma expressando anticorpos monoclonais via procedimentos convencionais, e/ou aplicando-se a tecnologia de apresentação 25 de fagos descrita acima. Seleciona-se, de preferência, anticorpos monoclonais que são capazes de interagir especificamente com proteínas dobrada incorretamente s. Versões "quiméricas" ou "humanizadas" de referidas regiões de afinidade, quando preparadas usando-se ratos ou camundongos normais, são preparadas, por exemplo, substituindo-se regiões constantes não-humanas e as regiões variáveis não-humanas relevantes pelas regiões

homólogas humanas relevantes (Morrison *et al* 1984; Jones *et al.* 1986). Além disso, regiões constantes diferentes são introduzidas quando desejado.

Em uma concretização preferida uma composição de acordo com a invenção compreende uma parte funcional, derivado e/ou análogo funcional de pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Uma parte funcional de uma molécula de IgIV é definida como um composto que tem as mesmas propriedades de ligação imunológicas no que se refere a tipo, não necessariamente a quantidade. Referida parte funcional é capaz de ligar-se a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, embora não necessariamente na mesma medida que referida molécula de IgIV. Um derivado funcional de uma molécula de IgIV é definido como uma molécula de IgIV que foi alterada de tal forma que a capacidade de ligação de uma proteína dobrada incorretamente e/ou um estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada do composto resultante é substancialmente o mesmo em termos de tipo, não necessariamente em termos de quantidade. Um derivado é proporcionado de muitas maneiras, por exemplo por meio de substituição conservativa de aminoácidos, em que um radical de aminoácido é substituído por outro radical com propriedades geralmente similares (tamanho, hidrofobibidade, etc), de tal forma que o funcionalmente global provavelmente não é seriamente afetado, ou mesmo aperfeiçoado.

Uma pessoa versada na arte é bem capaz de gerar compostos análogos de uma molécula de IgIV. Isto pode ser realizado, por exemplo, por meio de seleção de uma biblioteca de peptídeos. Um análogo do tipo referido é capaz de ligar-se a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura

β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, apesar de não necessariamente no mesmo grau que referida molécula de IgIV.

Uma molécula de IgIV selecionada e/ou uma molécula sintética ou recombinante isolada compreendendo uma região de afinidade capaz de ligar-se especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é usada em uma concretização da invenção para reagir e ligar-se a uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo estruturas β cruzadas *in vitro*. Referida molécula é reagida, de preferência, com uma amostra de fluido corporal ou de tecido, alimento, fluido, ou uma composição farmacêutica compreendendo proteínas dobradas incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, e material ligado é removido, de preferência. Outra aplicação de uma molécula de acordo com a invenção consiste em reação e ligação a proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada *in vivo*.

Uma concretização preferida proporciona uma composição de acordo com a invenção em que pelo menos uma de referidas moléculas compreende adicionalmente uma proteína dobrada incorretamente e/ou um composto de ligação de estrutura β cruzada. Uma proteína dobrada incorretamente e/ou composto de ligação de estrutura β cruzada é um composto capaz de ligar-se especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada. Uma proteína dobrada incorretamente e/ou molécula de ligação de estrutura β cruzada é capaz de servir como uma molécula efetora incrementando-se a capacidade de uma molécula de uma composição de acordo com a invenção para ligar-se especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Ligação

incrementada de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada devida a referida molécula de ligação de estrutura β cruzada é, por exemplo, desejada para incrementar a formação e a remoção de complexos de proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada da circulação e/ou 5 do corpo. Alternativamente, ou adicionalmente, o acúmulo local de uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas, como presentes em placas amilóides é diminuído.

Exemplos não-limitantes de proteína dobrada incorretamente e/ou moléculas de ligação de estrutura β cruzada são um domínio de dedo 10 (também referido como domínio de fibronectina de tipo I) de ativador de plasminogênio de tipo tissular (tPA [*Tissue-type Plasminogen Activator*]), fator de crescimento de hepatócitos (HGFA, *hepatocyte growth factor activator*), fator XII, ou fibronectina, ou membros da família de receptor de multiligantes, como receptor para receptor para produtos finais de 15 glicosamento avançado (RAGE, *receptor for advanced glycation end-products*), ou proteína relacionada com lipoproteína de baixa densidade (LRP, *low density lipoprotein receptor related protein*) ou CD36. Uma proteína dobrada incorretamente e/ou moléculas de ligação de estruturas β cruzadas do tipo referido pode ser até mesmo uma molécula não-proteinácea, como por 20 exemplo, um corante (vermelho Congo ou Tioflavina).

Em uma concretização, uma molécula efetora é oferecida a uma molécula isolada, sintética e/ou recombinante da invenção e/ou a uma imunoglobulina IgIV selecionada da invenção. Proporciona-se, portanto, também uma composição e uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com 25 a invenção, em que pelo menos uma de referidas moléculas compreende adicionalmente uma molécula efetora.

Em uma concretização preferida, referida molécula efetora compreende um inibidor de dobramento incorreto, como por exemplo, vermelho Congo. Em outra concretização preferida, referido composto efetor

é capaz de incrementar o sistema de complemento e/ou o sistema fagocítico de um animal (de preferência um humano) para incrementar a remoção de (proteínas compreendendo) estruturas β cruzadas indesejadas. Conseqüentemente, em uma concretização preferida, referido composto efetor 5 compreende um fator de ativação de complemento, como por exemplo, embora sem limitação, qualquer proteína de complemento, uma citocina ativadora de complemento, proteína C reativa, componente de amilóide P do soro, Pentraxina-3, uma região Fc de imunoglobulinas (ligante para C1q), uma proteína de controle de complemento, uma molécula capaz de 10 incrementar a atividade ativadora de complemento de proteínas de controle de complemento, e/ou moléculas capazes de inibir a atividade inibidora de proteínas de controle de complemento. Exemplos não-limitantes de proteínas de controle de complemento são inibidor de C1, proteína de ligação de C4, fator H, fator I, properidina, proteína S, receptor de complemento de tipo I, 15 proteína de cofator de membrana, fator acelerador de degradação, proteína de ligação de C8 e CD59. Em uma concretização preferida adicional referido composto efetor é capaz de facilitar a degradação de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Outra propriedade preferida de 20 referido composto efetor é uma capacidade de facilitar absorção celular de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Uma concretização proporciona uma composição de acordo com a invenção, em que referida molécula isolada, sintética e/ou recombinante, ou referida molécula de IgIV 25 selecionada, compreende um composto efetor que é uma protease ou uma proteína dobrada incorretamente e/ou parte de ligação de estrutura β cruzada. Referido efetor é particularmente vantajoso para a ligação e/ou degradação de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína indesejada compreendendo uma estrutura β cruzada. Em uma

concretização preferida adicional, referido composto efetor compreende um composto imunopotencializador para incrementar uma resposta imune dirigida contra uma resposta dirigida contra uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína 5 compreendendo uma estrutura β cruzada. Referido composto imunopotencializador compreende, de preferência, uma citocina.

Em uma concretização adicional referido composto efetor compreende uma proteína dobrada incorretamente e/ou fator potencializador de ligação de estrutura β cruzada. Este é um fator capaz de incrementar a capacidade de uma molécula de acordo com a invenção de ligação de uma 10 proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou ligação de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Exemplos não-limitantes de referidos fatores são Tioflavina T e Tioflavina S (ver por exemplo exemplo 4).

15 Em uma concretização adicional referido composto efetor compreende um sinal de eliminação que auxilia na remoção do complexo resultante após uma molécula e/ou molécula de IgIV da invenção ter-se ligado a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína 20 compreendendo uma estrutura β cruzada. Sinais de eliminação são bem conhecidos na arte. Um exemplo preferido de um sinal de eliminação é, pelo menos parte, de uma região Fc, mais preferivelmente uma região Fcy capaz de interagir com um receptor Fc (de preferência com um receptor de 25 FcyIIb). Referido sinal de eliminação é capaz de incrementar a remoção de um complexo compreendendo uma molécula de acordo com a invenção ligada a uma proteína dobrada incorretamente e/ou um estrutura β cruzada ou a uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada da circulação e/ou do corpo de um animal (de preferência, um humano).

A ativação do sistema de complemento resulta em uma cascata de reações, incluindo inflamação, destruição de células e danos ao tecido. Em

alguns casos deseja-se neutralizar o sistema de complemento de forma a abafar efeitos colaterais adversos. Exemplos não-limitantes de referidas circunstâncias são situações com ativação excessiva e/ou descontrolada do sistema de complemento ou ativação (prolongada) do sistema de complemento sem um mecanismo de *feedback* negativo funcionando adequadamente ou superestimulação do sistema de complemento, por exemplo, devido aos níveis sustentados e/ou superexpressos de ativadores, como por exemplo, durante inflamação, amiloidoses e/ou artrite reumatóide.

Em uma concretização, usa-se, portanto, um composto efetor que é um composto supressor de inflamação, de preferência, um fator inibidor de complemento, como por exemplo, uma imunoglobulina ou um composto capaz de inibir ou bloquear, pelo menos parcialmente, importante funcionamento de proteínas de complemento e/ou capaz de inibir ou bloquear, pelo menos parcialmente, importante funcionamento de qualquer proteína ou composto que compreende capacidades estimuladoras de sistema de complemento. Exemplos não-limitantes de fator inibidor de complementos compreendem receptor de TNF solúvel, antagonistas de receptor de IL-1 e citocinas antiinflamatórias.

Em outra concretização adicional, referido composto efetor compreende um composto opsonizador. Adicionalmente, ou alternativamente, referida molécula isolada, sintética e/ou recombinante da invenção é, por si só, um composto opsonizador. Opsonização é definida aqui como um processo de induzir e/ou incrementar fagocitose de uma substância por meio de fagócitos, como macrófagos, células polimorfonucleares e análogos.

Algumas substâncias são capazes de resistir e/ou escapar à fagocitose, por exemplo, devido à natureza de sua superfície. Em tais casos, a fagocitose é induzida e/ou incrementada, de preferência, por meio de opsonização de compostos de ligação, que, uma vez ligados a uma substância, facilitam a absorção de referida substância por fagócitos, como macrófagos e células

polimorfonucleares e análogos.

Em uma concretização, determina-se se uma molécula de IgIV selecionada e/ou uma molécula isolada, sintética e/ou recombinante de acordo com a invenção apresenta uma capacidade opsonizadora, usando-se células fagocíticas. De acordo com esta concretização, uma vez que se haja proporcionado uma seleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, referida coleção é incubada, de preferência, com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, onde, após complexos de moléculas de IgIV ligados a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada terem sido contactados subseqüentemente com uma célula fagocítica para se determinar quais moléculas de IgIV são capazes de induzir e/ou incrementar fagocitose de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Evidentemente também é possível realizar o mesmo tipo de teste com moléculas sintéticas ou recombinantes isoladas de acordo com a invenção. Proporciona-se adicionalmente um método para selecionar dentre uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, ou de uma composição de acordo com a invenção, uma molécula compreendendo uma região de afinidade que é capaz, ao interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou um epítopo de a estrutura β cruzada e/ou ao interagir com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, de induzir opsonização de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, por meio de uma célula fagocítica, em que referido método compreende:

- contactar uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção, com uma proteína

dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada;

- contactar qualquer complexo compreendendo uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína

5 compreendendo uma estrutura β cruzada, ligada a uma molécula de IgIV e/ou a uma molécula sintética, e/ou recombinante isolada, com uma célula fagocítica; e

- coletar uma molécula de IgIV e/ou molécula isolada, sintética e/ou recombinante que é capaz de induzir ou incrementar fagocitose,

10 por meio de uma célula fagocítica, de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

Referido teste é realizado, de preferência, *in vitro*. Moléculas de IgIV selecionadas e/ou isoladas, moléculas sintéticas ou recombinantes 15 capazes de induzir ou incrementar fagocitose são usadas, de preferência para para induzir e/ou incrementar a opsonização de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada que são capazes de resistir e/ou escapar da fagocitose.

Referidas proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou 20 proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada capazes de resistir e/ou escapar fagocitose, por exemplo, ocorrem em estados de doença em que moléculas capazes de induzir ou incrementar fagocitose estão ausentes ou presentes em níveis reduzidos (funcionais), como por exemplo, na AIDS, SCIDS e α -gamaglobulinemia, e, por exemplo, em estados de doença em que 25 a formação de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada é incrementada como, por exemplo, na encefalite espongiforme transmissível (TSE, *transmissible spongiform encephalopathy*), amiloidoses, diabetes, trombose e inflamação.

Como descrito acima, proteínas dobradas incorretamente e/ou

estruturas β cruzadas em proteínas estão freqüentemente relacionadas com, e/ou associadas com, um risco e/ou presença de doença, como por exemplo, doença de Huntington, doença de tipo amiloidose, aterosclerose, diabetes, sangramento, trombose, câncer, sépsis e outras doenças inflamatórias, artrite reumatóide, encefalopatias espongiformes transmissíveis, como doença de Creutzfeldt-Jakob, esclerose múltipla, doenças autoimunes, doenças associadas com perda de memória, como doença de Alzheimer, mal de Parkinson e outras doenças neuronais (epilepsia), encefalopatia e amiloidoses sistêmicas. Uma coleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e uma coleção de moléculas sintéticas ou recombinantes, isoladas, de acordo com a invenção, capazes de ligar-se especificamente a uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada, são particularmente vantajosas para prevenir e/ou tratar, pelo menos em parte, referidas doenças relacionadas e/ou associadas com proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada.

Assim, uma concretização proporciona uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção para uso como uma medicamento e/ou agente profilático. A invenção proporciona adicionalmente um uso de uma coleção de moléculas de IgIV e/ou de uma composição de acordo com a invenção para a preparação de uma medicamento e/ou agente profilático. Em que referida medicamento e/ou agente profilático é particularmente vantajoso para prevenir, tratar e/ou estabilizar, pelo menos parcialmente, doenças que estão relacionadas e/ou associadas com a ocorrência de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas, desordens da coagulação do sangue, sépsis, inflamação, e/ou uma infecção por um micrório, patógeno, bactéria, parasita e/ou vírus. Proporciona-se adicionalmente um uso de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção para a fabricação de uma droga para a prevenção e/ou o tratamento, pelo

menos parcial, de uma doença relacionada e/ou associada com proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada, uma desordem da coagulação do sangue, sépsis, inflamação e/ou uma infecção por micróbio/patógeno/parasita/bactéria/vírus. Proporciona-se aqui também um

5 método para a prevenção e/ou tratamento, pelo menos parcial, de uma doença relacionada e/ou associada com proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada, uma desordem da coagulação do sangue, sépsis e/ou uma infecção por micróbio, patógeno, parasita, bactéria, vírus em um indivíduo, compreendendo administrar uma coleção de moléculas de IgIV de acordo

• 10 com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção a referido

• indivíduo.

Em uma concretização preferida referida infecção por micróbio/patógeno/parasita/bactéria/vírus compreende uma infecção oportunista. Esta é uma infecção por um organismo, como por exemplo, um

15 patógeno e/ou vírus que, ordinariamente, não causa doença, mas que, em determinadas circunstâncias, (como um sistema imunológico prejudicado), torna-se patogênica. Um sistema imunológico prejudicado é causado, por exemplo, por medicação, como quimioterapia. Em uma concretização particularmente preferida, referida infecção por

20 micróbio/patógeno/parasita/bactéria/vírus compreende uma infecção oportunista relacionada com HIV.

Como infecções oportunistas são a causa principal de morte em pacientes com HIV, é altamente desejável proporcionar drogas e/ou agentes profiláticos contra referidas infecções. Muitas infecções oportunistas envolvem a presença de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada. Por exemplo, estruturas amilóides ocorrem na superfície de organismos microbianos, como fungos, leveduras e bactérias. Referidas estruturas similares a amilóide são denominadas, geralmente, hidrofobinas em fungos, *chaplins* em bactérias gram-positivas, e *curli* ou *tafi* ou fímbrias

agregativas em bactérias gram-negativas. Como um coleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e uma coleção de moléculas sintéticas ou recombinantes, isoladas, de acordo com a invenção são particularmente vantajosas para ligação de referidas proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada, referidas coleções da invenção são particularmente vantajosas para neutralizar e/ou prevenir, pelo menos em parte, infecções oportunistas relacionadas com HIV. Portanto, a invenção proporciona um método para a prevenção e ou tratamento pelo menos parcial de uma infecção oportunista relacionada com HIV em um indivíduo, compreendendo administrar uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção a referido indivíduo.

Uma composição compreendendo uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção e um carreador, diluente e/ou excipiente vantajoso também é proporcionada aqui. Referida composição compreende, de preferência, uma composição farmacêutica. Para ser capaz de administrar uma droga de acordo com a presente invenção a um paciente que necessita de tratamento, referida droga precisa preencher as necessidades de uma formulação farmaceuticamente aceitável. Isto significa que uma droga de acordo com a invenção compreende uma coleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma coleção de moléculas sintéticas ou recombinantes, isoladas, de acordo com a invenção que são de grau farmacêutico, fisiologicamente aceitáveis e testadas quanto a agentes estranhos. Proporciona-se também uma composição farmacêutica compreendendo uma coleção enriquecida de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma coleção de moléculas sintéticas ou recombinantes, isoladas, de acordo com a invenção e um carreador, diluente e/ou excipiente farmaceuticamente aceitável. De preferência, referida composição compreende uma proteína

dobrada incorretamente e/ou composto de ligação de estrutura β cruzada para incrementar a interação de referida composição farmacêutica com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. Portanto, a invenção 5 proporciona um composição de acordo com a invenção compreendendo adicionalmente uma proteína dobrada incorretamente e/ou composto de ligação de estrutura β cruzada. Em uma concretização preferida adicional da invenção, a ligação de uma composição de acordo com a invenção a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou a uma 10 proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é incrementada ou potencializada adicionalmente por meio da adição de um composto que é conhecido por suas características potencializadoras de proteína dobrada incorretamente e/ou de ligação de estrutura β cruzada, como por exemplo, moléculas de corante, como Tioflavina T ou Tioflavina S. Portanto, a presente 15 invenção revela um composição de acordo com a invenção compreendendo adicionalmente uma proteína dobrada incorretamente e/ou composto de potencialização de ligação de estrutura β cruzada.

Em outra concretização preferida, a remoção de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas 20 compreendendo uma estrutura β cruzada de um corpo é incrementada mediante a adição, a uma composição de acordo com a invenção [de] sinais potencializadores de complemento capazes de incrementar a ativação de complemento. Portanto, a invenção proporciona uma composição de acordo com a invenção, compreendendo adicionalmente um composto 25 potencializador de complemento.

Como a ativação do sistema de complemento resultados numa cascata de reações, incluindo inflamação, destruição de células e dano tissular, por vezes deseja-se neutralizar, pelo menos em parte, a ativação de complemento. Em alguns casos, a ativação do sistema de complemento com

relação à eliminação de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas causa, por si só, doença. Em referidos casos, uma composição de acordo com a invenção compreende adicionalmente, e de preferência, um composto inibidor de complemento. Em uma concretização, uma composição de acordo com a invenção compreende um composto supressor de inflamação.

A presente invenção proporciona adicionalmente meios e métodos para incrementar a degradação de proteína extracelular e/ou a eliminação de proteína em um indivíduo. Em uma situação natural, a formação de uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas inicia e/ou participa de uma cascata de eventos fisiológicos, lidando com a remoção de moléculas indesejadas, como por exemplo, proteínas dobradas incorretamente s, células apoptóticas ou ainda patógenos. Esta via regula a remoção de biomoléculas indesejadas durante diversos processos, incluindo dobramento incorreto de proteína durante a síntese no retículo endoplasmático, fibrinólise, formação de redes sinápticas neuronais, eliminação de proteínas usadas, indesejadas e/ou destruídas (desnaturadas), indução de apoptose e eliminação de células apoptóticas, células necróticas, células envelhecidas e/ou patógenos. Como uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e uma composição de acordo com a invenção são particularmente vantajosas para a ligação de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e proteínas compreendendo estruturas β cruzadas, aumenta-se a degradação de proteína extracelular e/ou a eliminação de proteína. Portanto, proporciona-se também um método para incrementar a eliminação de proteína e/ou degradação de proteína extracelular em um indivíduo, compreendendo administrar uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção a referido indivíduo.

Por meio de ligação e remoção de proteínas dobradas

incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e proteínas compreendendo estruturas β cruzadas, uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e uma composição de acordo com a invenção é capaz neutralizar, pelo menos em parte, efeitos mediados por proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada em um indivíduo. Adicionalmente, proporciona-se, portanto, um método para inibir, pelo menos em parte, efeitos mediados por proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada em um indivíduo, compreendendo administrar uma quantidade efetiva de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou a composição de acordo com a invenção a um indivíduo.

Em uma concretização preferida, uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção é usada para inibir a agregação de plaquetas que é induzida por proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada. Um exemplo de referido uso é mostrado no Exemplo 2, portanto, a invenção proporciona um uso de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção para para inibir a agregação de plaquetas no sangue induzida por proteína.

Em outra concretização preferida, uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção é usada para a ligação competitiva do ativador de plasminogênio de tipo tissular (tPA) de serina protease a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou a uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. tPA induz a formação de plasmina através da clivagem do plasminogênio. A plasmina cliva fibrina e isto ocorre durante a lise de um coágulo sanguíneo. Embora não essencial para a fibrinólise em camundongos, tPA tem sido reconhecido por seu papel na fibrinólise durante um longo período. A ativação de plasminogênio por tPA é estimulada pela fibrina ou

fragmentos de fibrina, mas não por seu precursor, o fibrinogênio. tPA é uma proteína dobrada incorretamente e proteína de ligação de estrutura β cruzada, um receptor de multi-ligantes e um membro da via de estrutura β cruzada. tPA media uma toxicidade celular e/ou disfunção celular induzida por proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada. tPA média, pelo menos em parte, a toxicidade e/ou a disfunção celular por meio da ativação de plasminogênio. Os efeitos dependentes de plasminogênio são inibidos por uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção. A ativação de plasminogênio/tPA descontrolada ou excessiva durante um estado de doença é tratada desta maneira. Exemplos não-limitantes de referidos estados de doença são doença de Alzheimer, infecções, pré-eclâmpsia, *angina pectoris*, doenças inflamatórias e não-inflamatórias das juntas, e diabetes.

Uma concretização preferida proporciona um uso de uma coleção de moléculas de IgIV e/ou de uma composição de acordo com a invenção para a remoção, pelo menos parcial, de uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada de uma amostra. A remoção de uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada é desejada em uma variedade de aplicações. Por exemplo, se um indivíduo estiver sofrendo de, ou em risco de sofrer de, um distúrbio relacionado com e/ou associada com a presença de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada, a remoção de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada do corpo é benéfica para neutralizar referido distúrbio e/ou para aliviar efeitos colaterais adversos. Além disso, é vantajoso remover proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada de produtos destinados ao consumo (humano) para evitar, pelo menos em parte, a absorção de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β

cruzadas. Assim, uma concretização proporciona um método para remover, pelo menos parcialmente, proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada de uma amostra, em que referido método compreende contactar uma amostra com

5 uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção, e remover de referida amostra quaisquer complexos de uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas, e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada, ligada a uma molécula de IgIV e/ou uma molécula isolada, sintética e/ou recombinante. Referida amostra compreende, de preferência, uma amostra de

10 fluido. Em uma concretização, referido fluido compreende uma substância alimentícia.

Em uma concretização preferida, referida amostra compreende um fluido corporal. Esta concretização é particularmente vantajosa para prevenir e/ou tratar, pelo menos em parte, um distúrbio relacionado e/ou associado com uma proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada, de um animal, de preferência, de um indivíduo humano. Em uma concretização preferida aplica-se diálise extracorpórea. Por exemplo, um paciente que sofre de uma desordem associada e/ou relacionada com uma proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada é submetido à diálise de seu sangue. Uma coleção de moléculas de IgIV e/ou uma composição de acordo com a invenção é acoplada, por exemplo, a um carreador ou suporte e/ou no interior de um tubo usado para diálise. Desta maneira, proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada serão removidas do fluxo sanguíneo de referido paciente, aliviando com isto, pelo menos me parte, referido paciente de efeitos negativos relacionados com, e/ou associados com, referidas proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada. Como outro exemplo,

referido uso é aplicado na hemodiálise de pacientes com problema de rim. Proporciona-se também um dispositivo de separação para realizar um método de acordo com a invenção. Assim, uma concretização proporciona um dispositivo de separação para realizar um método de acordo com a invenção, 5 em que referido dispositivo comprehende um sistema para transportar fluidos (circulantes), em que referido sistema é dotado com meios para conectar-se a um fluido em estado de fluxo, de preferência, à circulação de um circulação, meios para entrada de fluido no referido sistema, e retorno do fluido do referido sistema, de preferência, à circulação do referido indivíduo, referido sistema comprehende adicionalmente uma fase sólida, em que referida fase sólida comprehende uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção. Referido dispositivo de separação comprehende, de preferência, um aparelho de diálise.

Outra concretização preferida proporciona o uso de uma 15 coleção de moléculas de IgIV e uma composição de acordo com a invenção para a remoção, pelo menos parcial, de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas comprehendendo uma estrutura β cruzada de um farmacêutica ou qualquer de seus constituintes. Categorias 20 importantes de composições farmacêuticas hodiernas comprehendendo uma proteína ou um composto proteináceo como uma substância ativa incluem, embora sem limitação, hormônios, enzimas, vacinas e antígenos, citocinas e anticorpos. Adicionalmente às composições farmacêuticas de proteína indicadas acima, é possível fabricar um grande número de composições farmacêuticas com o auxilio de uma etapa de produção e/ou purificação 25 comprehendendo proteínas. Por exemplo, muitas composições farmacêuticas comprehendem uma ou mais proteínas como um agente estabilizador. Problemas de saúde relacionados com o uso de composições farmacêuticas são relacionadas, por exemplo, com os campos da hematologia, fibrinólise e imunologia. Uma lista incompleta efeitos colaterais observados após a

administração de composições farmacêuticas compreende, por exemplo, febre, respostas anafiláticas, respostas (auto)imunes, perturbação da hemostase, inflamação, problemas fibrinolíticos, incluindo sepsis e coagulação intravascular disseminada (DIC *disseminated intravascular coagulation*), que pode ser fatal. Referidos efeitos colaterais são causados, por exemplo, ou por uma alteração de uma proteína ou um composto de proteína presente em referida pharmaceutical composição, ou por adição de diluentes ou de substâncias-carreador de referida composição farmacêutica. Alteração de um composto de proteína de uma composição farmacêutica compreende, por exemplo, desnaturação, multimerização, proteólise, acetilação, glicação, oxidação, desdobramento ou dobramento incorreto de proteínas. Desdobramento ou dobramento incorreto de proteínas nativas dobradas inicialmente de forma apropriada leva à formação de estruturas tóxicas em referidas proteínas. Estruturas tóxicas de composições farmacêuticas freqüentemente compreendem proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas. Referidas estruturas tóxicas são removidas, pelo menos em parte, com uma coleção de moléculas de IgIV e/ou uma composição de acordo com a invenção.

Proporciona-se aqui, portanto, um método para remover uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada de uma composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína, em que referido método compreende:

- contactar referida composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína com uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou com uma composição de acordo com a invenção;
- permitir a ligação de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma

estrutura β cruzada a referida coleção de moléculas de IgIV e/ou composição;

e

- separar proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada ligada e/ou proteína ligada compreendendo uma estrutura β cruzada de referida composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína.

Por meio de remoção de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada de uma composição farmacêutica, efeitos colaterais

indesejados são, pelo menos em parte, reduzidos e/ou evitados. Portanto, proporciona-se também um método para reduzir e/ou prevenir efeitos colaterais indesejados de uma composição farmacêutica e/ou incrementar a atividade específica por grama de proteína, em que referido método compreende remover uma proteína não-dobrada, um peptídeo não-dobrado,

uma proteína dobrada incorretamente, uma proteína desnaturada, uma proteína agregada, um peptídeo agregado, uma proteína multimerizada e/ou um peptídeo multimerizado, e/ou um peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada, de referida composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes, usando-se um método de acordo com a invenção.

Proporciona-se também uma composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína, obtêvel por meio de um método de acordo com a invenção. Referida composição farmacêutica envolve um risco reduzido de efeitos colaterais indesejados, em comparação com composições farmacêuticas não-tratadas.

Em uma concretização, uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é removida de uma amostra usando-se uma coleção de moléculas de IgIV e/ou uma composição de moléculas sintéticas ou recombinantes, isoladas, de acordo com a invenção, em que referida coleção e/ou composição

é ligado a um suporte sólido. Isto proporciona a vantagem de tornar possível um processo contínuo, em que referido suporte sólido é incubado com uma amostra. Subseqüentemente, referida amostra e referido suporte sólido são facilmente separados um do outro, em que referido suporte sólido

5 compreende proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada que são ligados (indiretamente), enquanto que a amostra resultante apresenta uma concentração menor de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada.

10 Em outra concretização adicional, uma imunoglobulina IgIV selecionada e/ou uma molécula isolada, sintética e/ou recombinante de acordo com a invenção é usada para preparar um kit de diagnóstico. Referido kit de diagnóstico é particularmente vantajoso para o diagnóstico de uma doença que é relacionada e/ou associada com a presença de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas. Referido kit compreende, de preferência, pelo menos uma região de afinidade de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou pelo menos uma região de afinidade de uma composição de acordo com a invenção, capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou

15 com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, e um modo de visualização de uma interação de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou referida proteína com referida região de afinidade.

20

25 Com referido kit de diagnóstico, é possível diagnosticar não só doenças que são geralmente relacionadas e/ou associadas com a presença de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas, mas também é possível um diagnóstico mais definido, dependendo da especificidade das regiões de afinidade no kit. Um kit de diagnóstico capaz de diagnosticar especificamente um tipo de desordem é gerado, por exemplo, dotando-se

referido kit com regiões de afinidade que são capazes de se ligarem especificamente a uma dada proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou uma dada proteína compreendendo uma estrutura β cruzada que é específica para referido um tipo de desordem, como por exemplo, proteínas 5 relacionadas com artrite reumatóide, SLE ou outras doenças autoimunes, ou reações inflamatórias. Portanto, em uma concretização, a invenção proporciona um kit de diagnóstico como descrito acima, em que referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada é uma proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada relacionada com doença.

• 10 Como proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada são ligadas efetivamente a uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou a uma composição de acordo com a invenção, elas são separadas e/ou isoladas efetivamente de uma amostra e/ou do corpo de um animal ou humano 15 e subseqüentemente identificadas. Assim, em outra concretização adicional, usa-se uma imunoglobulina IgIV selecionada e/ou uma molécula isolada, sintética e/ou recombinante de acordo com a invenção para isolar proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada. De preferência, identifica-se 20 proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada presentes em um fluido corporal, como por exemplo, sangue, soro, plasma, fluido cérebro-espinal, fluido sinovial, saliva e/ou urina. Por exemplo, a presença e/ou identidade de uma proteína dobrada incorretamente e/ou de uma estrutura β cruzada, e/ou 25 proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, de indivíduos saudáveis é comparada com a presença e/ou identidade de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada, e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, de indivíduos com uma doença relacionada e/ou associada com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β

cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada. A identidade e a concentração relativa de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é determinada usando-se qualquer método conhecida a uma pessoa versada na arte, como por exemplo, mas sem limitação, eletroforese em gel 5 2D e/ou análises espectrométricas de massa. De preferência, compara-se os resultados de uma amostra que se origina de um indivíduo saudável e uma amostra que se origina de um paciente. Desta forma obtém-se informação, por exemplo acerca da identidade e/ou suscetibilidade de proteínas propensas a dobramento incorreto e/ou a adotarem conformação de estrutura β cruzada durante estados de doença definidos. Esta informação obtida serve 10 subseqüentemente como uma ferramenta de diagnóstico, por exemplo, para monitorar estado de doença, para monitorar a efetividade da terapia, para monitorar a ocorrência de doença, e proporciona valiosas pistas para o desenvolvimento de terapêuticos objetivados a proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteína(s) compreendendo 15 uma estrutura β cruzada que, de preferência, são específicos para uma doença definida.

Assim, a invenção proporciona um método para a determinação da identidade de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada em uma amostra compreendendo uma proteína, em que referido método 20 compreende:

- contactar referida amostra com uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção, resultando em proteínas dobradas incorretamente ligadas e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteína(s) ligadas compreendendo uma estrutura β cruzada, e 25

- identificar uma proteína dobrada incorretamente e/ou

estrutura β cruzada ligada e/ou uma proteína ligada compreendendo uma estrutura β cruzada. Referida proteína dobrada incorretamente ligada e/ou estrutura β cruzada e/ou proteína ligada compreendendo uma estrutura β cruzada é identificada, de preferência, analisando-se pelo menos parte da 5 seqüência de aminoácidos de referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada e/ou proteína usando-se qualquer método conhecido na arte. Referida amostra compreende, de preferência, uma solução aquosa, mais preferivelmente um fluido corporal. Em uma concretização preferida, fluidos corporais que se originam de indivíduos saudáveis (de preferência, humanos) 10 e fluidos corporais que se originam de indivíduos que sofrer de, ou que suspeita sofrerem de, uma doença relacionada e/ou associada com a presença de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada, são usados para comparar um estado saudável com um estado de doença (ou um estado em que o risco de doença é incrementado).

15 Como a presente invenção proporciona uma maneira de selecionar dentre uma coleção de IgIV aquelas imunoglobulinas que apresentam regiões de afinidade capazes de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, uma pessoa versada na arte agora 20 também será capaz de usar referida IgIV selecionada, e/ou moléculas sintéticas ou recombinantes, isoladas, de acordo com a invenção, para determinar se uma proteína ou peptídeo que é dobrado incorretamente e/ou que compreende uma estrutura β cruzada está presente em uma amostra. Proporciona-se, portanto, um método para determinar se uma proteína 25 dobrada incorretamente e/ou uma proteína e/ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada está presente em uma solução aquosa compreendendo uma proteína, em que referido método compreende:

- contactar referida solução aquosa com uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de

acordo com a invenção, e

- detectar se proteína dobrada incorretamente ligada e/ou proteína e/ou peptídeo ligado compreendendo uma estrutura β cruzada está presente. Referida proteína e/ou peptídeo é detectado, de preferência, em uma
5 solução aquosa contactando-se referida solução aquosa com uma coleção e/ou composição da invenção e detectando-se peptídeos e/ou proteínas ligadas. Assim, proporciona-se um método para detectar uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma proteína e/ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada em uma solução aquosa compreendendo uma proteína, em
10 que referido método compreende contactar referida solução aquosa com uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção, resultando em proteína dobrada incorretamente ligada e/ou uma proteína e/ou peptídeo ligado compreendendo uma estrutura β cruzada, e detectar proteína dobrada incorretamente ligada e/ou proteína e/ou peptídeo ligado compreendendo uma estrutura β cruzada.
15 A ligação de referida coleção e/ou composição da invenção a uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada é detectada, de preferência, por meio de uma reação de visualização como, por exemplo, manchamento fluorescente ou uma detecção enzimática ou colorimétrica, ou
20 por meio de qualquer outro sistema de visualização disponível a uma pessoa versada na arte.

Referida solução aquosa compreende, de preferência, um detergente, um produto alimentício, um suplemento alimentar, um meio de cultura de células, uma solução de proteína comercialmente obtênia usada para fins de pesquisa, sangue, um produto de sangue, um fluido corporal, como por exemplo, urina, fluido cérebro-espinal, fluido sinovial, fluido linfático e/ou saliva, um produto cosmético, uma célula, uma composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína, ou uma combinação de qualquer um destes.
25

Um uso de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção, para determinar a presença de proteína dobrada incorretamente e/ou proteínas com uma estrutura β cruzada depositadas acumuladas, também é proporcionado aqui.

- 5 De preferência, detecta-se a presença de uma proteína dobrada incorretamente envolvida em uma doença conformacional. Uma doença conformacional é definida como uma doença que é causada, relacionada e/ou associada com dobramento incorreto de proteínas e/ou modificação conformacional de proteínas.
- 10 Uma concretização compreende adicionalmente a detecção da quantidade de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada em uma composição. Isto é realizado, por exemplo, de forma a determinar o curso de uma doença. Adicionalmente, proporciona-se um método para determinar a
- 15 quantidade de uma proteína dobrada incorretamente e/ou uma estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada em uma composição, de preferência, em uma droga e/ou vacina, compreendendo contactar referida composição com uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou com uma composição de acordo com a invenção,
- 20 e relacionar a quantidade de proteína dobrada incorretamente ligada e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada à quantidade de estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada presentes em referida composição.

Como proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada são ligadas efetivamente a uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e a uma composição de acordo com a invenção, elas são removidas efetivamente de uma amostra e/ou do corpo de um animal (dep, grupo um corpo humano). Desta maneira, o acúmulo de proteínas dobradas incorretamente é diminuído. Assim,

proporciona-se adicionalmente um uso de uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção, para diminuir o acúmulo de proteína dobrada incorretamente e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada. Referida proteína dobrada incorretamente e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada estão envolvidas, de preferência, e uma doença conformacional. A diminuição do acúmulo de referidas proteínas resulta no alívio de sintomas de referida doença conformacional e/ou pelo menos tratamento e/ou prevenção parcial do curso da doença. Referida doença conformacional compreende, de preferência, uma doença de tipo amiloidose, aterosclerose, diabetes, sangramento, trombose, câncer, sépsis e outras doenças inflamatórias, artrite reumatóide, encefalopatias espongiformes transmissíveis, esclerose múltipla, doenças auto-imunes, doença associada com perda de memória ou mal de Parkinson e outras doença neuronais (epilepsia), encefalopatia, e/ou reumatismo.

A coagulação do sangue e a formação de coágulos sanguíneos também envolvem a presença de uma proteína dobrada incorretamente e/ou estruturas β cruzadas. Exemplos do papel de proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas (dobrada incorretamente s) compreendendo estruturas β cruzadas compreendem a ativação de plaquetas e a indução da agregação de plaquetas e aglutinação, ativação do endotélio resultando em expressão de fator de tecido e exposição a sangue, resultando em coagulação do sangue, e ativação do sistema de contato da coagulação do sangue via ativação de fator XII. Adicionalmente, durante a coagulação do sangue formam-se polímeros de fibrina com conformação de estrutura β cruzada. O bloco construtivo de estrutura β cruzada de uma rede de fibrina serve subsequentemente como o sítio de ligação para tPA para localizar tPA no sítio em que se requer a atividade fibrinolítica. Como a coleção e composição de acordo com a invenção são capazes de ligar especificamente e/ou remover

proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo estruturas β cruzadas, em que referida coleção e composição são particularmente vantajosas para interferir na coagulação do sangue e/ou na formação de coágulos e/ou ativação de fator de tecido. Proporciona-se 5 adicionalmente um método para interferir na coagulação do sangue e/ou na formação de coágulos compreendendo dotar o sangue com uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção.

Proporciona-se também um método para determinar uma 10 diferença no teor de estrutura β cruzada de uma proteína em uma amostra de referência, em comparação com o teor de estrutura β cruzada de referida proteína em uma amostra de teste, em que referida amostra de teste foi submetida a um tratamento que se espera exercer um efeito sobre o teor de estrutura β cruzada de referida proteína, em que o método compreende:

15 - determinar em uma amostra de referência o teor de estrutura β cruzada de uma proteína ussando-se uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou uma composição de acordo com a invenção;

- submeter referida proteína a um tratamento que se espera exercer um efeito sobre o teor de estrutura β cruzada de referida proteína, 20 obtendo-se uma amostra de teste;

- determinar na amostra de teste obtida o teor de estrutura β cruzada de referida proteína usando-se uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção, e/ou uma composição de acordo com a invenção; e

- determinar se o teor de estrutura β cruzada de referida 25 proteína em referida amostra de referência é显著mente diferente do teor da estrutura β cruzada de referida proteína em referida amostra de teste.

Esta concretização é particularmente vantajosa para determinar se uma determinada circunstância e/ou tratamento tem um efeito sobre o teor de estrutura β cruzada de uma proteína. Uma vez isto determinado, é possível

selecionar uma circunstância e/ou tratamento que apresenta uma baixa capacidade de induzir e/ou incrementar a conformação de estrutura β cruzada. Evidentemente, também é possível selecionar uma circunstância e/ou tratamento que é bem capaz de induzir e/ou incrementar conformação de estrutura β cruzada, dependendo de uma aplicação particular.

5 A invenção é explicada adicionalmente com os exemplos a seguir, sem restringir-se aos mesmos.

EXEMPLOS

Materiais e métodos

10 Materiais

Usou-se anticorpos de imunoglobulina G (IgG) humana de amplo espectro, referidos como 'Ig intravenosa' ('IVIg' ou 'IgIV'), 'gamaglobulina', 'globulina imune intravenosa', 'imunoglobulina intravenosa' ou de outra forma, foram obtidos do departamento de farmácia da University Medical Center Utrecht local. *Octagam* da Octapharma (Octapharma International Services N.V., Brussel, Bélgica; dosagem de 2,5 g em 50 ml, lote 4270568431, exp. 05-2006, referido a seguir como 'fabricante I' de IgIV, ou IgIV (I) ou IgIV-I) e Hyland Immuno Gammagard S/D IVIg de Baxter (Baxter B.V., Utrecht, Países Baixos; dosagem de 5 g com 96 ml de solução de reconstituição, lote LE08E044AL, exp. 04-2007, referido a seguir como 'fabricante II' de IgIV, IgIV (II) ou IgIV-II). *Gammagard* foi reconstituído em condições estéreis por meio de adição dos 96 ml de H_2O fornecidos e deixando-se a solução durante 30 minutos em um dispositivo de rolamento à temperatura ambiente (concentração final de IgG de 52 mg/ml. Obteve-se 20 uma solução transparente sem formação de espuma. A solução reconstituída foi repartida e armazenada a -20°C. Após reconstituição, a solução de *Gammagard* contém 0,06 g de albumina humana pasteurizada, 0,45 g de glicina, 0,175 g de NaCl, 0,43 g de monoidrato de glucose e 0,04 g de polietileno glicol 3.350. *Octagam* é fornecido como uma solução de pronto- 25

emprego compreendendo 50 mg/ml de IgIV. Outros componentes são 100 mg/ml de maltose e menos de 5 µg/ml de Triton X-100 e menos de 1 µg/ml de fosfato de tri-n-butila. Devem ser armazenados a 4°C. De acordo com o fabricante, *Octagam* consiste principalmente de IgG's (≥95%), com uma fração menor de IgA (≥0,4%). A distribuição sobre os quatro isótipos de IgG é a seguinte: IgG1, 62,6%; IgG2, 30,1%; IgG3, 6,1%; IgG4, 1,2%. *Gammagard* e *Octagam* são usados à temperatura ambiente. Soluções foram mantidas à temperatura ambiente durante pelo menos 30 minutos antes do uso. Frações congeladas de *Gammagard* foram descongeladas rapidamente de 5 início a aproximadamente 0°C e, depois, deixadas à temperatura ambiente. Uma terceira fonte de imunoglobulinas humanas consistiu de plasma citrado combinado normal de 40 doadores aparentemente saudáveis, preparado na 10 *University Medical Center Utrecht*. Este plasma foi misturado diretamente após o sangue ser coletado, e repartido diretamente e congelado a -80°C. 15 Antes do uso, uma fração foi descongelada durante 10 minutos em um banho de água a 37°C e mantida à temperatura ambiente durante 30 minutos. O plasma foi misturado por meio de rotação e/ou ressuspensão com uma pipeta; evitou-se agitação com vórtice, como foi feito com as preparações de IgIV e usou-se todas as outras soluções de proteína.

20 Para ELISA usou-se placas de alta ligação Microlon (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemanha; número de catálogo 655092, lote 05130103, exp. 03- 2009). Anticorpos usados foram fosfatase alcalina de IgG anti-humana de cabra (Biosource Int., Camarillo, CA, E.U.A.; número de catálogo AHI0305, lote 7602), fosfatase alcalina de IgM anti-humana de 25 cabra (Biosource Int.; número de catálogo AHI0605, lote 3903), imunoglobulinas anti-camundongo de coelho conjugadas com peroxidase (RAMPO, número de catálogo P0260, DAKOCytomation, Glostrup, Dinamarca), imunoglobulinas anti-coelho de porco acopladas com peroxidase (SWARPO, número de catálogo P0217, DAKOCytomation), anticorpo de

albumina anti-humana policlonal de coelho A-0001 (DAKOCytomation), anticorpo de hemoglobina anti-humana policlonal de coelho A-0118 (DAKOCytomation; lote 122(021)), anticorpo de amilóide-6 anti-humano monoclonal de camundongo M0872 (DAKOCytomation; clone 6F/3D, lote 5 00003503, exp. 08-2006), anticorpo de fibrinogênio anti-humano policlonal de coelho A0080 (DAKOCytomation; lote 097(701), exp. 08-2006) e anticorpo de fibronectina humana glicada anti-glicose-6-fosfato de hibridoma 10 monoclonal murino 4B5 (lote 2, código 100901BB, ref. (Bouma *et al.*, 2003)). Em ELISAs, avaliou-se a ligação de anticorpos conjugados com fosfatase alcalina usando-se p-nitrofenil fosfato dissódico 6*H₂O (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.; substrato de fosfatase número de catálogo 104, lote 120K6008), e ligação de anticorpos conjugados com peroxidase foi avaliado usando 1,2-fenilenodiamina ('OPD', Merck, Darmstadt, Alemanha; número de catálogo 1.07243.0050, lote L937543-844).

15 Estudos de inibição usando uma montagem ELISA foram realizados usando-se séries de concentrações de vermelho Congo (Aldrich, Milwaukee, WI, E.U.A.; número de catálogo 86,095-6), Tioflavina T (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.; número de catálogo T3516, lote 80K3444), Tioflavina S (Sigma; número de catálogo T1892), ativador de plasminogênio de tipo 20 tissular (tPA, Actilyse, Boehringer-Ingelheim, Alkmaar, Países Baixos), ou uma forma truncada de tPA (K2P tPA, Rapilisina, Boehringer- Ingelheim, Alkmaar, Países Baixos) carecendo de três domínios amino terminais incluindo o domínio de fibronectina de tipo I, ou denominado alternativamente domínio de dedo (F, *finger*).

25 Antígenos usados em ELISAs de ligação de IgIV foram o peptídeo de fibrina humana sintético 148-KRLEVVDIDIGIRS-160 (SEQ-ID 1), com uma mutação K157G, peptídeo amilóide β humano sintético 1- DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-40 (SEQ-ID 2) (A β (1-40), tipo Holandês A β (1-40)E22Q humano sintético 1-

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGVV-40 (SEQ-ID 3) (*Peptide facility, Dutch Cancer Institute, Amsterdam, Países Baixos*), albumina do soro bovina (BSA, fração V, número de catálogo A-7906, fracionamento inicial por meio de choque com calor, pureza \geq 98% 5 (eletroforese), restante em sua maior parte de globulinas, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), hemoglobina humana (Hb, Sigma-Aldrich; número de catálogo H7379), e suas contrapartes BSA-AGE e Hb-AGE modificadas com produtos acabados glicados avançados (ver abaixo).

Métodos

10 Glicação de proteínas

A glicação de albumina e Hb foi realizada como a seguir. Para a preparação de BSA-AGE, 100 mg ml⁻¹ de albumina foram incubados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, 140 mM de cloreto de sódio, 2,7 mM de cloreto de potássio, 10 mM de hidrogênio fosfato dissódico, 1,8 mM de diidrogênio fosfato de potássio, pH 7,3) contendo 1 M de hidrato de sal dissódico de D-glucose-6-fosfato (anidra) (g6p, ICN, Aurora, Ohio, E.U.A.) e 0,05% m/v de NaN₃, a 37°C no escuro. A solução foi glicosada durante 70 semanas. Hb humana a 10 mg/ml foi incubada durante 75 semanas a 37°C 15 com PBS contendo 1 M de g6p e 0,05% m/v de NaN₃. Após as incubações, 20 soluções de albumina e Hb foram dialisadas extensivamente contra água destilada e, subsequentemente, repartidas e armazenadas a -20°C. Concentrações de proteína foram determinadas com reagente de ensaio de proteína Advanced ADVO1 (Cytoskeleton, Denver, CO, E.U.A.).

Preparação de proteínas desnaturadas com calor

25 Proteínas dobradas incorretamente desnaturadas com calor foram preparadas como a seguir. Um mg/ml de Endostatina (fragmento XVIII de colágeno produzido recombinantemente, EntreMed, Inc., Rockville, MD; solução), BSA (Sigma-Aldrich; liofilizada, número de catálogo A7906), albumina do soro murina (MSA, Calbiochem, EMD Biosciences, Inc., San

Diego, CA; liofilizada, número de catálogo 126674), lisozima de clara de ovos de galinha (ICN, Irvine, CA, E.U.A.; liofilizada, número de catálogo 100831), glucagônio humano (Glucagen, Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca; liofilizado, número de catálogo PW60126), ovalbumina de frango purificada (OVA, Sigma; número de catálogo A7641, lote 071k7094) ou 62-glicoproteína I humana (62gpi, purificada na própria empresa, de plasma fresco, ref. (Horbach *et al.*, 1996)) em 67 mM de tamponador NaPi pH 7,0, 100 mM de NaCl, foi aquecido durante cinco ciclos em copos de PCR em um ciclizador térmico PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, E.U.A.). Em 10 cada ciclo, proteínas foram aquecidas de 30 a 85°C a uma taxa de 5°C/min. Adicionalmente, endostatina, MSA, ovalbumina e lisozima foram 15 desnaturadas com calor a 1 mg/ml de uma maneira similar, usando apenas um ciclo de incubação com calor. A endostatina a 7,9 mg/ml foi diluída em H₂O a 1 mg/ml, MSA e ovalbumina a 1 mg/ml foram em PBS pH 7,4, lisozima foi dissolvida em PBS com adição de 10 µM de HCl, concentração de 1 mg/ml. Proteínas de controle não são submetidas ao procedimento de ciclização 20 térmico. Para confirmar o dobramento incorreto das proteínas em estruturas similares a amilóide, avaliou-se o incremento de Tioflavina T (ThT) com proteínas tratadas com calor e também com proteínas de controle. A fluorescência de adutos de peptídeo/proteína similar a amilóide - ThT foi 25 medida como a seguir. Soluções de 25 µg ml⁻¹ de preparações de proteína ou peptídeo foram preparadas em tamponador de glicina 50 mM pH 9,0 com 25 µM de ThT. A fluorescência foi medida a 485 nm com excitação a 435 nm. Sinais de fundo do tamponador, tamponador com ThT e solução de 30 proteína/peptídeo sem ThT foram subtraídos das medições correspondentes com solução de proteína incubada com ThT. De uma forma regular, usou-se a fluorescência de A^β como um controle positivo, e fluorescência de fragmento de fibrina humana sintética FP10 (148-KRLEVDIDIK-157 (SEQ-ID 4); Peptide facility, Dutch Cancer Institute, Amsterdam, Países Baixos), um

fragmento de fibrina não-amilóide (Kranenburg *et al.*, 2002), e tamponador foram usados como um controle negativo. A fluorescência foi medida em triplicata em um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japão). Alternativamente, analisou-se a fluorescência do vermelho Congo de uma maneira similar. Agora, os comprimentos de excitação e emissão foram de 550 e 590 nm. Novamente, analisou-se 25 µg/ml de proteínas de teste, em soluções de vermelho Congo 25 µM.

Alternativamente, preparou-se um peptídeo de amilóide desnaturado com calor como a seguir. Peptídeo de fibrina humana NH₂-IDIKIR-COOH (SEQ-ID 6, FP6) foi dissolvido a aproximadamente 10 mg/ml em uma relação volumétrica de 1:1 de 1,1,1,3,3,3- hexafluoro-2-propanol e ácido trifluoroacético. Os solventes orgânicos foram vaporizados sob um fluxo de ar. FP6 foi dissolvido em água destilada a uma concentração final de 1 mg/ml e mantido a 37°C durante 72 h. A solução foi armazenada subsequentemente à temperatura ambiente. A presença de conformação de estrutura β cruzada foi confirmada medindo-se o incremento de fluorescência de corantes ThT e vermelho Congo específicos para amilóide e por meio de análise de difração de raios-X com fibras (comunicação pessoal, L. Kroon-Batenburg, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Dept. of Crystal & Structural Chemistry, University of Utrecht, Países Baixos) (dados não mostrados aqui). Além disso, a propriedade de soluções de FP6 de ativar tPA em um ensaio de conversão de plasminogênio/plasmina/substrato cromogênico foi avaliada e verificou-se que é positiva (dados mostrados alhures).

25 Preparação de oligômeros de peptídeo de príon de levedura com uma conformação similar a amilóide

O fragmento de peptídeo NH₂-GNNQQNY-COOH da proteína de príon de levedura (SEQ-ID 5) foi adquirido da *Peptide Facility of the Netherlands Cancer Institute* (H. Hilkmann, NKI -Amsterdam, Países Baixos;

lote 5LKB1-2081). A pureza do peptídeo foi analisada realizando-se HPLC de fase invertida e foi de ~90%. O peptídeo foi dissolvido a concentrações finais de 1 e 10 mg/ml em H₂O. As soluções transparentes foram incubadas durante 72 h a 4°C em uma banca de rolamento ou durante 5 h à temperatura ambiente sem movimento. O incremento da fluorescência do vermelho Congo foi determinada como uma medida da presença de conformação similar a amilóide (ver acima). Adicionalmente, a formação de estrutura β cruzada com este batelada de peptídeo foi confirmada com análise de difração de raios-X de fibras usando-se uma solução de 10 mg/ml em H₂O (comunicação pessoal, 5 L. Kroon-Batenburg, Bijvoet Center for Biomolecular Research, Dept. of Crystal & Structural Chemistry, University of Utrecht, Países Baixos) (dados 10 não mostrados aqui).

Preparação de proteínas oxidadas

A oxidação de proteínas foi realizada usando-se exposição 15 prolongada de proteínas em solução a CuSO₄. Proteínas usadas foram plasma citrato combinado normal humano de pessoas aparentemente saudáveis, endostatina formulada (EntreMed, Inc., Rockville, MD; solução a 7,9 mg/ml), lisozima de clara de ovos de galinha (ICN, número de catálogo 100831, lote 98032), hemoglobina humana (Sigma-Aldrich, número de catálogo H7379, 20 lote 039H7605), glucagônio humano (Glucagen from NovoNordisk Farma B.V., lote RW 60038), albumina bovina (Sigma-Aldrich, A7906, lote 81K1813), γ -globulinas humanas (Sigma-Aldrich, G4386, lote 21K7600), ovalbumina de clara de ovos de galinha (Sigma-Aldrich, A7641, lote 071K7094). Proteínas liofilizadas foram dissolvidas a 2 mg/ml em PBS, 25 plasma foi diluído 40 vezes e endostatina foi diluída a 2 mg/ml em PBS. Adicionou-se solução de consumo de NaN₃ a 2% m/v a uma concentração final 0,02%. Solução de consumo de CuSO₄ de 1 M em H₂O foi adicionada a uma concentração final de 10 mM. Em soluções de proteína de controle adicionou-se H₂O em lugar de CuSO₄. Todas as soluções de proteína foram

misturadas com rotação, evitando-se agitação com vórtice. Soluções foram mantidas a 4°C em uma banca de rolamento durante 72 h. Mediú-se o incremento de ThT (ver acima).

Alternativamente, proteínas foram oxidadas introduzindo-se 5 10 μ M de CuSO₄ nas soluções. Desta maneira, ovalbumina, albumina, endostatina, lisozima, γ -globulinas, todas a 2,5 mg/ml, e glucagônio a 1 mg/ml foram incubadas durante 144 h a 37°C em PBS. Em soluções de proteína de controle omitiu-se o CuSO₄. Mediú-se a fluorescência de tioflavina T como uma medida da presença de proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada. Soluções de proteína que apresentaram fluorescência incrementada de ThT foram 10 dialisadas contra PBS, e também seus controles não-oxidados.

Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram isoladas de plasma humano fresco (<24 h) que foi mantido a 10°C, obtido do banco de 15 sangue dos Países Baixos. LDL foram isoladas substancialmente como descrito previamente (4). Plasma foi centrifugado em uma ultracentrífuga durante três ciclos subseqüentes. A fração de LDL foi isolada e armazenada sob N₂, a 4°C. Antes dos experimentos, LDL nativo (nLDL) foi dialisado de um dia para o outro a 4°C contra 0,9% peso/volume de NaCl. Para obter LDL 20 oxidada (oxLDL) com graus variáveis de oxidação, LDL nativa foi dialisada primeiramente contra solução 0,15 M de NaCl contendo 1 mM de NaNO₃, de um dia para o outro a 4°C. Em seguida, nLDL foi diluído a de 3 a 5 mg/ml, e se adicionou CuSO₄ a uma concentração final 25 μ M e incubado a 37°C. De 25 uma maneira similar, o LDL foi oxidado usando-se FeSO₄ em lugar de CuSO₄. Oxidação com FeSO₄ também foi precedida pela etapa de diálise. Em seguida, LDL foi dialisada contra 5 μ M de FeSO₄ em PBS com mais 150 mM de NaCl e 1 mM de NaNe, pH 7,2. O grau de oxidação é controlada selecionando-se um determinado número de ciclos de reciclagem de tamponador de oxidação. Quanto mais vezes o FeSO₄ no tamponador for

reciclado a cada 10-12 h, tanto maior será o grau de oxidação. Para interromper a oxidação, a amostra de LDL é dialisada contra um tamponador de 150 mM de NaCl, 1 mM de NaN₃, 1 mM de EDTA durante 4 h a 4°C. O grau de oxidação foi seguido de medição de formação de dieno a $\lambda = 234$ nm 5 (Ultrospec 3000 Spectrophotometer (Pharmacia Biotech)). Para interromper a reação de oxidação, LDL foi dialisado contra 0,15 M de NaCl, 1 mM de NaNO₃ e 1 mM de EDTA. Soluções de LDL foram armazenadas a 4°C sob N₂. A presença de conformação de estrutura β cruzada na porção de proteína 10 ApoB de LDL foi analisada usando-se um ensaio de fluorescência de Tioflavina T (ver acima).

Preparação de proteínas dobradas incorretamente usando superfícies desnaturadoras

Para preparar proteínas dobradas incorretamente com exposição a superfícies constituídas de moléculas multiméricas, CpG-ODN 15 (Coley Pharmaceutical Group, MA, E.U.A.) a 21,4 μ g/ml ou lipopolissacarídio (LPS, de sorotipo de *Escherichia coli* 011:B4, 2630, lote 104K4109, Sigma-Aldrich) a 600 μ g/ml foram misturados com 1 mg/ml de lisozima de clara de ovos de galinha (lioofilizada, Fluka, Sigma-Aldrich; número de catálogo 62971), BSA, endostatina e ovalbumina, e incubadas de 20 um dia para o outro a 4°C, ou durante 1 h à temperatura ambiente, em uma banca de rolamento. Para tal fim, proteínas liofilizadas foram dissolvidas em saline tamponada com HEPES (HBS, 10 mM de HEPES, 4 mM de KCl, 137 mM de NaCl, pH 7,2) a uma concentração final de 2 mg/ml, e endostatina a 7,9 mg/ml foram diluídas a 2 mg/ml em HBS. Proteínas foram dissolvidas 25 cuidadosamente em uma banca de rolamento à temperatura ambiente durante 10 min, a 37°C e à temperatura ambiente durante 10 min. As soluções de proteína a 2 mg/ml foram então ultracentrifugadas durante 1 h a 100.000*g antes do uso, e subsequentemente diluídas a 1:1 em HBS com 42,9 μ g/ml de CpG-ODN ou com 1200 μ g/ml de LPS. Avaliou-se a formação de estrutura β

cruzada similar-a-amilóide medindo-se o incremento da fluorescência de Tioflavina T com relação às soluções de proteína de controle em que as superfícies desnaturadoras foram omitidas. Para tal fim, proteínas foram diluídas a 25 µg/ml e incubadas com tamponador de ensaio ou com 25 µM de 5 Tioflavina T em tamponador de ensaio (ver acima para detalhes de ensaio).

Alternativamente, proteínas dobradas incorretamente são obtidas após exposição de proteínas a moléculas desnaturadoras, como (fosfo)lipídios (carrgados negativamente), como fosfatidil serina e cardiolipina, sulfato de dextrano (500.000 Da), alumínio, ácido elágico, vidro ou 10 caulim. Estas proteínas dobradas incorretamente são incluídas em testes conduzidos para revelar o mecanismo de trabalho da ação da IgIV.

Ensaio imunossorvente ligado a enzima para teste de ligação de IgIV a proteínas dobradas incorretamente

A ligação de IgIV ou de imunoglobulinas em plasma combinado normal foi determinada usando-se uma montagem de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Para este fim, 50 µl/poço de ligantes potenciais em concentrações indicadas ou tamponador de revestimento apenas para fins de medição de controle e de fundo, foram revestidos de um dia para o outro a 4°C, com movimento, em 50 mM de 15 NaHCO₃ pH 9,6. Albumina glicosada e Hb (BSA-AGE e Hb-AGE), BSA de controle e Hb de controle foram revestidos a 5 µg/ml. AB e FP13 foram revestidos a 25 µg/ml. Os controles de BSA e Hb foram preparados recentemente por meio de dissolução das proteínas liofilizadas a 1 mg/ml em 20 PBS quando da ressuspensão por meio de pipetagem, seguido de um período de 30 minutos na banca de rolamento, à temperatura ambiente. As soluções de proteína foram centrifugadas durante 10 minutos a 16.000*g e diluídas em tamponador de revestimento. Controles de revestimento foram realizados com anticorpo anti-proteína glicosada, anticorpo anti-albumina, anticorpo anti-Hb 25 e anticorpo anti-AB. FP13 não foi reconhecido por um anticorpo anti-

fibrinogênio policlonal. Os anticorpos de Ig anti-humana conjugados com fosfatase alcalina foram controlados por meio de revestimento das IgIV's e sobrepondo-se os mesmos com os anticorpos secundários. Após o revestimento, as placas foram lavadas duas vezes com 50 mM de Tris-HCl pH 5 7,3, 150 mM de NaCl, 0,1% v/v de Tween20, e bloqueadas com 175 µl/poço de reagente de bloqueio (Roche Diagnostics, Almere, Países Baixos; número de catálogo 11112589001), durante 1 h à temperatura ambiente, com movimento. Placas foram lavadas duas vezes e incubadas em triplicata com 10 séries de diluição de anticorpos indicados, séries de diluição de plasma ou controles, incluindo tamponador de ligação apenas, na ausência ou presença de inibidores putativos, em tamponador de ligação; PBS/0,1% v/v de Tween20, a 50 µl/poço, durante 1 h à temperatura ambiente, com movimento constante. Após quatro ciclos de lavagem, adicionou-se anticorpos secundários nos poços, a 50 µl/poço, durante 45 minutos à temperatura 15 ambiente, com movimento. Usou-se RAMPO e SWARPO a uma diluição de 2000 vezes, anticorpos de IgG anti-humanos de cabra foram diluídos 3000 vezes, anticorpos de IgM anti-humanos de cabra foram diluídos 1000 vezes. Após 5 lavagens com tamponador de lavagem, seguido de duas lavagens com PBS, avaliou-se a ligação de anticorpos. Para anticorpos secundários 20 conjugados com fosfatase alcalina, usou-se fosfato de p-nitrofenila (600 µg/ml) em tamponador de DEA pH 9,8 (10% v/v de dietanolamina em H₂O, com 240 µM de MgCl₂, 6H₂O, pH ajustado com HCl), a 100 µl/poço, durante ~5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µl/poço de 2,4 M de NaOH em H₂O. Após 5 minutos efetuou-se a leitura da absorbância a 405 nm. 25 Para SWARPO e RAMPO conjugado com peroxidase, usou-se OPD (1,3 mg/ml) em 50 mM de ácido cítrico/100 mM de Na₂HPO₄/0,06% v/v de H₂O₂ pH 5, à base de 100 µl/poço, durante ~5 minutos. A reação foi interrompida por meio de adição de 50 µl/poço de 2 M de H₂SO₄ em H₂O. Após 5', a absorbância foi lida a 490 nm. Cada experimento foi realizado pelo menos

duas vezes. Para testar se os compostos de ligação de estrutura β cruzada similar a amilóide, e controles (ver ref. (Bouma *et al.*, 2003) e pedido de patente P57716EP00) interferem com a ligação de IgIV aos ligantes de estrutura β cruzada, séries de concentrações dos inibidores em potencial 5 foram testadas na presença de uma concentração de IgIV sub-ótima. Para tal fim usou-se soluções de consumo de tPA, K2P tPA, vermelho Congo, Tioflavina S (ThS) e Tioflavina T (ThT) foram de 3,7 mg/ml, 1,1 mg/ml, 10 mM, 10 mM e 10 mM, respectivamente. A influencia de tPA e K2P tPA foi testadas na presença de 10 mM de ácido ϵ -amino capróico, para evitar a 10 ligação do domínio kringle2 de tPA e K2P tPA a radicais lisina e arginina (ligação de tPA estruturas similares a amilóide é mediada por seu domínio de dedo [*finger*], que não apresenta K2P tPA truncado; o domínio kringle2 liga-se as cadeias laterais expostas de lisinas e argininas). O tamponador de ligação de K2P tPA servem como controles negativos nestes estudos de 15 inibição. Separadamente, realizou-se estudos de inibição similares com A β imobilizado ou BSA-AGE, uma concentração sub-ótima de tPA (ver ref. (Bouma *et al.*, 2003; Kranenburg *et al.*, 2002)) e séries de concentrações de vermelho Congo ou ThT. A redução dos dados foi realizada como a seguir. Calculou-se as médias de triplicatas e os desvios-padrão. Sinais de fundo 20 obtidos com poços revestidos com tamponador foram subtraídos (ligação de anticorpo primário a poços vazios), e também como sinais de fundo obtidos de poços em que os anticorpos primários foram omitidos (ligação de anticorpo secundário a ligantes revestidos).

Em uma série separada de experimentos, peptídeo de príon de 25 levedura NH₂-GNNQQNY-COOH (SEQ-ID 5) foi revestido sobre as placas de ELISA a uma concentração de 25 μ g/ml. Usou-se as soluções de consumo de 1 mg/ml que foram incubadas a 4°C durante 73 h. Em poços de controle, revestiu-se 5 μ g/ml de Hb-AGE ou tamponador de revestimento. A ligação de uma série de diluições de IgIV (I) foi analisada e comparada com a ligação de

séries de concentrações de tPA e K2P tPA. Adicionalmente, uma mistura de cinco anticorpos monoclonais que apresentam afinidade por proteínas dobrada incorretamente s, também foi testada quanto à ligação com os ligantes imobilizados (ver abaixo para detalhes monoclonais). Para este fim, preparou-se em PBS uma mistura compreendendo 336 µg/ml de cada um dos cinco anticorpos, resultando em uma solução de consumo de 1,83 mg/ml de anticorpo total.

Preparação anticorpos anti-proteínas dobradas incorretamente monoclonais murinos

As imunizações foram realizadas pela instalação ABC-Hybridoma (P. van Kooten & M. Smits, Utrecht University, Países Baixos). Um camundongo (Balb/c) foi imunizado com 100 µg de AB em 100 µl de H₂O e 100 µl de adjuvante de Freund completo. Após três semanas, realizou-se um primeiro reforço de 50 µg de Aβ em H₂O-Specol (ID-DLO, Lelystad, Países Baixos), seguido de um segundo reforço 30 dias após o primeiro reforço. Trinta e seis e 37 dias após o segundo reforço, o camundongo recebeu dois reforços adicionais com 50 µg de Aβ em PBS (intravenosamente). Entre aproximadamente a semana 44 e a semana 48 após o início da imunização com AB, o camundongo adoeceu, mas recuperou-se. Quarenta e nove semanas mais tarde, o mouse foi imunizado com 50 µg de amilóide A de soro de frango recombinante em H₂O-Specol. Este antígeno foi um presente gentil do Dr H. Toussaint (Dept. of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Países Baixos). Quatro semanas mais tarde, o camundongo foi imunizado com 50 µg de Hb-AGE. Finalmente, 31 e 32 dias mais tarde, o camundongo recebeu reforços duas vezes intravenosamente com 50 µg de FP6 (SEQ-ID 6) em PBS. Três dias após o reforço final, o camundongo foi sacrificado e o baço foi usado para preparar hibridomas. O meio de fusão foi enriquecido com PEG4000 (Merck, número de catálogo 9727). O baço compreendia um número excepcionalmente alto de células, i.e.

7*10⁸ células, com uma abundância relativamente alta de fibroblastos infiltrados. 2*10⁸ células foram misturadas com 4*10⁷ de Sp2/0 células de plasmacitoma para a fusão. Após a fusão, usou-se meio de cultura de hibridoma seletivo consistindo de OptiMEM I com 10% de Fetalclonel (Hyclone), 4 µM de Aminopterina e 1% de Glutamax I. Após um tempo de incubação para permitir a fusão das células B de baço e as células de plasmacitoma, células foram transferidas à base de 1 célula por poço para placas de 96 poços, usando-se um aparelho FacsVantage com programa Accudrop. Após0 aproximadamente duas semanas, hibridomas foram 10 selecionados quanto à produção putativa de anticorpos anti-estrutura β cruzada. Primeiramente, 768 clones em placas de 96 poços foram selecionados quanto à presença de anticorpos que se ligam a γ -globulinas amilóides e amilóides FP13 K157G imobilizados. Para tal fim, FP 13 K157G e γ -globulinas amilóides foram diluídas em conjunto em H₂O a 5 µg ml⁻¹ de 15 cada polipeptídeo. Placas ELISA de alta ligação Microlon (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemanha) foram enchidas com 50 µl desta solução e secadas ao ar de um dia para o outro a 37°C. Placas foram bloqueadas com reagente de bloqueio (nº de catálogo 11112589001, Roche Applied Science, Basel, Suiça) e lavadas com água potável. Cem µl de sobrenadantes de cultura 20 de células de hibridoma contendo 10% v/v de soro de bezerro fetal foram transferidas para as placas revestidas, e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente (RT) enquanto se agitava. Placas foram lavadas com solução salina tamponada com Tris pH 7,3 (TBS, 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl) com 0,1% de Tween-20 (tamponador de lavagem), e subsequentemente 25 sobrepostas com imunoglobulinas anti-mouse de coelho acopladas com peroxidase diluídas 2000x (RAMPO, 0260, DAKO, Dinamarca) em PBS/0,1% de Tween-20, durante 30 minutos à temperatura ambiente enquanto se agitava. Após lavagem extensiva, RAMPO ligado foi visualizado com tetrametilbenzidina (TMB, 5.01.20, /5,014,01, Biosource, Nivelles,

Bélgica). A reação foi interrompida após 5 minutos com 1% de H₂SO₄ em H₂O. Placas foram lidas a 450 nm. Clones foram incluídos em ensaios de seleção adicionais quando sinais atingiram níveis de fundo de pelo menos 1,5x. Novamente, a presença de anticorpos anti-estrutura β cruzada putativos 5 foi analisada com γ -globulinas amilóides e FP13 K157G imobilizados. Então, 35 clones permaneceram positivos. Estes clones foram transferidos para frascos de cultura de células e submetidos a análises adicionais. Para tal fim, novamente FP13 K157G e γ -globulinas amilóides, agora separadamente, e também A β e Hb-AGE foram imobilizados sobre placas ELISA. 10 Adicionalmente, A β recentemente dissolvido, FP13 K157G, Hb e γ -globulinas foram revestidos sobre placas Immobilizer (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). Estes controles recentemente dissolvidos foram revestidos a 20, 12,5, 50 e 50 μ g ml⁻¹, respectivamente, em PBS, durante 1 h à temperatura ambiente enquanto se agitava. Soluções de consumo de A β , FP 13 K157G, 15 Hb e γ -globulinas de 20, 12,5, 50 e 50 μ g ml⁻¹, respectivamente, foram centrifugadas primeiramente durante 30 min. a 238*10³xg para remover agregados insolúveis que poderiam estar presentes. Tamponador foi revestido sobre placas Greiner (H₂O) e sobre placas Exiqon (PBS) como controle negativo adicional. Placas Greiner não foram bloqueadas durante seleções 20 iniciais com 768 clones. Dez% de FCS no meio de cultura de células é um bloqueador eficiente durante a incubação de sobrenadante de células nas placas ELISA. Dez μ l de PBS/1% de Tween-20 foram adicionados nos poços das placas Exiqon, antes de se adicionar sobrenadantes de células. Tween-20 a uma concentração de 0,1% é um bloqueador instantâneo efetivo para placas 25 Immobilizer. Cem μ l dos sobrenadantes de hibridoma foram transferidos para as placas. Usou-se meio de cultura como controle negativo. Sinais foram calculados como múltiplos dos sinais obtidos com meio de cultura fresco com 10% de FCS incubado nos diversos controles e antígenos imobilizados. Sinais foram considerados positivos quando excedendo 2,0x os valores de fundo

obtidos com meio de cultura fresco. Seleção subsequente de 21 de 35 clones foi realizada em placas Greiner, preparadas como descrito acima. Agora as placas foram bloqueadas primeiramente com reagente de bloqueio e lavadas. Cinquenta μ l de cada clone de hibridoma foram testados em duplicata quanto à presença de anticorpos independentes de seqüência, porém específicos para estrutura, meio de cultura fresco foi testado em quadruplicata como controle. Dois dos 21 clones originais, seis foram selecionados quanto a subclonagem adicional de células simples para obter hibridomas monoclonais. Os seis clones foram semeados à base de uma célula por poço da placa de cultura de 96 poços e cultivados em meio enriquecido com 10% v/v de FCS. Todos os clones foram testados quanto à ligação com dois amilóides revestidos. Para cada um dos seis clones, identificou-se cinco sub-clones que se ligaram aos dois amilóides, para cultivo subsequente em frascos de cultura de 25 cm^2 . A isotipificação dos trinta subclones, usando anticorpos específicos para isótipo marcados fluorescentemente havia sido realizada na instalação da ABC-Hybridoma (M. Smits) de acordo com as recomendações do fabricante (Luminex, Austin, TX, E.U.A.). Os anticorpos foram purificados de meio de cultura de células usando-se tecnologia convencional de purificação cromatográfica. Amostras foram submetidas a cromatografia tiofílica usando-se matriz de gel AFFI-T (KemEnTEC, Biozym, Landgraaf, Países Baixos) em uma coluna Econo (Biorad, Veenendaal, Países Baixos). Anticorpos purificados foram armazenados a -20°C em PBS.

Para se obter anticorpos monoclonais, um camundongo foi imunizado seqüencialmente com amilóide humano $\text{A}\beta(1-40)$ E22Q, amilóide A de soro de frango recombinante e hemoglobina humana glicada com propriedades similares a amilóide, seguido de um reforço final com peptídeo de fibrina humana amilóide FP6. Formaram-se hibridomas e seus sobrenadantes de cultura de células foram selecionados quanto à presença de anticorpos que reconhecem especificamente um epítopo que só é reconhecido

quando a conformação de estrutura β cruzada está presente em qualquer polipeptídeo com uma composição de aminoácidos que não é relacionada com antígenos usados para imunização. De 768 clones, selecionou-se seis clones, 5 sel 2E2, 4F4, 7H1, 7H2, 7H9 e 8F2, para uma faixa mais ampla de agregados similares a amilóide, diferentes dos antígenos usados para a imunização. Após vários ciclos de seleção e subclonagem, finalmente os cinco anticorpos monoclonais a seguir apresentaram ligação consistente com proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada: 10 2E2B3D12, 7H2H2, 7H1C6A7, 7H9B9, 8F2G7H7. O clone 7H2H2 liga-se especificamente apenas a várias formas dobradas incorretamente de imunoglobulinas, que nos deixam tipificar este clone como um 'anticorpo similar a fator de reumatismo'. Preparou-se uma mistura dos cinco anticorpos monoclonais listados, em que as concentrações finais dos anticorpos individuais foram de 1,5, 0,37, 0,4, 0,45 e 0,47 mg/ml para 2E2B3D12, 7H2 15 H2, 7H1C6A7, 7H9B9 e 8F2G7H7, respectivamente, dando uma concentração de anticorpos global de 3,2 mg/ml. Alternativamente, todos os anticorpos foram diluídos em PBS a 1,83 mg/ml e combinados a 1:1:1:1:1 resultando em uma concentração total de anticorpos de 1,83 mg/ml com 336 μ g/ml dos anticorpos individuais. Estas misturas de anticorpos anti-proteína 20 dobrada incorretamente murinos foram usados como soluções de consumo para ensaios adicionais de agregação de plaquetas do sangue (ver Exemplo).

Agregação de plaquetas

A influência da IgIV sobre a agregação de plaquetas do sangue induzida por agregados de Hb glicada dobrada incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide foi testada com plaquetas lavadas em um ensaio agregométrico. Sangue humano isento de aspirina, recentemente colhido, foi misturado cuidadosamente com tamponador de citrato para evitar coagulação. O sangue foi centrifugado durante 15 minutos a 150*g a 20°C e coletou-se o sobrenadante; Plasma rico 25

em plaquetas (PRP, *platelet rich plasma*). Tamponador com 2,5% de citrato trissódico, 1,5% de ácido cítrico e 2% de glucose, pH 6,5, foi adicionado a uma relação volumétrica final de 1:10 (tamponador-PRP). Após deposição de plaquetas mediante centrifugação durante 15 minutos a 330*g a 20°C, o pellet 5 foi ressuspenso em tamponador HEPES-Tyrode pH 6,5. Adicionou-se prostaciclina a uma concentração final de 10 ng/ml, e a solução foi centrifugada durante 15 minutos a 330*g a 20°C, com uma frenagem suave. O pellet foi ressuspenso em tamponador HEPES-Tyrode pH 7,2 de uma forma que o número final de plaquetas foi ajustado em 200.000-250.000 10 plaquetas/μl. Plaquetas foram mantidas a 37°C durante pelo menos 30 minutos, antes do uso nos ensaios, para assegurar que se encontravam no estado de descanso. Plaquetas de cinco doadores foram isoladas separadamente em três dias diferentes (2, 2, 1).

Para os ensaios agregométricos adicionou-se solução de 270, 15 280 ou 300 μl de plaquetas em um tubo de vidro e pré-aquecido a 37°C. Adicionou-se um ímã de agitação e ajustou-se a rotação em 900 rpm, e o aparelho (agregômetro de sangue integral, Chrono-log, Havertown, PA, E.U.A.) foi neutralizado. Adicionou-se um volume final de 30, 30 ou 33,3 μl, 20 contendo o agonista de interesse e/ou o antagonista de interesse pré-misturado, pré-diluído em tamponador HEPES-Tyrode pH 7,2. A agregação foi acompanhada ao longo do tempo medindo-se a absorbância da solução, que diminuirá ao longo do tempo durante a agregação de plaquetas. Como um controle positivo, usou-se 10 μg/ml de colágeno (Kollagenreagens Horm, NYCOMED Pharma GmbH, Linz, Áustria; lote 502940), ou 5 μM de 25 peptídeo ativador de receptor de trombina sintética TRAP (NH₂-SFLLRN-COOH, SEQ-ID 7). A agregação foi registrada durante 15 minutos e expressa como o percentual da luz transmitida (de 0 a 100%).

Preparação de uma matriz de afinidade de estrutura β cruzada para capturar proteínas que se ligam a proteínas dobrada incorretamente s

Para poder investigar adicionalmente se um subconjunto das Ig's na IgIV se liga a proteínas dobrada incorretamente s, nós preparamos uma matriz de afinidade com proteína dobrada incorretamente ligada. Para tal fim, nós acoplamos Hb glicada a CNBr- Sepharose (GE Healthcare-Amersham, 5 Roosendaal, Países Baixos) de acordo com as recomendações do fabricante. Para acoplamento de um dia para o outro a 4°C em uma banca de rolamento, 250 µg de pérolas aspiradas, lavadas com HCl e tamponador de acoplamento (peso seco) foram incubados apenas com 125 µl de tamponador de acoplamento (pérolas de controle) (100 mM de NaHCO₃, pH 8,3, 500 mM de 10 NaCl) ou com tamponador de acoplamento com 3,33 mg/ml de Hb-AGE. Após lavagem extensiva, nós determinamos se Hb-AGE estava acoplado à Sepharose e se a matriz de afinidade preparada foi efetivamente capaz de capturar proteínas que apresentam afinidade por proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada. A eficiência de 15 acoplamento foi determinada comparando-se a concentração do material de partida de Hb-AGE com o sobrenadante de Hb-AGE após a reação de acoplamento. Preparou-se séries de diluição em manchador de proteína ADV01 (Cytoskeleton) e a absorbância foi lida a 590 nm. Comparação dos sinais de absorbância revelaram que 50% do Hb-AGE foram ligados à 20 Sepharose, i.e. aproximadamente 200 µg de Hb-AGE a 250 µg de pérolas (peso seco).

Previamente, nós estabelecemos que o ativador de plasminogênio de tipo tissular é uma enzima com afinidade por proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada, 25 incluindo proteínas glicadas (Bouma *et al.*, 2003; Kranenburg *et al.*, 2002). Para testar a capacidade da matriz de afinidade Hb-AGE de ligar-se a tPA, 20 µl de uma suspensão a 1:1 de Hb-AGE Sepharose ou Sepharose de controle em HBS foram incubados com 6 µM de tPA (concentração otimizada após testes em uma série de concentrações de 0 de 10 µM) por meio de incubação

de um dia para o outro a 4°C em uma banca de rolamento, em duplicatas. Após 2 minutos de centrifugação a 8.000*g e descartando-se o sobrenadante, pérolas foram lavadas cinco vezes com HBS. tPA ligado foi eluído incubando-se a matriz durante 1 h à temperatura ambiente com 20 µl de tamponador de eluição (10 mM de HEPES pH 7,4, 1140 mM de NaCl, 10 mM de ácido ϵ -amino capróico, 4,5 mM de CaCl₂, 0,005% de Tween20). O eluado foi analisado quanto ao teor de tPA e isto foi comparado com o teor de tPA da mistura de incubação antes e após o contato da Hb-AGE Sepharose ou Sepharose de controle. Determinou-se concentrações relativas de tPA usando um substrato cromogênico de tPA S2765 (Chromogenix, Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Itália). Para tal fim, de 1 a 5 µl de amostras de testador (soluções de partida de tPA, sobrenadante após contato da Hb-AGE Sepharose, eluado após incubação de Hb-AGE Sepharose com tamponador de eluição) foram misturados com 10 µl de S2765 5 mM e 5 µl de uma solução de consumo de 10 vezes HBS, e isto foi ajustado com H₂O a um volume final de 50 µl. A conversão do substrato por meio de tPA, de um agente incolor a uma substância amarela, foi registrada ao longo do tempo, em um leitor de absorbância de placas cinética de 96 poços, a 37°C.

Em seguida, 120 µl ou 20 µl da matriz de afinidade de Hb-AGE Sepharose ou 120 µl ou 20 µl da Sepharose de controle sem proteína acoplada foram incubados com 200 µl da solução de consumo de IgIV a 50 mg/ml (Octagam) (4 h à temperatura ambiente). Em seguida determinou-se a concentração da IgIV restante em solução e a quantidade de IgIV ligada à matriz após lavagem extensiva com tamponador de incubação. Determinou-se as concentrações de proteína medindo-se a absorbância a 280 nm, usando uma série de diluição padrão de IgIV, e comparando-se a absorbância a 590 nm de amostras de IgIV após manchamento com ADV01 (Cytoskeleton), com manchamento de uma série de diluição padrão de IgIV. IgIV ligado a Sepharose Hb-AGE ou a Sepharose de controle foi lavado seis vezes com

aproximadamente dois volumes de HBS (tamponador de ligação). Em seguida, IgIV ligada foi eluída com 200 µl de HBS com 1 M de NaCl e 10 mM de ácido ϵ -amino capróico (30 minutos à temperatura ambiente, com agitação). A ligação a Hb-AGE imobilizada em uma placa de ELISA foi analisada com séries de diluições de IgIV não-tratada, IgIV após contato de Hb-AGE — Sepharose, IgIV após contato com Sepharose de controle, IgIV eluída de Hb-AGE — Sepharose, IgIV eluída de Sepharose de controle. Para tal fim, 5 µg/ml de Hb-AGE ou de BSA desnaturado com calor foram revestidos durante 1 h à temperatura ambiente, com agitação (placa de alta ligação Greiner Microlon). Placas foram bloqueadas com Reagente de Bloqueio (Eoche). A liqüefação de séries de diluição das preparações de IgIV foi avaliada como descrito acima. A quantidade relativa de IgIV em IgIV eluída de Hb-AGE - Sepharose e em IgIV eluída de Sepharose de controle foi calculada com relação ao estoque de IgIV. Para tal fim preparou-se uma curva-padrão de uma série de diluição de IgIV ligada a Hb-AGE ou ligado a BSA desnaturada com calor. O enriquecimento da IgIV eluída de Hb-AGE — Sepharose com relação à ligação com revestimento de Hb-AGE foi avaliado usando-se IgIV que foi incubada com 120 µl de Sepharose. O enriquecimento com relação à ligação com BSA desnaturada com calor foi avaliado com IgIV incubada com 20 µl de Sepharose.

Manchamento imuno-histoquímico de seções de cérebro de pacientes com doença de Creutzfeldt-Jakob já falecidos, com IgIV e uma mistura de anticorpos anti-proteína dobrada incorretamente monoclonais.

Para manchamentos imuno-histoquímicos de seções de cérebro de pacientes de doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) já falecidos, com CJD esporádica ou CJD variante nova, preparou-se seções de parafina (Dept. of Pathology, University Medical Center Utrecht, Países Baixos). As seções foram submetidas a um procedimento de manchamento padrão compreendendo as seguintes etapas: 1. seções fixas foram bloqueadas com

tamponador de bloqueio, 2. incubadas com IgIV ou anticorpos monoclonais com afinidade por proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada, diluídas em tamponador de ligação, 3. lavadas, 4. incubadas com um anticorpo de IgG anti-humano e anticorpos IgG/IgM anti-5 murinos, respectivamente, 5. lavadas, 6. incubadas com Powervision, 7. lavadas, 8. manchadas com DAB, e 9. encerradas e montadas, decontaminadas por meio de um tratamento com ácido, antes da análise 10 microscópica e classificação. O procedimento foi realizado por pessoal qualificado no laboratório de categoria III autorizado, equipado para trabalho 15 com materiais contaminados com TSE, localizado na UMC Utrecht, Países Baixos). Como controle, seções foram incubadas consecutivamente com tPA, um anticorpo anti-tPA monoclonal murino e Powervision, seguido de manchamento com DAB. Como um controle para o procedimento de manchamento, seções de cérebro de um paciente de doença de Alzheimer já 15 falecido também foram incubadas com IgIV ou tPA, de acordo com o mesmo procedimento indicado acima.

Resultados e discussão

Exemplo 1: IgIV (anticorpos de IgG de imunoglobulina humana) liga-se 20 a proteínas dobradas incorretamente compreendendo conformação de estrutura β cruzada

Modificação não-enzimática de proteínas por carboidratos, um processo denominado glicação induz dobramento incorreto de proteína 25 acompanhado de formação de estrutura β cruzada amilóide (Bouma *et al.*, 2003). A ligação de IgIV a proteínas glicosadas imobilizadas Hb-AGE e BSA-AGE e não-glicosadas Hb e BSA foi estabelecida usando-se uma montagem ELISA (Figura 1A-C). A ligação de IgIV foi detectada usando-se anticorpos de IgM ou IgG anti-humanos marcados com fosfatase alcalina. Ambas, IgIV (I) e IgIV (II), ligadas com alta afinidade a proteínas glicadas 250 compreendendo estrutura β cruzada, enquanto que elas se ligam fracamente a

albumina nativa imobilizada e hemoglobina nativa (Figura IA-C). A afinidade de IgIV (I) por proteína imobilizada foi maior do que de IgIV (II). A afinidade de IgIV (I) por Hb-AGE foi maior do que por BSA-AGE. Dependendo da preparação de albumina ou hemoglobina, uma quantidade 5 ligeiramente variante de IgIV ligada a estas proteínas 'nativas', o mais provavelmente devido a quantidades variáveis de moléculas com uma conformação não-nativa, expondo o sítio de ligação a anticorpos de IgIV com afinidade por proteínas dobrada incorretamente s. Ativador de plasminogênio de tipo tissular é uma serina protease contendo um módulo, denominado o 10 domínio de dedo [*finger*], que interage especificamente com proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada (Kranenburg *et al.*, 2002; Gebbink *et al.*, 2005). A ligação de IgIV (I) na concentração sub-ótima de 15 μ g/ml a proteínas glicosadas revestidas é diminuída efetivamente 15 com uma série de concentrações de tPA, enquanto que K2P tPA truncada não tem influência sobre a ligação de IgIV (I) (Figura ID). É de conhecimento geral que tPA se liga com afinidade relativamente elevada (kD de aproximadamente 500 pM) a proteínas glicadas e, com uma afinidade um tanto menor, a muitas outras proteínas dobradas incorretamente com com uma conformação de proteína similar a amilóide compreendendo estrutura β 20 cruzada, o mais provavelmente via seu domínio de fibronectina de tipo I, que falta em K2P tPA. De maneira similar a tPA, também o corante vermelho Congo específico para amilóide bloqueia efetivamente a ligação de 15 μ g/ml de IgIV (I) à proteína glicada revestida (Figura 4A).

Para avaliar se a IgIV possui especificidade de faixa ampla 25 por quaisquer proteínas dobrada incorretamente s, sem limitações à seqüência de aminoácidos da proteína com estrutura β cruzada, MSA desnaturada com calor, ovalbumina, e glucagônio foram analisados quanto à ligação de IgIV, e também como ovalbumina oxidada, glucagônio, hemoglobina e LDL, e as contrapartes de controle não-oxidadas e não-desnaturadas com calor. Para tal

fim, todas as proteínas foram immobilizadas sobre uma placa de alta ligação Greiner microlon a uma concentração de 25 µg/ml em 50 mM de NaHCO₃ (glucagônio: 12,5 µg/ml), e recoberta com uma série de concentrações de IgIV (I), 0/1/3/9/27/81/243/729 µg/ml em PBS/0,1% v/v Tween20.

5 Em conclusão, estes resultados demonstram que IgIV liga-se a proteínas dobradas incorretamente immobilizadas que compreendem conformação de estrutura β cruzada. Para substanciar adicionalmente estas verificações, avalia-se a ligação a uma série de proteínas dobrada incorretamente s. Por exemplo, avalia-se a ligação de IgIV a proteínas oxidadas, proteínas desnaturadas com calor, proteínas desnaturadas mediante exposição a superfícies (biocompatíveis), p. ex. em dispositivos de circulação fora do corpo, a proteínas dobradas incorretamente relacionadas com doença (p. ex. amilóide-β (doença de Alzheimer); 62-microglobulina (diálise)).

10

15 Exemplo 2: A agregação de plaquetas do sangue é induzida por proteína dobrada incorretamente similar a amilóide e é inibida por anticorpos monoclonais murinos e de IgIV humana

20 Plaquetas isoladas de sangue citrado recentemente coletado de voluntários humanos aparentemente saudáveis agregam-se facilmente quando expostas a proteínas glicadas dobrada incorretamente s, como mostrado para plaquetas de três indivíduos diferentes (doador 'A', 'B', 'C') com Hb-AGE (Figura 2). Quando a proteína dobrada incorretamente Hb-AGE ou BSA-AGE é pré-incubada com IgIV (I) (Figura 2A, C) ou com uma mistura de cinco anticorpos monoclonais (2E2B3D12, 7H2H2, 7H1C6A7, 7H9B9, 8F2G7H7) com afinidade por proteínas dobradas incorretamente compreendendo conformação de estrutura β cruzada (Figura 2E, F), inibe-se a agregação de plaquetas. A indução de agregação de plaquetas por colágeno ou TRAP quase não é influenciada por IgIV (I) ou anticorpos monoclonais mistos (Figura 2B, D), indicando que os anticorpos monoclonais inibem especificamente os efeitos mediados por proteínas compreendendo estrutura β cruzada.

25

Em uma série separada de experimentos usando plaquetas de doadores humanos D e E, a agregação de plaquetas foi induzida com 50 µg/ml de A β (Figura 3). A influência de 2,5 mg/ml de IgIV (I) ou da mistura de anticorpos monoclonais sobre a agregação induzida com amilóide foi avaliada 5 (Figura 3). Tanto IgIV (I) e também a mistura monoclonal inibem agregação de plaquetas induzida com amilóide com plaquetas de dois doadores diferentes (D e E). Doador D apresenta um% de agregação final que é maior do que no caso do doador E mediante estimulação com A β . No caso de ambos os doadores, IgIV (I) retarda o início da agregação de plaquetas em 10 aproximadamente 2 minutos. Plaquetas do doador D que são incubadas tanto com A β como também com IgIV agregam-se finalmente em um grau similar quando comparado com incubação com A β . Com plaquetas do doador E, a adição de IgIV a A β resulta em uma inibição mais forte de agregação de plaquetas. Aplicou-se 4 µM de TRAP como um controle positivo. Em 15 experimentos de controle, a influência de IgIV ou de anticorpos monoclonais sobre a ativação de TRAP de plaquetas foi analisada por meio de pré-incubação do estoque de TRAP com a mistura de anticorpos monoclonais. Estes experimentos de agregação mostraram que a IgIV ou os anticorpos monoclonais não influenciam a agregação induzida com TRAP (não 20 mostrado).

Estes resultados mostram que a IgIV humana contém anticorpos que inibem a agregação de plaquetas induzida por proteínas glicadas e A β compreendendo estrutura β cruzada. A mistura de anticorpos anti-proteína dobrada incorretamente monoclonais apresenta uma atividade inibidora similar que é indicativa da presença de anticorpos anti-proteína dobrada incorretamente na solução terapêutica de IgIV humana. Uma ampla variedade de proteínas dobradas incorretamente está sendo testada agora quanto a sua capacidade de induzir agregação de plaquetas. Subsequentemente, avalia-se a influência da IgIV humana ou anticorpos anti-

proteína dobrada incorretamente murina para substanciar as presentes verificações. Proteínas dobradas incorretamente usadas para induzir a agregação de plaquetas são, embora sem limitação, proteínas oxidadas, proteínas desnaturadas (com calor), proteínas glicadas, proteínas expostas a superfícies desnaturadoras ou a moléculas desnaturadoras, p. ex. CpG-ODN, lipopolissacarídos, sulfato de dextrano, caulim, vidro, lipídeos, ou peptídeos amilóides, p. ex. FP6, amilóide- β , FP13.

Exemplo 3: Potencialização de ligação de IgIV e tPA a proteína dobrada incorretamente , por Tioflavina T e Tioflavina S

Dois corantes específicos para amilóide, Tioflavina T e Tioflavina S, inibem a interação de proteína glicada - IgIV até certo grau, em concentrações de corante relativamente baixas, enquanto que, em concentrações de corante relativamente elevadas, ambos os corantes parecem facilitar a ligação de IgIV a proteína dobrada incorretamente imobilizada (Figura 4B, C). Isto é explicado pelo fato de que a ligação de um corante específico para amilóide a uma proteína dobrada incorretamente facilita a subsequente ligação de uma proteína com afinidade por ligação a proteínas dobrada incorretamente s. A ligação de Tioflavina T e Tioflavina S estabiliza as moléculas circundantes ou parte das moléculas com uma conformação de estrutura β cruzada em um estado relativamente fixo que representa um sítio de ligação para IgIV. Em concentrações baixas de corante, estas forças ainda são muito fracas para provocar fixação em um sítio de ligação de IgIV mais uniforme expondo estrutura β cruzada. Agora, a ligação de corante compete diretamente pelos sítios de ligação de IgIV. A concentrações mais altas de corante, moléculas de corante ligadas exercem suas forças estabilizadoras sobre a estrutura β cruzada circundante, de maneira concertada, criando com isso sítios de ligação facilmente acessíveis para IgIV. Efeitos similares de vermelho Congo e Tioflavina T são observados quando se considera a ligação de uma concentração sub-ótima de tPA para imobilizar BSA-AGE ou $A\beta$

(Figura 4D-G). A observação de que a ligação de uma molécula específica para amilóide a estrutura β cruzada em determinadas condições facilita a ligação de outra molécula com especificidade por proteínas dobrada incorretamente s, é usada para aperfeiçoar a eficácia de drogas, como 5 anticorpos, e para tratar doenças de dobramento incorreto de proteínas, como amiloidose.

Exemplo 4: Matriz de afinidade de Sepharose-proteína dobrada incorretamente para proteínas de ligação com afinidade por ligantes com uma conformação de estrutura β cruzada similar a amilóide

10 A imobilização de hemoglobina extensivamente glicada com glucose-6-fosfato, Hb-AGE, na matriz de CNBr-Sepharose resultou em uma matriz de afinidade eficiente para capturar tPA da solução (Figura 5). É de conhecimento geral que tPA se liga especificamente à proteína dobrada incorretamente matriz de afinidade (Figura 5A). Isto é descrito 15 adicionalmente analisando-se o teor de tPA do tamponador de lavagem após incubação deste tamponador com matriz de afinidade de Sepharose proteína dobrada incorretamente Hb-AGE incubada com tPA ou matriz de controle incubada com tPA sem proteína acoplada (Figura 5B). Quase nenhuma atividade de serina protease de tPA é recuperada no tamponador de lavagem 20 após lavagem de Hb-AGE Sepharose, e observa-se alguma atividade de tPA no tamponador de lavagem após a lavagem de pérolas de controle incubadas com tPA. Após incubação de matriz de afinidade incubada com tPA e matriz de controle com tamponador de eluição, análise da recuperação da atividade de tPA no tamponador de eluição mostra que a Hb-AGE Sepharose é uma 25 matriz de afinidade eficiente e seletiva para tPA (Figura 5C).

Em uma série seguinte de experimentos, a matriz de afinidade de Hb-AGE Sepharose para proteínas que se ligam a proteínas dobrada incorretamente s, foi usada para capturar a fração de IgIV que se liga especificamente a proteínas dobrada incorretamente s. IgIV que se ligou

especificamente a Hb-AGE — Sepharose foi testadas quanto à ligação com Hb-AGE imobilizada e BSA desnaturada com calor, em um ELISA. Em primeiro lugar, preparou-se uma curva padrão de uma série de diluições do estoque de IgIV usando-se manchador de proteína ADV01 (Figura 5D).

- 5 Determinou-se concentrações de IgIV após contactar a matriz de afinidade e após eluição de proteína ligada da matriz de afinidade usando-se a curva padrão de IgIV. De uma maneira similar, preparou-se curvas padrão para a ligação de séries de diluições de estoque de IgIV a Hb-AGE imobilizada ou BSA desnaturada com calor (Figura 5E, H). Concentrações relativas de IgIV 10 em IgIV após contactar matriz de afinidade ou matriz de controle e nos eluados foi determinada calculando-se concentrações de IgIV usando as curvas padrão. Estas concentrações de IgIV calculadas foram comparadas com concentrações de IgIV que foram determinadas diretamente usando-se manchador ADV01. Com estes números, calcula-se um fator de 15 enriquecimento para ligação específica de IgIV a proteínas dobrada incorretamente s. Na Figura 5F, mostra-se a ligação de estoque de IgIV diluído 1000 vezes (50 µg/ml) e IgIV contactada com Hb-AGE — Sepharose ou Sepharose de controle a Hb-AGE revestida. A ligação de Hb-AGE é reduzida em aproximadamente 50% após contactar IgIV com matriz de Hb- 20 AGE, enquanto que não se observa diminuição de sinal após contato de IgIV com matriz de controle. As concentrações totais de proteína após contato da matriz de Hb-AGE ou matriz de controle foram de 55 e 60 mg/ml. Estes desvios do valor esperado como máximo, de 50 mg/ml (material de partida) resultam da não-linearidade da curva padrão. Nas frações de IgIV eluídas de 25 Hb-AGE - Sepharose e matriz de controle, estavam presentes 120 e 7 µg/ml de IgIV, respectivamente, como determinado com manchador de proteína ADV01. Quando se avaliou a ligação dos eluados diluídos 100 vezes a Hb-AGE imobilizada, os sinais observados corresponderam a sinais obtidos após a ligação de aproximadamente 75 e 0,3 mg/ml de estoque de IgIV (Figura

5G). Portanto, em conclusão, 120 µg/ml de IgIV enriquecida com matriz de afinidade de Hb-AGE — Sepharose liga-se a Hb-AGE com uma potência correspondente a aproximadamente 75 mg/ml do estoque original de IgIV. Isto corresponde a um fator de enriquecimento de aproximadamente 5 $75.000/120 = 600$ vezes. Na Figura I descreve-se que contactando IgIV com Hb- AGE — Sepharose ou matriz de controle não se reduz o sinais obtidos após avaliação da ligação de IgIV a BSA imobilizada desnaturada com calor, quando se compara com o material de partida. No entanto, quando se testou 10 os 120 µg/ml de IgIV que foram eluídos da matriz de Hb-AGE quanto à ligação com BSA desnaturada com calor, sinais corresponderam a sinais obtidos após a ligação de 1,7 mg/ml de material de partida (estoque original de IgIV) (Figura 5J). Isto mostra o contato de IgIV com matriz de afinidade de proteína dobrada incorretamente aumenta a especificidade por BSA desnaturada com calor em aproximadamente $1700/120 = 14$ vezes.

15 Alternativamente a Hb-AGE, outras proteínas dobradas incorretamente são imobilizadas em uma matriz para aperfeiçoar a seletividade, afinidade, capacidade e/ou estabilidade da matriz de afinidade. Proteínas dobradas incorretamente alternativas que são imobilizadas são, embora sem limitação, proteínas oxidadas, proteínas desnaturadas (com 20 calor), proteínas glicadas, proteínas expostas a superfícies desnaturadoras ou moléculas desnaturadoras, p. ex. CpG-ODN, lipopolissacarídos, sulfato de dextrano, caulim, vidro, lipídeos, ou peptídeos amilóides, p. ex. FP6, amilóide-β, FP13. Alternativamente à CNBr-Sepharose, aplica-se outras matrizes ou suportes sólidos para imobilização do ligante de proteína dobrada incorretamente . De preferência, o suporte sólido é produzido em condições 25 de boa prática de fabricação (GMP, *good manufacturer practice*), e, de preferência, a matriz é designada como um 'Meio de bioprocesso', referindo a aspectos de segurança da matriz que são compatíveis com o uso médico para humanos. Outras matrizes/suportes sólidos compreendem, embora sem

limitação, NHS-Sepharose, Streptavidina-Sepharose, pérolas de latex, esuporte sólido ativado com epóxi, p. ex. polimetacrilato reticulado, Sepharose de tiol ativado, *Carboxylink*, epóxido Profinity.

Prepara-se uma matriz de afinidade usando uma proteína dobrada incorretamente que contribui para uma doença específica. Com esta matriz de afinidade, aquelas Ig's que se ligam a proteína dobrada incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada associada com doença, são isoladas seletivamente. Após a recuperação desta fração de Ig, obtém-se uma IgIV específica para doença com resultado benéfico específico mais elevado quando usado como terapia para a doença de mal dobramento. Aplica-se neste procedimento não só IgIV compreendendo apenas IgG's, mas cada fração de Ig é testada quanto à presença de um subconjunto de anticorpos benéfico, p. ex. anticorpos da subclasse de IgM. Alguns poucos exemplos de proteínas dobradas incorretamente que são associados com um estado de doença e que são aplicados para a preparação da matriz de afinidade de enriquecimento de IgIV são amilóide- β (doença de Alzheimer), proteínas glicadas (diálise, diabetes), 62-microglobulina (diálise), transtiretina (amiloidose sistêmica). Ver as Tabelas 4 e 5 para exemplos adicionais de proteínas que formam moléculas ricas em estrutura β cruzada dobrada incorretamente e que são usadas para o procedimento de enriquecimento específico para doença.

Novas construções que combinam alta especificidade e afinidade por proteínas dobradas incorretamente com um sinal de eliminação: quimera de proteína de ligação de proteína dobrada incorretamente com domínios Fc de Igs.

Com base nas verificações de que moléculas de IgG na IgIV e anticorpos de IgG1/IgM/IgG2a monoclonais murinos se ligam a proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada, projeta-se uma nova molécula com especificidade e/ou afinidade ainda maior

por proteínas dobrada incorretamente s, combinado com a capacidade de ser propensa à eliminação via interação com receptores de Fc. Para tal fim, domínio de dedo [*finger*] (F) ou qualquer outro domínio de proteína com afinidade por estrutura β cruzada, p. ex. um domínio de Ig de receptor para 5 produtos acabados avançados de glicação, um domínio de (aglomerado II, aglomerado IV de) proteína relacionada com receptor de lipoproteína de baixa densidade, um domínio dos receptores de aglutinador A, -B-I ou CD36, é fundido no nível do DNA ou no nível do aminoácido com uma porção Fc de uma molécula de Ig. Efetivamente, qualquer uma das proteínas que tem 10 afinidade por proteínas dobradas incorretamente proporciona um domínio vantajoso para introduzir especificidade para estrutura β cruzada na construção complexa com o domínio Fc (Tabela 4, 5). Domínios de dedo [*finger*] de tPA, fator XII, ativador de fator de crescimento de hepatócitos e fibronectina ligam-se, todos, a proteínas dobradas incorretamente com uma 15 conformação de estrutura β cruzada, e, portanto, todos são usados para o projeto de construções quiméricas. Qualquer tipo de combinação de domínios de dedo [*finger*] ou extensões de múltiplos domínios de dedo ou combinações de domínio(s) de dedo e outros domínios de ligação de proteína dobrada incorretamente , também pode ser aplicado para o desenvolvimento de uma 20 construção química com um domínio Fc. O gene de quimera é fundido e preparado sinteticamente e é clonado em um vetor de expressão apropriado para fins de expressão em, por exemplo, células de levedura, células de plantas, bactérias, células eucarióticas, p. ex. células de rim embrionário humano, células de rim de bebê de hâmster. Após a purificação, por exemplo, 25 da proteína química F-Fc recombinante, esta foi aplicada como um agente terapêutico para qualquer uma das doenças para as quais a IgIV tem sido usada. Alternativamente, regiões de afinidade ou moléculas sintéticas ou qualquer (porção de uma) proteína com afinidade por estrutura β cruzada ou por uma proteína compreendendo estrutura β cruzada, são fundidas, por

exemplo, a regiões Fc por meio de qualquer método conhecido por uma pessoa versada na arte para acoplamento (não)covalente de (fragmentos de) proteína. Além disso, moléculas não-proteináceas com afinidade por estrutura β cruzada e/ou moléculas compreendendo estrutura β cruzada (Tabela 3) são 5 fundidas a regiões de Fc de uma maneira similar.

Exemplo 5

Modelos para testar os efeitos protetores e/ou benéficos da administração de IgIV, IgIV enriquecida purificada por afinidade ou estruturas químéricas de uma molécula ou proteína de ligação de proteína dobrada incorretamente e um domínio Fc

Para testar um efeito benéfico da IgIV, ou de uma fração de IgIV enriquecida após purificação por afinidade com uma matriz com proteína dobrada incorretamente acoplada, anticorpos anti-proteína dobrada incorretamente (humanizados), ou uma estrutura químérica de, por exemplo, 15 um domínio de dedo [finger] e um domínio Fc de uma molécula de IgG, aplica-se vários modelos baseados em células *in vitro* para estados de doença, e também em modelos animais ou humanos *in vivo*, para determinar se referidas modalidades apresentam um efeito benéfico mais pronunciado do que a administração de IgIV total ou do que terapia convencional corrente.

Ensaio de células dendríticas murinas *in vitro*

A (auto)imunidade é dependente da apresentação de (auto)antígenos por células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas. Células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) murinas cultivadas são aplicadas, portanto, como um modelo para a (auto)imunogenicidade. Para tal 25 fim, DCs são isoladas das pernas traseiras de, por exemplo, camundongos Black-6 com de 8 a 12 semanas de vida. Ossos são isolados e enxaguados em etanol a 70%, enxaguados em meio RPMI-1640 com 25 mM de HEPES, com 10% de soro de bezerro fetal, penicilina e estreptomicina. Então o osso é enxaguado com este tamponador, em ambas as direções. Os eluados são

livrados dos eritrócitos por meio de adição de tamponador de lise específico para eritrócitos (obtido da UMC Utrecht Pharmacy Dept. local, número de catálogo 97932329). Eluados são analisados para determinar as células viáveis por meio de cultura das mesmas em placas de cultura de células. Neste 5 estágio, o meio é enriquecido com 10 ng/ml de GM-CSF. Crescimento de DCs em suspensão ou numa camada de células de macrófagos. Usando-se um FACS e anticorpos específicos, determina-se se as DCs estão presentes e ativadas. De preferência, os níveis de assim-chamadas moléculas co-estimuladoras, como B7.1, B7.2, MHC classe II, CD40, CD80, CD86 são 10 determinados, de preferência, em células positivas para CD11c. Alternativamente, a ativação de NF- κ B e/ou a expressão de citocinas é usada como indicadores de ativação de células envolvidas na imunogenicidade, como APC e DC. De preferência, quantifica-se as citocinas a seguir: TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, e/ou IFN γ . De preferência, os níveis de citocinas são 15 quantificados com ELISA. Alternativamente, quantifica-se os níveis de mRNA. Para uma pessoa versada na arte é evidente que a função de APC e DC também é testada.

Alternativamente, usa-se uma linha de DC estável, células 20 dendríticas cultivadas obtidas de monócitos coletados de sangue humano ou outras células apresentadoras de antígeno, para testar efeitos benéficos da esgotamento ou neutralização de proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada (Citterio *et al.*, 1999).

Experimentos adicionais que são realizados com DCs são a exposição das células a lipopolissacarídio (LPS), seguido de leitura dos níveis 25 dos marcadores de ativação indicados acima. Testa-se também o efeito de pré- e/ou co-incubações de LPS com IgIV (enriquecida) e/ou outras regiões de afinidade antes ou durante a exposição dos LPS a DCs. Estes experimentos são observados como um modelo para infecção bacteriana e sepsis em humanos.

Ensaio de células endoteliais de veia umbilical humana *in vitro*

Proteínas glicadas compreendendo estrutura β cruzada induzem resposta inflamatória, que se acredita contribuem para a patogênese de determinadas doenças incluindo nefropatia diabética. De uma forma geral, 5 proteínas dobradas incorretamente induzem disfunção celular com expressão incrementada ou ativação de sinais inflamatórios. O efeito de proteínas dobradas incorretamente sobre a (dis)função de células endoteliais é medida, por exemplo, determinando-se os níveis de espécies de oxigênio reativo em resposta a proteínas dobrada incorretamente. Usa-se células endoteliais de veia umbilical 10 humana que são isoladas e cultivadas, de acordo com protocolos convencionais, ou então outras células endoteliais, como células endoteliais bEnd.3. Os níveis de espécies de oxigênio reativo (ROS, *reactive oxygen species*) são monitorados com o uso de sondas fluorescentes, como CM-H₂DCF-DA. Alternativamente, monitora-se a viabilidade das células com um ensaio de MTT. As células 15 primárias cultivadas proporcionam a oportunidade de realizar ensaios de células *in vitro* que são aceitos na comunidade de pesquisa como sistemas-modelo para determinados estados de doença. Novamente, aplica-se nestes sistemas a capacidade de IgIV, frações isoladas das mesmas, um equivalente funcional ou nossos anticorpos anti- β cruzada.

20 Modelo murino *in vivo* de coagulação intravascular disseminada

Estrutura β cruzada induz coagulação intravascular disseminada (DIC, *disseminated intravascular coagulation*). Como um modelo para a DIC em camundongos C57B1/6 fêmeas elicitase a reação generalizada de Shwartzman. Para tal fim, camundongos recebem injeções 25 com 5 μ g de lipopolissacarídio (LPS) na planta do pé no dia = 0 e com 300 μ g de LPS intravenosamente a t = 24 h. Monitora-se a sobrevida ao longo do tempo, juntamente com diversos níveis plasmáticos de proteínas, p. ex. citocinas.

Modelo de encefalomielite autoimune experimental em camundongo/rato

in vivo

Para testar se anticorpos anti-proteína dobrada incorretamente proporcionam um efeito benéfico durante um recidiva de esclerose múltipla (MS, *multiple sclerosis*), usa-se um modelo de camundongo *in vivo* para MS, 5 o modelo experimental de encefalomielite autoimune (ou alérgica). Para tal fim, proteína básica de mielina (MBP, *myelin basic protein*) ou peptídeo de glicoproteína de oligodendrócito de mielina 35-55 (MOG35-55) é emulsificado em Adjuvante de Freund Incompleto (IFA, *Incomplete Freund's Adjuvant*) com micobactéria. A presença de proteínas dobradas incorretamente é determinada usando-se ensaios de fluorescência de Tioflavina T e vermelho Congo, e também ensaios de ativação e ligação de tPA. Avalia-se a ligação de IgIV ou de uma fração enriquecida de IgIV após purificação por afinidade, à MBP emulsificada ou MOG35-55. Para induzir 10 EAE em camundongos ou ratos, a MBP emulsificada ou MOG35-55 é injetado, por exemplo, na almofada da pata traseira. Em camundongos, uma 15 quantidade injetada subcutaneamente de MOG35-55 é acompanhada, de preferência, de uma injeção intraperitoneal de toxina de *Bordetella pertussis*, que é repetida após 48 h. Por exemplo, usa-se ratos Lewis fêmeas, ou camundongos Balb/c fêmeas. Medidas para doença clínica são classificadas, 20 por exemplo, como a seguir: 0, normal; 1, cauda caída; 2, reflexo de endireitamento prejudicado; 3, paresia dos membros traseiros; 4, paralisia completa dos membros traseiros; 5, morte. O efeito de qualquer preparação de 25 anticorpos (quiméricos) é analisado administrando-se a droga em um ou mais momentos após indução de EAE. Uma das preparações testada é a IgIV que é purificada por afinidade em uma matriz de afinidade com MOG35-55 ou MBP dobrada incorretamente ou desnaturada imobilizada, dependendo de qual das duas proteínas é usada para induzir a doença.

Modelo de artrite induzida com colágeno *in vivo*

No modelo de artrite induzida com colágeno *in vivo*, ratos

recebem injeções intradérmicas na base da cauda e no dorso acima de cada perna com colágeno de tipo II (bovino), dissolvido em ácido acético e emulsificado em IFA. Os ratos são examinados diariamente em busca de sinais de doença mediante monitoramento do inchaço e eritema. Uma das 5 preparações testadas é IgIV que é purificada por afinidade em uma matriz de afinidade com colágeno dobrado incorretamente /desnaturado imobilizado em IFA.

Modelo de sépsis de camundongo *in vivo*

Sépsis é mediada por estrutura β cruzada. Um dos modelos de 10 sépsis em camundongo *in vivo* que é aplicado para testar efeitos da IgIV, anticorpos monoclonais ou drogas relacionadas, é o modelo de 'ligação cecal e punção'. Para este modelo, mice BALB/c fêmeas são anestesiados antes de se realizar uma incisão abdominal para retirar o ceco do abdome. Após o 15 puncionamento do ceco, uma quantidade do conteúdo luminal é transferida para fora através das punções, antes que o ceco seja recolocado no abdome e o camundongo fechado. A progressão da infecção é monitorada medindo-se a temperatura do corpo e classificando-se a mobilidade dos camundongos. Considera-se os camundongos infectados letalmente quando eles se 20 mostrarem hipotérmicos ($T < 33^{\circ}\text{C}$) e quando os camundongos se mostrarem incapazes de se endireitarem por si sós. Efeitos da administração de anticorpos com afinidade por proteínas dobradas incorretamente com uma 25 conformação de estrutura β cruzada após o puncionamento do ceco são avaliados monitorando-se um grupo de camundongos não-tratados e um grupo de camundongos que recebeu uma IgIV (enriquecida), anticorpos monoclonais ou uma construção química.

Modelo de sépsis de rato *in vivo*

Como uma alternativa para o modelo de sépsis de camundongo, usa-se o modelo de sépsis de rato. Por exemplo, induz-se choque endotóxico em ratos Fischer com pesos de aproximadamente 150 g

por meio de injeção intravenosa de 15 mg/kg de endotoxina de *Escherichia coli*. Como uma medida para a progressão de doença, monitora-se, nos ELISAs, os níveis de fator de necrose de tecido e interleucina-1 no sangue. Desta maneira avalia-se os efeitos do tratamento com qualquer preparação de 5 IgIV ou anticorpo ou construção quimérica com afinidade por proteína não-dobrada.

Modelo de artrite induzida por parede celular de *Streptococcus reativado de camundongo in vivo*

Em um modelo de camundongo *in vivo* de artrite induzida por parede celular de *Streptococcus reativado*, mice C57BL/6 são induzidos por uma injeção intraarticular nas juntas dos joelhos com paredes celulares de organismos de *Streptococcus pyogenes* T12. A injeção é repetida cinco vezes com intervalos de 1 semana. A progressão da doença é acompanhada, por exemplo, durante cerca de 40 dias por meio de medição do inchaço de juntas dos joelhos que receberam injeções. Após eutanizar os camundongos, 10 classifica-se a gravidade macroscopicamente da artrite após remover a pele das juntas dos joelhos. Os efeitos da administração de anticorpos anti-estrutura β cruzada ou quimera são comparados com controles que não 15 receberam terapêutico e com camundongos de controle que foram injetados com tamponador.

Modelo de artrite reumatóide experimental de camundongo *in vivo*

Em um modelo de camundongo *in vivo* para artrite reumatóide experimental induzida com colágeno, por exemplo, camundongos machos da cepa DBA/1 e/ou camundongos machos da cepa C57BL/6 são expostos a 25 colágeno bovino nativo de tipo II. Artrite é induzida injetando-se colágeno emulsificado em adjuvante de Freund completo com *Mycobacterium tuberculosis*, subcutaneamente na base da cauda. Camundongos recebem reforços no dia 21 com colágeno emulsificado em IFA. Camundongos são monitorados para determinar a evidência de artrite, e classifica-se a gravidade

da doença, usando-se um procedimento de classificação convencional. O efeito de uma terapia à base de anticorpos é avaliado comparando-se camundongos de controle com artrite e camundongos de controle que receberam injeções duas vezes apenas com tamponador, com camundongos tratados com IgI V/anticorpo monoclonal/construção quimérica após indução da artrite.

Modelo de imunogenicidade/inflamação humana *in vivo*: administração de proteína glicosada +/- IgIV

Proteínas glicosadas compreendendo estrutura β cruzada induzem uma resposta inflamatória, contribuindo para a patogênese de determinadas doenças incluindo nefropatia diabética. De uma forma geral, proteínas dobradas incorretamente induzem disfunção celular com expressão incrementada ou ativação de sinais inflamatórios. Os efeitos inflamatórios de proteínas dobradas incorretamente e reagentes anti-estrutura β cruzada, como IgIV, frações da mesma, ou equivalentes funcionais de inflamação são estudados em camundongos e humanos. Proteínas compreendendo estrutura β cruzada são infundidas por meio de administração intravenosa. Mediú-se em diferentes intervalos de tempo o efeito sobre o nível de proteínas de fase aguda, como proteína C-reativa, amilóide do soro A (*Serum Amyloid A*), componente P do amilóide do soro (*SAP, Serum amyloid P-component*) ou fator de complemento 3 (C3). Alternativamente, determina-se o efeito sobre outros marcadores dos níveis de inflamação, como IL-6, IL-8, dímero D ou protombina F1+2. Finalmente, determina-se os níveis de formação de (auto)anticorpos por meio de ELISA.

25 Ensaio com sangue integral para a determinação da natureza inflamatória ou imunogênica de compostos

Uma maneira de avaliar se a ativação de células do sistema imunológico por proteínas com uma conformação de estrutura β cruzada é bloqueada usando compostos de ligação de estrutura β cruzada, p. ex. IgIV,

anticorpos anti-estrutura β cruzada monoclonais, construções quiméricas, é por meio do uso de um ensaio de 'sangue integral'. Para este fim, no dia 1 adiciona-se sangue humano recentemente colhido com EDTA numa relação de 1:1 para meio RPMI-1640 (tamponado com HEPES, com L-glutamina, 5 Gibco, Invitrogen, Breda, Países Baixos), que é pré-aquecido a 37°C. Subsequentemente, adiciona-se proteínas compreendendo conformação de estrutura β cruzada, com ou sem compostos de ligação de estrutura β cruzada. De preferência, inclui-se um controle positivo, de preferência, LPS. Um inibidor que é usado para LPS é Polimixina B, a uma concentração final de 5 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Polipeptídeos ricos em conformação de estrutura β cruzada convencional que são testados compreendem A β , γ -globulinas amilóides, proteínas glicadas, FP13, OVA desnaturada com calor, BSA desnaturada com calor, MSA desnaturada com calor, lisozima desnaturada com calor, e β 2gpi exposto a cardiolipina. Controles negativos são γ -globulinas nativas, albumina 15 nativa, Hb nativa, A β recentemente dissolvida ou FP13, OVA nativa, outras proteínas nativas. Como um controle, todas as amostras de proteína são testadas na ausência ou na presença de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Polimixina B para excluir efeitos observados devido a contaminações de endotoxina putativa. Adicionalmente, proteínas nativas sozinhas ou pré- expostas a adjuvantes 20 desnaturadores, p. ex. LPS, e CpG-ODN, ou outros compostos desnaturadores ou condições desnaturadoras (p. ex. oxidação de Cu $^{2+}$), são testadas quanto à atividade imunogênica. Todos os compostos testadores são testados na ausência e na presença de uma série de concentrações de um inibidor potencial da resposta inflamatória ou imunogênica, p. ex. IgIV, anticorpos 25 anti- β cruzada monoclonais. O volume final de ativadores, controles e de inibidores potenciais adicionados à mistura de sangue-meio é de aproximadamente 1/200 do volume total. É possível obter concentrações maiores de ativadores e de inibidores putativos por meio do uso de meio RPMI-1640 concentrado para etapas de pré-diluição (pó de meio RPMI-1640,

Gibco, Invitrogen; número de catálogo 51800-035). O sangue e o meio são misturados cuidadosamente e incubados de um dia para o outro em um incubador de CO₂ com tampas que permitem a entrada de CO₂. No dia 2, coleta-se o meio após 10 minutos de centrifugação a 1.000*g, à temperatura ambiente. O pellet de células é armazenado em estado congelado. O meio é centrifugado novamente durante 20 minutos a 2.000*g, à temperatura ambiente. O sobrenadante é analisado com o uso de ELISAs em busca de concentrações de marcadores de uma resposta imune, p. ex. fator de necrose de tecido α (TNF α , *tissue necrosis factor- α*), citocinas, quimiocinas. Por exemplo, níveis de TNF α após exposição de sangue integral a compostos de teste são avaliados por meio do uso de ELISA TNF-alfa/TNFSFIA comercialmente obtidível (R&D Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.; Human TNF-alfa Quantikine HS PharmPak). Quando se estabelece controles positivos e negativos, e também uma curva de titulação confiável, testa-se 10 qualquer solução quanto à carga de estrutura β cruzada com relação a concentrações de marcadores para imunogenicidade. Além disso, testa-se inibidores putativos da resposta imune. Por exemplo, IgIV e anticorpos anti- β cruzada monoclonais previnem uma resposta imune quando da adição a 15 soluções de proteína dobrada incorretamente.

20 **Fagocitose de porções compreendendo estrutura β cruzada.**

A captação de proteínas compreendendo estrutura β cruzada, polipeptídeos e/ou peptídeos e também células ou partículas celulares, e o efeito de IgIV ou de um equivalente funcional do mesmo são estudados *in vitro* usando-se células cultivadas, de preferência, monócitos, células 25 dendríticas, ou macrófagos ou células similares, por exemplo, células U937 ou THP-1. De preferência, moléculas compreendendo estrutura β cruzada são marcadas, de preferência, com 125I ou um marcador fluorescente, de preferência, FITC, ligados covalentemente à molécula por meio de uma molécula ligante, de preferência, ULS ou outro método de acoplamento

similar. Células são marcadas, de preferência, com mepacrina ou outros marcadores fluorescentes, como rodamina. Células fagocíticas são incubadas na presença de células ou moléculas compreendendo estrutura β cruzada marcadas na presença ou ausência de um composto de ligação de estrutura β cruzada, como IgIV ou seus equivalentes funcionais. Após incubação, de preferência, durante várias horas, mede-se a absorção de células ou moléculas marcadas, de preferência, usando um contador de cintilação (para 125I) ou por meio de análise de FACS (com sondas fluorescentes) ou microscopia imunofluorescente. A absorção de células também é contada sob um microscópio iluminado com manchamento visual das células.

Exemplos de 6 a 20

Materiais e métodos gerais para os Exemplos de 6 a 20

Preparação de proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada

15 Dobramento incorreto o IgIV humana

IgIV Gammagard RF (IgIV RF)

IgIV Gammagard (IgIV nativa) foi dobrada incorretamente de acordo com um procedimento usado para preparar antígeno para fator reumatóide (RF, *rheumatoid factor*). IgIV Gammagard foi dissolvida em condições estéreis a 1 mg/ml em tamponador de glicina (100 mM de glicina, 20 17 mM de NaCl pH 8,2). Isto foi aquecido durante 5 minutos a 65°C e armazenado a -80°C.

Desnaturação com calor de IgIV Gammagard (IgIV 65, IgIV 69, IgIV 76, etc.)

IgIV Gammagard foi dissolvida em condições estéreis a 5 mg/ml em 20 mM de fosfato de sódio pH 5,0, e desnaturada com calor de 25°C até temperaturas indicadas com etapas de temperatura de 5°C/minuto. Temperaturas finais foram de 65°C, 69°C, 76°C, 80°C, 83°C e 86°C. Após desnaturação com calor, proteínas foram armazenadas imediatamente a -80°C

e sua estrutura foi analisada empregando-se diversos ensaios como descrito abaixo. Como controle nativo, IgIV Gammagard recentemente dissolvida, a uma concentração de 5 mg/ml em 20 mM de fosfato de sódio pH 5,0 foi mantida à temperatura ambiente durante 10 minutos, e armazenada a -80°C.

5 **Desnaturação de IgIV Gammagard com HFIP/TFA (IgIV HFIP/TFA)**

IgIV Gammagard foi dissolvida em condições estéreis a 5 mg/ml em uma mistura a 1:1 (v:v) de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) e ácido trifluoroacético (TFA). Subsequentemente, isto foi misturado cuidadosamente durante 5 minutos em um vórtice, à temperatura ambiente. O 10 solvente orgânico foi evaporado sob gás de N₂ e o terceiro material foi dissolvido a 1 mg/ml em H₂O e incubado durante 7 dias a 37°C, e armazenado a -20°C.

Desnaturação com ácido ou base, de IgIV Gammagard (IgIV Ácido, IgIV base)

15 IgIV Gammagard foi dissolvido a 5 mg/ml em PBS e incubado à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento durante 10 minutos. Em seguida, o pH foi diminuído a pH 2 por meio de adição de um volume de uma solução de consumo de HCl a 15% em H₂O (desnaturação com ácido), ou foi elevado a pH 11 com um volume de uma solução de consumo de 20 NaOH 5 M em H₂O (desnaturação com base), e isto foi incubado a 37°C durante 30 minutos. Em seguida, o pH foi ajustada a seu valor inicial, fisiológico, por meio da adição de 5 M de NaOH ou 15% de HCl, respectivamente, e isto foi armazenado a -80°C.

Dobramento incorreto de Octagam IgIV

25 Usou-se *IgIV Octagam* (Octapharma, Brussel, Bélgica, lote 5024018434, exp. 12/2006). A concentração de endotoxina na IgIV foi baixa, i.e. de 0,13 E.U./ml no estoque a 50 mg/ml de Octagam, conforme determinado usando-se um ensaio padronizado *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (Cambrex). IgIV foi diluída em 10 mM de tamponador de NaPi (pH

8,1) a 1, 2,5, 5, 10 e 20 mg/ml e aquecida em etapas (0,5°C/minuto) de 25°C a 65°C, mantida à temperatura ambiente durante 1 hora e 40 minutos e armazenada subsequentemente a -80°C. Alternativamente, IgIV foi diluída em 10 mM de HCl, pH 2,0, e incubada a 65°C durante 6 horas. Após esta 5 incubação, o pH foi ajustado em 7,3 com NaOH.

Desnaturação com ácido ou com base de uma composição de IgGs de camundongo (dmIgG ácida, dmlgG básica)

IgGs de camundongo ($\text{m}\gamma$ -globulinas, da fração de Cohn II, III aprox. 99%, Sigma, lote 090k7680) foram dissolvidas a 1 mg/ml em PBS e 10 incubadas à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento durante 20 minutos. As IgGs foram dobradas incorretamente de acordo com o método descrito acima para IgIV ácida e IgIV básica. As $\text{m}\gamma$ -globulinas dobradas incorretamente são referidas como dmIgG ou d $\text{m}\gamma$ -globulinas.

Dobramento incorreto de IgG de camundongo por meio de calor (dmIgG

15 **85°C)**

Composição de IgG de camundongo foi dissolvida a 1 mg/ml em PBS e incubada à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento durante 20 minutos. Em seguida, ela foi aquecida em etapas de 5°C por minuto de 25°C a 85°C e armazenada subsequentemente a -80°C.

20 **Dobramento incorreto de uma composição de IgGs humanas**

IgGs humanas (γ -globulinas, Sigma, G4386) foram dissolvidas a 5 mg/ml em tamponador HEPES (20 mM de HEPES, 137 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 3 mM de CaCl_2). Em seguida, o pH foi incrementado por meio de adição de um estoque de NaOH 5 M e mantido durante 40 minutos a 37°C.

25 Em seguida, adicionou-se uma quantidade igual de uma solução de consumo de HCl 5 M para ajustar o pH a seu valor inicial, e isto foi armazenado a -80°C. Observou-se visualmente grandes agregados.

Desnaturação com ácido e com calor de Apoliproteína A-I

Apoliproteína A-I (ApoA-I, 2,15 mg/ml, de plasma humano,

Sigma, A0722, lote 116K1408) em 10 mM de NH₄HCO₃ e HCl adicionado a 100 mM, foi desnaturadas por meio de aquecimento durante 30 minutos a 37°C, 75°C ou 100°C. Subsequentemente, adicionou-se uma quantidade equivalente de NaOH (concentração final de 100 mM) para alterar os valores 5 iniciais de pH.

Apoliproteína A-I desnaturada com base e com calor

Novamente, 2,15 mg/ml de apoliproteína A-I em 10 mM de NH₄HCO₃, agora com adição de NaOH a 100 mM, foram desnaturados por meio de aquecimento durante 30 minutos a 37°C, 75°C ou 100°C. 10 Subsequentemente, adicionou-se uma quantidade equivalente de HCl (concentração final de 100 mM) para alterar o pH a seus valores iniciais.

Apoliproteína A-I desnaturada com calor

A solução de consumo de Apoliproteína A-I (ApoA-I) a 2,15 mg/ml em 10 mM de NH₄HCO₃ foi desnaturada com calor durante 30 15 minutos a 75°C ou 100°C.

Desnaturação com calor, de ovalbumina (dOVA std)

Ovalbumina (OVA, de clara de ovos de galinha, Sigma, A5503 classe V, lote 07147094) foi dissolvida em PBS a uma concentração de 1 mg/ml, e aquecida de 30°C a 85°C durante 5 ciclos em uma máquina de 20 PCR com etapas de temperatura de 5°C por minuto. Esta OVA dobrada incorretamente é referida como dOVA ou dOVA *standard* (std).

Preparação de beta amilóide fibrilar 1-42 (fA β 42)

Peptídeo β -amilóide humano sintético liofilizado (1-42) (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA; NKI 25 Amsterdam, Países Baixos; SEQ-ID 9) (A β 1-42) foi monomerizado primeiro dissolvendo-se a 1 mM em HFIP e repartido em tubos de microcentrífuga estéreis. HFIP foi removido com gás de nitrogênio, e a película de peptídeo foi ressuspensa em sulfóxido de dimetila (DMSO, Pierce, 20684) a uma concentração de 5 mM, congelado subitamente em nitrogênio líquido e

armazenada a -80°C (solução de consumo de A β 1-42 monomerizado). O estoque de A β 1-42 monomerizado descongelado, em DMSO, foi dissolvido em 10 mM de HCl a uma concentração final de 400 μ g/ml, e incubado a 37°C durante 24 h, e armazenado subsequentemente a -80°C.

5 **A β 1-42 dissolvido em PBS e congelado diretamente a -80°C em t = 0 (A β 42t=0)**

Estoque de A β 1-42 monomerizado descongelado, em DMSO, foi dissolvido em PBS, esterilizado por meio de filtração (0,22 μ m), a uma concentração de 100 μ M, e armazenado a -80°C.

10 **A β 1-42 dissolvido em HBS e incubado durante 24 h a 4°C (A β 42HBS)**

Estoque de A β 1-42 monomerizado descongelado, em DMSO, foi dissolvido em HBS (solução salina tamponada com HEPES, 137 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 10 mM de HEPES, pH 7,3) a uma concentração de 100 μ M. Tamponador é filtrado através de um filtro de seringa de 0,22 μ m antes 15 do uso. Amostras foram armazenadas a -80°C após a preparação.

Preparação de beta amilóide fibrilar 1-40 (fA β 40)

De forma identica a A β 1-42, um estoque de peptídeo A β 1-40 humano sintético monomerizado (DAEFRHDSGYEVHH QKLVFFAEDV GSNKGAIIGLMVGGVV, NKI Amsterdam, Países Baixos) foi preparado e 20 armazenado a -80°C. A β 1-40 monomerizado descongelado, em DMSO, foi dissolvido em PBS a uma concentração de 100 μ M, e incubado durante 168 h à temperatura ambiente, e armazenado subsequentemente a -80°C.

A β 1-40 dissolvido em PBS e congelado diretamente a -80°C em t=0 (A β 40t=0)

25 A β 1-40 monomerizado descongelado, em DMSO, foi dissolvido em PBS a uma concentração de 100 μ M, e armazenado diretamente a -80°C.

A β 1-40 dissolvido em 10 mM de HCl e incubado durante 24 h a 37°C (A β 40HCl)

A β 1-40 monomerizado descongelado, em DMSO, foi dissolvido em 10 mM de HCl a uma concentração de 100 μ M, e incubado durante 24 h a 37°C. Subsequentemente, isto foi neutralizado com excesso de PBS1 (140 mM de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1,8 mM de KH₂PO₄, pH 7,4. 5 PBS1 é filtrado usando-se um filtro de seringa de 0,22 μ m antes do uso) e armazenado a -80°C.

Dobramento incorreto de albumina de soro humano (HSA [*Human Serum Albumine*], Cealb, Sanquin, Países Baixos, lote 05C2 9H120A)

HSA, a 1, 2,5, 5, 10 e 20 mg/ml, pH 2 (diminuído com um volume de uma solução de consumo de 5 M de HCl) foi aquecida a 65°C durante 6 h, seguido de neutralização com um volume de uma solução de consumo de 5 M de NaOH, e armazenada subsequentemente a -80°C.

Microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *transmission electron microscopy*)

15 Imagens de TEM foram coletadas usando um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 EX (Jeol Ltd., Tokyo, Japão) a uma voltagem de excitação de 80 kV. Para cada amostra, o formvar e lado revestido com carbono de uma grade de níquel ou de cobre de 100 mesh foi posicionada em uma gota de 5 μ l de solução de proteína durante 5 minutos. 20 Em seguida, isto foi posicionado em uma gota de 100 μ l de PBS durante 2 minutos, seguido de três incubações de 2 minutos com uma gota de 100 μ l de água destilada. Em seguida, as grades foram manchadas durante 2 minutos com uma gota de 100 μ l de 2% (m/v) de metilcelulose com 0,4% de acetato de uranila pH 4. O excesso de fluido foi removido por meio de aplicação de 25 filetes do lado das grades sobre papel filtrado, e as grades foram secadas subsequentemente sob uma lâmpada. Amostras foram analisadas com um aumento de 10K.

Ensaio de fluorescência de vermelho Congo (CR)

O aumento da fluorescência do vermelho Congo é uma

característica de proteínas dobradas incorretamente que compreendem características estruturais comuns a proteínas com uma conformação β cruzada. Fluorescência de vermelho Congo (CR) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, E.U.A., 86,095-6) foi medida em duplo em um fluorímetro de microplaca Thermo Fluoroskan Ascent 2.5 (Vantaa, Finlândia) em placas pretas de 96 poços a um comprimento de emissão de 590 nm e um comprimento de excitação de 544 nm. Estoques de proteína e peptídeo foram diluídos a 100 μ g/ml para amostras de dOVA e IgIV e 40 μ g/ml para amostras de AB em 25 μ M de CR em PBS, e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. A fluorescência de fundo da solução de tamponador e de proteína sem CR e de CR em tamponador foi subtraída de medições correspondentes de solução de proteína incubada com CR. Controle positivo para as medições foi de 100 μ g/ml dOVA (dOVA std).

Ensaio de aumento de fluorescência de Tioflavina T (ThT)

O aumento da fluorescência de ThT é uma característica de proteínas dobradas incorretamente que compreendem características estruturais comuns a proteínas dobradas incorretamente com conformação β cruzada. A fluorescência de Tioflavina T (ThT) (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A., T-3516) foi medida de maneira análoga ao procedimento descrito para CR. O comprimento de onda de emissão foi, agora, de 485 nm e o comprimento de onda de excitação foi de 435 nm. Estoques de proteína e peptídeo foram diluídos em 25 μ M de ThT em 50 mM de tamponador de glicina, pH 9,0.

Ensaio de fluorescência com ácido 8-anilino-1-naftalenosulfônico (ANS)

A fluorescência de ANS é acentuada quando ligado a aglomerados de radicais amino-acila hidrofóbicos. Quando da ligação a regiões hidrofóbicas de proteínas expostas a solvente, o comprimento de onda de emissão (λ_{EM}) desvia-se de 514 nm para 460 nm quando excitado com um comprimento de onda de 380 nm (λ_{EX}), acompanhado de um aumento

drástico da intensidade da fluorescência. A fluorescência do ANS (Sigma, A1028) foi medida a um comprimento de onda de emissão de 460 nm e um comprimento de onda de excitação de 380 nm. As diversas soluções de consumo de peptídeo e proteína de teste foram dissolvidas em 40 μ M de ANS em PBS e incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. A fluorescência de fundo da solução de tamponador e proteína sem ANS, e do ANS em tamponador foram subtraídas das medições correspondentes de solução de proteína incubadas com ANS. O controle positivo para as medições foi de 100 μ g/ml de dOVA (dOVA std).

10 **Ensaio de aumento de fluorescência do sal de di-potássio de ácido 4,4'-dianilio-1,1'-binaftil-5,5' dissulfônico (Bis-ANS)**

De forma similar a CR, ThT e ANS, mediu-se o aumento da fluorescência de Bis-ANS (Sigma). O comprimento de onda de emissão foi de 485 nm e o comprimento de onda de excitação foi de 435 nm. Estoques de 15 proteína e peptídeo foram diluídos em 25 μ M de Bis-ANS em PBS.

Ensaio de aumento de fluorescência de Tioflavina S (ThS)

O aumento da fluorescência de ThS é uma característica de 20 proteínas dobradas incorretamente que compreendem características estruturais comuns a proteínas com conformação com uma conformação β cruzada. A fluorescência de ThS (Sigma, 033k1076) foi medida de acordo com o procedimento descrito para CR e ThT. O comprimento de onda de emissão foi de 542 nm e o comprimento de onda de excitação foi de 435 nm. Estoques de proteína e peptídeo foram diluídos em 25 μ M de 4ThS em PBS.

Ensaio de fluorescência intrínseca de triptofano

25 Medições de fluorescência intrínseca de triptofano (Trp) foram realizadas em um Gemini Spectramax XPS, (Molecular Devices) usando programa [software] pro v5.01, com amostras de 100 μ l, em placas pretas de 96, a um comprimento de onda de excitação de 283 nm. Os espectros de emissão foram coletados à temperatura ambiente na faixa de 360 - 850 nm.

Uma proteína dobrada nativamente apresenta fluorescência aumentada ou diminuída em comparação com sua contraparte dobrada incorretamente. Os valores absolutos da intensidade de fluorescência de TrP não é muito informativa. No entanto, alterações na magnitude servem como um parâmetro de sondagem para a monitoração de perturbações da dobra de proteína. Um desvio do comprimento de onda de emissão da fluorescência é uma indicação melhor de alterações locais no ambiente do fluoróforo Trp. Radicais de Trp expostos a solvente apresentam fluorescência máxima a 340-350 nm, enquanto que radicais totalmente embutidos fluorescem a cerca de 330 nm.

10 **Ensaio de ativação de tPA/plasminogênio**

O aumento da atividade de tPA/plasminogênio quando da exposição das duas serina proteases a proteínas dobradas incorretamente foi determinado usando-se um ensaio cromogênico padronizado (ver, por exemplo, pedido de patente WO2006101387, parágrafo [0195], e Kranenburg 15 *et al.*, 2002, *Curr. Biology* 12(22), pp.1833). Ambos, tPA e plasminogênio, atuam na Via β cruzada (ver Tabela 4). O aumento da atividade das proteases de ligação β cruzada é uma medida da presença de proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada.

20 **Domínios de dedo [finger] de fibronectina recombinante que se ligam a proteínas dobrada incorretamente s**

Para uma descrição da clonagem, expressão e purificação de domínios de dedo de fibronectina humana recombinante 4-5 (Fn F4-5), agora com um marcador His e marcador FLAG na ponta C, ver pedido de patente WO2006101387 (parágrafo [0137]-[0165] e [0192-0194]). A expressão de 25 proteína em células de rim embrionário humano e a purificação foram realizados com o auxílio da instalação de expressão de ABC (University of Utrecht, Países Baixos). Fn F4-5 purificado, a 288 μ g/ml em PBS contendo 5% de glicerol, é armazenado a -80 °C.

ELISA de tPA e dedo 4-5 de fibronectina

Para análise da liqüefação de Fn F4-5 e tPA às diversas preparações de ApoA-I de plasma humano, aplicou-se ELISAs convencionais como descrito acima. Para a análise da ligação de tPA incluiu-se 10 mM de ácido ϵ -amino capróico no tamponador de ligação (PBS/0,1% de Tween20).

5 A ligação de Fn F4-5-FLAG-His foi determinada usando-se anticorpo anti-FLAG (anticorpo de camundongo], M2, conjugado de peroxidase; Sigma, A-8592).

Resultados

Análise de TEM de dOVA standard

10 Análise de TEM de ovalbumina desnaturada com calor, usada como uma proteína dobrada incorretamente convencional em ensaios indicados (dOVA std.), mostra que a proteína dobrada incorretamente se agrega em multímeros não-fibrilares (não mostrado). Para todos os ensaios de aumento de fluorescência descritos acima, e também para o ensaio de ativação de tPA/plasminogênio, identificou-se a concentração de dOVA std. que resulta em máximo aumento de fluorescência, ou máxima ativação de tPA/plasminogênio, respectivamente. Para o ensaio de aumento de fluorescência, esta concentração foi ajustada em 100 μ g/ml. Para o ensaio de ativação de tPA/plasminogênio, usa-se 40 μ g/ml dOVA std. como uma referência. Quando apropriado, o aumento de fluorescência e a ativação de tPA/plasminogênio induzida por dOVA std. foi ajustado arbitrariamente como sendo de 100% para fins de comparação.

15

20

Análise de TEM de Hb e BSA glicosada

A Figura 6 descreve que o dobramento incorreto of BSA e 25 hemoglobina por meio de glicação induz agregados amorfos não-fibrilares.

Octagrama de IgIV

A Figura 7 mostra que a desnaturação de IgIV Octagam induz estrutura β cruzada. Observa-se que várias condições de dobramento incorreto resultam em proteínas dobradas incorretamente com características variáveis

de TEM e Tioflavina T. Não se observou fibrilos. Calcula-se que, a concentrações relativamente elevadas de IgIV durante o dobramento incorreto, o tamanho dos conjuntos de moléculas de IgIV aumenta. Isto não se correlaciona com a fluorescência de ThT.

5 IgIV Gammagard

Observou-se aumento da fluorescência de Tioflavina T, vermelho Congo, ANS, Bis-ANS e Tioflavina S com as diversas amostras de IgIV Gammagard dobradas incorretamente em comparação com IgIV nativa (Figura 8A-E). De uma forma geral, observa-se um aumento da fluorescência com os diversos corantes fluorescentes que é proporcional ao aumento da temperatura durante a desnaturação. Observou-se características similares quando se mediou a fluorescência de Trp (Figura 8F). Observa-se também elevada fluorescência no caso de IgIV Gammagard desnaturada com base e com ácido, em comparação com IgIV Gammagard nativa. Observa-se que condições para a preparação de epítópos para RF na IgG introduzem um aumento relativamente pequeno de marcadores β cruzada. No caso de hIgG-BASE-37°C, mediu-se a fluorescência de ThT, CR e Trp. O aumento da fluorescência de ThT é moderado, porém o aumento da fluorescência de CR e Trp é elevado, em comparação com IgIV nativa e em comparação com IgG dobrada incorretamente após tratamentos alternativos.

Imagens de TEM a um aumento de 10K mostram que IgIV Gammagard nativa meramente abriga quaisquer agregados, e os agregados presentes são amorfos e de tamanho pequeno (Figura 9). Quando a temperatura de desnaturação aumenta, aumentam também o tamanho da agregação e a abundância dos agregados. O aparecimento de IgIV Gammagard desnaturada com ácido em uma imagem de TEM apresenta muitas similaridades com IgIV Gammagard desnaturada com calor a uma temperatura de 76°C. IgIV Gammagard desnaturada com base apresenta agregados amorfos com um tamanho médio de 500 nm (Figura 9J). IgIV

HFIP/TFA dobrada incorretamente e γ -globulinas humanas desnaturadas com base aparecem como agregados com características similares como as observadas para IgIV BASE (Figura 9K, L). No entanto, o número de agregados é maior, e o tamanho médio dos conjuntos multiméricos é um tanto 5 maior, em comparação com IgIV BASE. Particularmente no caso de γ -globulinas desnaturadas com base (hIgG-BASE-37°C), o tamanho médio dos multímeros é de aproximadamente dobrado quando comparado com IgIV BASE. IgIV RF parece como conjuntos pequenos densos e soltos (Figura 9B).

A potência das preparações dobradas incorretamente de IgIV 10 Gammagard para ativar tPA/plasminogênio em um ensaio de geração de plasmina mediada com tPA foi examinada (Figura 9M). Não se observou qualquer ativação de tPA/plasminogênio com IgIV Gammagard nativa. Com base na potência de ativação de tPA/plasminogênio das diversas preparações 15 de IgIV Gammagard desnaturada, é possível classificar três grupos, nominalmente ativadores moderados (IgIV RF, IgIV 65, IgIV 69 e IgIV Base), ativadores potentes (IgIV 76, IgIV 80, IgIV 83 e IgIV 86) e ativadores muito potentes (IgIV Ácido e IgIV HFIP/TFA). É possível observar uma diferença notável na estrutura de IgIV quando a temperatura de dobramento incorreto é incrementada de 69°C para 76°C. Imagens TEM revelam que, a 20 69°C, formam-se alguns poucos agregados densos (Figura 9D) enquanto que, a 76°C, foi possível observar conjuntos relativamente grandese muito densos que aumentam de tamanho quando a temperatura de dobramento incorreto é ainda mais elevada (Figura 9E-H). Este aumento de tamanhjo dos conjuntos de IgIV é acompanhado de um aumento da ativação de tPA/plasminogênio, 25 quando os dobramentos incorretos a 69°C e 76°C são comparados (Figura 9M).

Preparações de A β

As várias preparações de A β 42 e A β 40 apresentam níveis incrementados de fluorescência de ThT, CR e ANS (Figura 10). A β 42HCl e

A β 40PBS1 aparecem como agregados fibrilares em imagens de TEM (Figura HC, F). A β 40t=0, A β 42t=0, A β 40HCl e A β 42HBS aparecem como agregados amorfos (Figura HA, B, D, E). De maneira notável, os fibrilos de A β 40PBS1 apresentam níveis similares de fluorescência de ThT quando comparado com 5 A β 40HCl e A β 40t=0, enquanto que o A β 42HCl aumenta fortemente a fluorescência de ThT e CR.

Albumina de soro humana

Como se observa na Figura 12A, HSA desnaturada a uma concentração de 20 mg/ml aumenta fortemente a fluorescência de ThT, 10 enquanto que, a outras concentrações, não se observa aumento em comparação com HSA nativa. Não se observou agregados por meio de análise de TEM de HSA nativa ou HSA desnaturada a 1 mg/ml (Figura 12B, C). Agregados amorfos, com tamanhos aproximados de 500 nm, foram observados em HSA desnaturada a 2,5, 5 e 10 mg/ml (Figura 12D-F). O 15 tamanho dos agregados e o número relativo dos agregados aumenta em muito quando HSA foi desnaturado a 20 mg/ml (Figura 12G).

IgG de camundongo

Observou-se fluorescência incrementada de ThT e CR com as 20 preparações de IgG de camundongo que foram dobradas incorretamente usando-se diversos métodos, em comparação com IgG de camundongo nativa (Figura 13). A fluorescência de Tioflavina T e vermelho Congo são aumentadas da seguinte maneira:

ThT: IgG nativa < IgG base < IgG ÁCIDO \approx IgG 85°C

vermelho Congo: IgG nativa << IgG base < IgG ÁCIDO < IgG 85°C

25 No que se refere aos sinais de ThT comparou-se diferenças entre IgG BASE e IgG ÁCIDO com IgG a 85°C que são mais pronunciadas do que no caso de sinais de fluorescência de vermelho Congo. Conclui-se que todos os três métodos de dobramento incorreto resultaram em dobramento incorreto da IgG acompanhado de formação de estrutura β cruzada.

Apoplipoproteína A-I

ApoA-I desnaturada com calor a 100°C em tamponador com 100 mM de NaOH, resultou em um ligeiro aumento do sinal de fluorescência, e também do sinal de fluorescência de CR, quando se compara com ApoA-I nativa (Figura 14A e B). A diminuição observada da fluorescência de ThT e CR não se deveu a perda de proteína conforme medido com A280 nm (Figura 14C). A Figura 14B mostra que a fluorescência de CR de ApoA-I desnaturada a 37°C em tamponador com 100 mM de NaOH (pH elevado) foi ligeiramente incrementada em comparação com ApoA-I nativa. Embora não se tenha observado diferenças claramente perceptíveis nas intensidades de fluorescência de ThT ou CR, observa-se diferenças significativas na potência das preparações de ApoA-I dobradas incorretamente para ativar tPA/plasminogênio em um ensaio de ativação de plasminogênio mediada com tPA. As preparações de ApoA-I que foram aquecidas a 37°C ou 75°C representam ativadores relativamente moderados a potentes de tPA/plasminogênio (Figura 14D). ApoA-I dobrada incorretamente a 100°C é um ativador muito potente de tPA/plasminogênio. Na Figura 14E e F apresenta-se os resultados dos estudos ELISA para a determinação da presença de estrutura β cruzada e/ou conformação induzida por β cruzada nas diversas preparações de ApoA-I de plasma humano. ApoA-I nativa e ApoA-I com 100 mM de NaOH adicionados ao estoque de ApoA-I nativa, seguido de aquecimento a 37°C, ou 75°C ou 100°C, durante 30 minutos, são incorporadas nos estudos. Atingiu-se ligação semi-máxima de Fn F4-5 com 110 μ g/ml (ApoA-I nativa), 73 μ g/ml (ApoA-I dobrada incorretamente a 75°C), 48 μ g/ml (ApoA-I dobrada incorretamente a 100°C) e 5,2 μ g/ml (HbAGE). No caso de ApoA-I dobrada incorretamente a 37°C, não foi possível calcular ligação saturada. Estas figuras e as curvas mostram que, quando do dobramento incorreto de ApoA-I, a

afinidade para a ligação de Fn F4-5 aumenta no caso de ApoA-I dobrada incorretamente a 75 ou 100°C, acompanhado de um aumento do número total de sítios de ligação (Bmax). Adicionalmente, avalia-se a ligação de tPA com as preparações de ApoA-I. O maior número de sítios de ligação para tPA (Bmax) está presente em ApoA-I nativa, em comparação com as preparações de ApoA-I dobrada incorretamente s. tPA quase não se liga a ApoA-I aquecido, a alto pH, a 100°C (não se detectou ligação saturada). No caso de ApoA-I nativa, ApoA-I dobrada incorretamente a 37°C, ApoA-I misfolded a 75°C e HbAGE, obtém-se ligação semi-máxima com concentrações de tPA de 4,3, 3,1, 1,6 e 3,5 nM, respectivamente, indicando que dobramento incorreto a 37°C ou 75°C em condições básicas resulta em exposição de sítios de ligação de tPA com os quais tPA interage com maior afinidade, em comparação com ApoA-I nativa. A observação de que tPA se liga com afinidade relativamente elevada a ApoA-I nativa, com medidas comparáveis como observado com HbAGE, mostra que moléculas com estrutura β cruzada e/ou conformação induzida com β cruzada já estão presentes na ApoA-I nativa. Esta verificação é ainda mais substanciada através da observação de que ApoA-I nativa apresenta maior fluorescência de vermelho Congo fluorescência e Tioflavina T.

Níveis de endotoxina em amostras usadas como Exemplos

Níveis de endotoxina em diversas soluções usadas para os experimentos descritos nos Exemplos de 6 a 20 foram determinados com o kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Cambrex, QCL-1000). O kit foi usado de acordo com o protocolo do fabricante, exceto que agora se realizou medições usando metade do volume de ensaio descrito. Como uma referência, lipopolissacarídio (LPS, Sigma, 2,5 mg/ml L-2630 clone 011:B4) foi incorporado em diversas medições. Com os sinais obtidos com uma curva padrão de LPS, calculou-se uma estimativa do teor de endotoxina em

massa/volume com sinais em unidades de endotoxina (EU, *endotoxin units*) obtidas de amostras desconhecidas. Na Tabela 6, níveis de endotoxina em EU são apresentados para as soluções de consumo.

Exemplo 6

5 **'Enriquecimento cruzado': enriquecimento de IgIV humana no sentido de maior afinidade por proteína β cruzada 'A' também resulta em IgIV enriquecida com maior afinidade por proteína β cruzada 'B', 'C, 'D',...**

Nós mostramos previamente que IgIV Octagam enriquecido em matriz de BSA-AGE também aumentou a afinidade por outras proteínas dobradas incorretamente como A β 40, Hb-AGE e dOVA (ver Exemplo 4).
 10 Agora, nós expandimos este experimento enriquecendo IgIV em matriz de fibrilos de A β 40/A β 42, matriz de BSA-AGE, matriz de dIgIV ou matriz de dHSA e testes de ligação de IgIV enriquecida com várias proteínas β cruzada dobrada incorretamente s. Proteínas dobradas incorretamente foram
 15 imobilizadas relativamente a NHS-Sepharose. Fatores de enriquecimento com IgIV eluídos de cada uma das matrizes de afinidade foram determinados, entre outros, para a ligação a fibrilos de A β 40/A β 42, agregados de A β , HSA, dHSA, BSA-AGE, dOVA, my-globulinas e dmy-globulinas em um ELISA.

Materiais e métodos

20 HSA (Cealb, Sanquin, Países Baixos, lote 05C29H120A) e IgIV (Octagam, Octapharma, lote 50244018432) a 1, 2,5, 5, 10 ou 20 mg/ml foram dobradas incorretamente antes da imobilização sobre NHS-Sepharose (GE-Healthcare). HSA foi dobrada incorretamente em pH 2 (HCl) por meio de aquecimento a 65°C durante 6 horas, seguido de
 25 neutralização com NaOH. IgIV foi dobrada incorretamente por meio de aquecimento em etapas (0,5°C por minuto) de 25°C a 65°C, em 10 mM de tamponador NaPi (pH 8,1). NHS-Sepharose foi lavada 12 vezes com 1 mM de HCl em copos de filtração Amicon (Millipore, UFC30SV00) antes do uso. Para fins de imobilização, as cinco preparações de HSA dobrada

incorretamente ou preparações de IgIV foram misturadas (1: 2,5: 5: 10: 20 mg/ml numa relação de 5:4:3:2:1 (V: V: V: V: V)) e diluídas 3x em tamponador de imobilização (0,5 M de NaCl; 0,2 M de NaHCO₃). BSA-AGE (10,25 mg/ml) e fibrilos de A β 40/A β 42 (0,28 mg/ml) foram imobilizados de maneira análoga. Os fibrilos foram preparados como descrito na seção de Materiais. Em resumo, A β 40 foi incubado durante 186 h a 37°C, e A β 42 foi incubado durante 24 h em HCl. Estes fibrilos foram misturados a 1:1 em tamponador de imobilização. A matriz foi incubada em tamponador de imobilização de um dia para o outro e bloqueada com 0,1 M de Tris pH 8,5. A matriz foi lavada 3x com 0,1 M de Tris pH 8,5 e 3x com NaOAc 0,1 M; 0,5 M de NaCl. Estas etapas de lavagem foram repetidas quatro vezes. As matrizes foram incubadas com IgIV Octagam (50 mg/ml) durante 4 h ou de um dia para o outro. Coletou-se o perfluxo [('FT'), *flow-through*] de IgIV e a matriz foi lavada 12 vezes com HBS (solução salina tamponada com HEPES, 140 mM de NaCl, 10 mM de HEPES, 45 mM de CaCl₂, 0,005% de Tween20, pH 7,4) antes da eluição (2x 1 hora em 1,140 M de NaCl, 10 mM de HEPES, 45 mM de CaCl₂, 0,005% de Tween20, pH 7,4; 'eluado'). Eluados foram dialisados contra HBS antes de análise ulterior. O FT e eluado foram testados quanto à ligação a diversas proteínas imobilizadas usando um ELISA: fibrilos de A β 40/A β 42, agregados não-fibrilares de A β 40/A β 42, HSA, dHSA, BSA-AGE, nOVA e dOVA. Preparou-se quatro diferentes agregados não-fibrilares de A β 40/A β 42 como descrito na seção de Materiais e misturados a 1:1:1:1, a uma concentração de 400 μ g/ml. Resumidamente, A β 40 foi dissolvido em PBS1 e congelado a -80°C diretamente, A β 40 foi incubado durante 24 h em solução de HCl, A β 42 foi dissolvido em PBS1 e congelado a -80°C diretamente, e A β 42 foi dissolvido em HBS e incubado durante 24 h a 37°C. Fatores de enriquecimento foram calculados como descrito no Exemplo 4. Concentrações de proteína no FT e eluados foram

determinados usando-se um kit de ensaio de BCA (Pierce, nº de catálogo 23223) e usando-se IgIV Octagam para uma curva padrão.

Resultados

Figura 15 mostra um resultado típico de um experimento de enriquecimento de IgIV usando-se matrizes de afinidade de proteína β cruzada dobrada incorretamente. Obteve-se dados similares para combinações alternativas de IgIV enriquecida usando-se matriz com proteína dobrada incorretamente X e proteína imobilizada Y, Z,..., como discutido abaixo e como resumido na Tabela 7. No exemplo ilustrativo indica-se que regiões de afinidade que são selecionadas usando matriz de afinidade de fibrilo A6 ligam-se a diversas outras proteínas dobradas incorretamente com diferentes seqüências e comprimentos de aminoácidos, p. ex. BSA-AGE (Figura 15). Adicionalmente, IgIV enriquecida em matriz de BSA-AGE apresenta um fator de enriquecimento de aproximadamente 6 para ligação a fibrilos de A β 40/A β 42, em comparação com material de partida (Octagam IgIV). Em dois experimentos similares, nós obtivemos fatores de enriquecimento ainda mais elevados (25 e 53) para ligação de matriz de IgIV enriquecida com BSA-AGE a fibrilos de A β 40/A β 42. IgIV enriquecida em matriz de fibrilos de A β 40/A β 42 apresenta um fator de enriquecimento de 3 para ligação a fibrilos de A β 40/A β 42. Com IgIV de matriz de BSA-AGE é enriquecido mais eficientemente para ligação a A β 40/A β 42 do que se comparado com o enriquecimento observado com uma matriz de fibrilos de A β 40/A β 42.

O fator de enriquecimento para ligação a BSA-AGE é, em média, o maior para IgIV enriquecida em BSA-AGE-Sepharose. O fator de enriquecimento para ligação de IgIV enriquecida com fibrilos de A β 40/A β 42 para BSA-AGE é de aproximadamente 5, como determinado em três experimentos separados (Figura 15). O eluado de IgIV da BSA-AGE-Sepharose também é enriquecido para ligação a dOVA (fator de

enriquecimento 3). Em experimentos similares, também o eluado de IgIV da dIgIV-Sepharose e fibrilos de A β 40/A β 42-Sepharose foram enriquecidos para ligação a dOVA com fatores de enriquecimento 1,5 e 6, respectivamente. Este último fator de enriquecimento não foi observado em um dos três estudos consecutivos. Não se observou enriquecimento para ligação a nOVA, indicando que, com o procedimento de enriquecimento, obtém-se uma subpopulação de IgIV que se liga especificamente a contrapartes dobradas incorretamente de proteínas.

Determinou-se os fatores de enriquecimento para proteínas dobradas incorretamente adicionais. Uma série de concentrações de material de partida IgIV Octagam dificilmente liga-se a HSA imobilizada, my-globulinas e dmy-globulinas. Observa-se ligação incrementada de IgIV Octagam a dHSA quando comparado com ligação a HSA. Eluados de IgIV de todas as matrizes de proteína dobrada incorretamente foram enriquecidos para ligação a dHSA. A ligação a agregados não-fibrilares de A β 40/A β 42 dobrado incorretamente foi mais incrementada para IgIV enriquecida em matriz de fibrilos de A β 40/A β 42 e BSA-AGE-Sepharose (fatores de enriquecimento de aproximadamente 10). Eluado de IgIV de BSA-AGE-Sepharose é enriquecida para ligação a γ -globulinas de camundongo dobradas incorretamente (dmy-globulinas).

Considerado em conjunto, nós mostramos que IgIV Octagam enriquecida em uma matriz de afinidade compreendendo uma proteína β cruzada dobrada incorretamente 'A' também é enriquecida para ligação a proteína β cruzada dobrada incorretamente 'B', 'C', etc. Com matrizes de afinidade compreendendo fibrilos de A β 40/A β 42 ou BSA-AGE, obteve-se IgIV enriquecida com especificidade de amplo espectro, expressa como os fatores de enriquecimento relativamente maiores, para proteínas β cruzada misfolded (Tabela 7). O mais interessante é que, para a preparação de matrizes de afinidade, incorpora-se três proteínas β cruzada dobradas

incorrectamente não-fibrilares nos estudos, i.e. BSA-AGE, dHSA e dIgIV (ver Figura 6, 7, 12 na seção de Materiais e Métodos Gerais para imagens de TEM).

Com base nos resultados descritos aqui, proporciona-se um procedimento para selecionar aquelas regiões de afinidade uma composição de regiões de afinidade, que se ligam especificamente a proteínas dobradas incorrectamente compreendendo estrutura β cruzada, que contribuem especificamente para a patologia de uma determinada doença (ver também Figura 26). Por isso, em uma concretização, aplica-se consecutivamente uma combinação de duas matrizes β cruzada separadas com afinidade por regiões de afinidade que são capazes de ligar especificamente proteínas dobrada incorrectamente s. Como descrito mais detalhadamente abaixo, em qualquer uma de duas possíveis ordens, usa-se uma matriz I para selecionar regiões de afinidade que são capazes de interagir especificamente com qualquer estrutura β cruzada e/ou proteína dobrada incorrectamente compreendendo uma estrutura 3-D não nativa e/ou uma estrutura β cruzada e/ou amilóide, i.e. o *Misfoldome*, e também como uma matriz II com uma ou mais proteínas dobradas incorrectamente selecionadas que contribuem para a patologia de uma doença de interesse, para a qual se projeta regiões de afinidade terapêuticas para fins de tratamento, para selecionar aquelas regiões de afinidade que são capazes de ligar-se especificamente à proteína dobrada incorrectamente relacionada com doença. Quando as matrizes são aplicadas na ordem de I \rightarrow II, qualquer conjunto de proteínas compreendendo uma ampla faixa de possíveis aparecimentos de estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada, e/ou representativas para o *Misfoldome* completo, compreendendo ou não aquelas proteínas dobradas incorrectamente que contribuem para a patologia da doença-alvo de dobramento incorreto de proteína, são usadas para a preparação da matriz de afinidade I. Quando as matrizes são aplicadas na ordem de II \rightarrow I, o conjunto de proteínas

compreendendo uma ampla faixa de possíveis aparecimentos de estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada, e/ou proteínas representativas para a o *Misfoldome* completo, não compreendem aquelas proteínas dobradas incorretamente que contribuem para a patologia da doença-alvo de dobramento incorreto de proteína, que foram implicadas para projetar matriz de afinidade II. Evidentemente, uma pessoa versada na arte é capaz de projetar concretizações alternativas.

Exemplo 7

10 Enriquecimento específico e saturável de IgIV para afinidade para proteínas β cruzada dobradas incorretamente usando-se matrizes de afinidade com diversas β cruzada proteínas dobrada incorretamente s.

No Exemplo 4 usou-se matriz de HbAGE para isolamento de uma sub-população de imunoglobulinas (Ig) com afinidade por proteínas β cruzada misfolded de Octagam IgIV. Nós testamos a ligação de IgIV Octagam enriquecida e o residual esgotado, denominado perfluxo 'Flow Through' (FT), para ligação a várias proteínas β cruzada. Nós observamos que IgIV eluída da matriz de afinidade é efetivamente enriquecida para ligação a HbAGE (fator de enriquecimento de 600) e que o FT é esgotado para ligação a HbAGE (fator de enriquecimento de 0,5, ou alternativamente: fator de esgotamento de 2,0). Para testar se IgIV foi especificamente enriquecida em Sepharose-proteína β cruzada dobrada incorretamente para uma sub-população de moléculas de Ig com afinidade específica para a proteína β cruzada misfolded (no exemplo acima, HbAGE) e não para matriz, no corrente experimento o FT, após incubação de IgIV com matriz de BSA-AGE, foi contactado novamente com uma nova porção de matriz de BSA-AGE, que foi repetida em três etapas sucessivas. Se a ligação de IgIV à matriz de BSA-AGE for não específica, a IgIV poderia ser esgotada sem saturação em cada etapa consecutiva, terminando finalmente sem Ig no FT. Se a ligação for específica, obter-se-

á cada vez menos IgIV enriquecida quando da incubação de FT com uma nova quantidae de matriz de BSA-AGE.

Materiais e Métodos

Dez ml de matriz de NHS-Sepharose foram lavados 12x com 5 10 ml de HCl 1 mM antes do revestimento de BSA-AGE. O revestimento foi realizado de um dia para o outro em um dispositivo de rolamento a 4°C por meio de adição de 2,5 ml de solução de imobilização (5,1 mg/ml de BSA-AGE, 0,2 M de NaHCO₃, 0,5 M de NaCl, pH 8,3), seguido de uma etapa de 10 bloqueio com 0,1 M de Tris pH 8,5 durante 4 horas. Para remover a proteína não-revestida, realiza-se diversas etapas de lavagem, 3x com 0,1 M Tris pH 8,5 seguido de 3x tamponador ácido (0,1 M de acetato, 0,5 M de NaCl, pH 4,2). Estas etapas de lavagem foram repetidas 4 vezes. Pérolas foram armazeandas em HBS suplementado com 0,1% de azida de sódio. Antes da 15 ligação de Octagam (carga 5024018434), a matriz foi lavada 6x com HBS para remover a azida. A uma porção de 2200 µl de pérolas, adicionou-se 1100 µl de IgIV Octagam (50 mg/ml). As pérolas foram incubadas com Octagam durante 1 hora e coletou-se a fração FT (FT1). Guardou-se 200 ml deste FT e o volume restante foi aplicado em uma porção fresca de matriz de BSA-AGE. A 20 quantidade de matriz de afinidade foi ajustada ao volume restante do FT, em que a quantidade de matriz fresca agora é de 1800 µl. Novamente a matriz foi incubada durante 1 hora com FT1 antes da centrifugação para se coletar a segunda fração de FT (FT2). Isto foi repetido 4 vezes, resultando em 4 frações de FT (FT1-FT4). Todas as amostras de matrizs incubadas com os FTs consecutivos foram lavadas e as Igs ligadas foram eluídas duas vezes durante 25 1 h, quando da incubação com sal em alto teor (1,14 M de NaCl, 10 mM de HEPES, 4,5 mM de CaCl₂, 0,005% de Tween20, pH 7,4), resultando em 4 frações de eluição (E1-E4). Também Aβ e dOVA foram acoplados à matriz de NHS-Sepharose da mesma maneira como descrito acima. Aβ1-40 com mutação de tipo Holandês E22Q foi dissolvida em PBS a uma concentração

de 1 mg/ml e incubada em um dispositivo de rolamento à temperatura ambiente durante 2 h, enquanto era protegida da luz com folha. A A β 1-40 E22Q foi incubada com matriz a uma concentração de 0,66 mg/ml, em solução de imobilização. Para a preparação de matriz de afinidade de dOVA-5 Sepharose, ovalbumina foi desnaturada durante 1 h a 100°C em PBS a uma concentração de 5 mg/ml, e imobilizada em NHS-Sepharose em tamponador de imobilização a uma concentração de 3,5 mg/ml. Medições de Tioflavina T e vermelho Congo confirmaram a formação de estrutura β cruzada na amostra de dOVA dobrada incorretamente quando do aquecimento a 100°C. Fatores de enriquecimento das 4 frações de FT e os 4 eluados foram determinados em 10 um ELISA como descrito acima (Exemplo 4). Proteínas β cruzada dobradas incorretamente foram dOVA, Hb-AGE, BSA-AGE e A β 40.

Resultados e discussão

A imobilização de albumina de soro bovino extensivamente 15 glucose-6-phosphate-glicosada, BSA-AGE β cruzada dobrada incorretamente, sobre matriz de NHS-Sepharose resultou em uma eficiente matriz de afinidade para capturar ligação de IgIV da Octagam com ligação de BSA-AGE (Figura 16A e B). Mostra-se que uma fração de IgIV Octagam liga-se 20 especificamente à BSA-AGE-Sepharose. FT1 é esgotado em até 85% para moléculas de Ig com afinidade por afinidade por BSA-AGE (fator de enriquecimento 0,15). Este número aumenta em 94,6% (fator de enriquecimento 0,054) a 95% (fator de enriquecimento 0,050) e 96,2 (fator de enriquecimento 0,038) nas frações subseqüentes FT2-4. Os dados mostram 25 que o esgotamento de IgIV para moléculas com afinidade por BSA-AGE é obtida após um primeiro contato de IgIV com BSA-AGE-Sepharose. Para testar se moléculas de Ig ligadas especificamente à BSA-AGE na matriz, eluados (E1-4) foram testados em um ELISA quanto à ligação a BSA-AGE e determinou-se fatores de enriquecimento. E1 mostra a maior afinidade por binding a BSA-AGE, como esperado. O fator de enriquecimento diminui de

41,3 para E1 a 13,7 para E2 e de 11,8 para E3 a 8,7 para E4 nas etapas de ligação subseqüentes em que FTs subseqüentes foram contactados novamente com matriz de BSA-AGE. Isto mostra claramente que a quantidade de moléculas de Ig no FT com afinidade por BSA-AGE diminui drasticamente já 5 após o primeiro contato com matriz de afinidade. Isto tornou-se ainda mais claro em um experimento similar em que as frações de FT foram aplicadas 6 vezes na nova matriz de afinidade. Neste experimento, o fator de enriquecimento para FT tornou-se tão baixo quanto 0,031, de modo que, basicamente, não restaram propriedades de ligação de BSA-AGE (não 10 mostrado). As quantidades relativas de IgIV nos eluados de E1 a 4 foram de 89 µg (0,16%), 36 µg (0,23%), 18 µg (0,28%) e 17 µg (0,53%), respectivamente.

Determinou-se também as propriedades de ligação de IgIV enriquecida com BSA-AGE e perfluxos acompanhantes a A β 40, dOVA e 15 HbAGE. As frações de FT não foram esgotadas para ligação a A β 40 nem para dOVA, i.e. o fator de enriquecimento permaneceu em 1 (Figura 16C, E). Sem desejar ater-nos à teoria, uma possível explicação para esta observação é que, quando do enriquecimento com matriz de BSA-AGE, somente aquelas 20 regiões de afinidade são selecionadas que compreendem afinidade de faixa larga por BSA-AGE, e também por A β 40 e por dOVA. Aparentemente, muitas moléculas de Ig com afinidade relativamente alta por A β 40 ou dOVA, porém menos afinadas por BSA-AGE permanecem na fração de FT, explicando o modesto esgotamento. Figuras 16C e D, no entanto, mostram que os eluados 25 após contactarem IgIV com BSA-AGE Sepharose ainda são enriquecidos de moléculas de Ig com afinidade por A β 40, apesar de serem selecionados com base na afinidade por BSA-AGE. No caso de dOVA, observa-se um fator de enriquecimento de 1,8 com E1 (Figura 16E e F). O fator de enriquecimento é menor para eluados subseqüentes, mas não em paralelo com os fatores de enriquecimento decrescentes para ligação a BSA-AGE em eluados

consecutivos. Aparentemente, a fração de moléculas de Ig em IgIV Octagam com afinidade dupla, por BSA-AGE e também por dOVA, é relativamente pequena e, assim, enriquecimento com matriz de BSA-AGE resultados apenas em pouco enriquecimento para ligação a dOVA. A ligação das frações de FT 5 e as frações de eluado a HbAGE segue padrões similares como se observa no caso da ligação a BSA-AGE, mostrando epítopos que se superpõem em ambas as proteínas β cruzada dobradas incorretamente (Figura 16G e 16H). Em frações de FT consecutivas, a fração de moléculas de Ig que se liga a HbAGE diminui drasticamente. Em paralelo, o fator de enriquecimento para 10 ligação de IgIV enriquecida com matriz de BSA-AGE elua para HbAGE diminui quando se compara eluados consecutivos.

Em conclusão, estes experimentos mostram que, com a matriz de afinidade BSA-AGE, IgIV Octagam não só é enriquecida para ligação a BSA-AGE, mas também para ligação a outras proteínas β cruzada dobradas incorretamente como AB40, HbAGE e dOVA. Isto mostra que BSA-AGE β cruzada não-fibrilar dobrada incorretamente comprehende epítopos que também são expostos nas outras três proteínas β cruzada dobrada incorretamente s. Parece que IgIV comprehende uma fração de regiões de afinidade com afinidade por BSA-AGE que não apresenta grande 15 sobreposição com uma sub-população de moléculas de Ig com afinidade por A β 40 ou por dOVA.

Uma vantagem de se usar quantidades sub-ótimas de Sepharose-proteína β cruzada é que, em uma primeira incubação, apenas regiões de afinidade com afinidade relativamente elevada serão selecionadas. 20 Isto é uma vantagem para os fins em que apenas regiões de afinidade com alta afinidade deveriam ser usadas.

Em um experimento similar subseqüente, usou-se A β 40-Sepharose e dOVA-Sepharose para seis incubações consecutivas de FTs (não mostrado). Com a matriz A β 40, os FTs foram esgotados para ligação a BSA-

AGE, p. ex. após 6 ciclos de ligação de frações de FT sucessivas a quantidades frescas de matriz de A β 40, o fator de 'enriquecimento' foi de 0,45. A ligação de FTs após incubação com A β 40-matriz a dOVA é menos afetada, o fator de 'enriquecimento' é de 0,83 após seis etapas de ligação. Os 5 eluados da matriz de A β 40 são enriquecidos para ligação a BSA-AGE, com fatores de enriquecimento de 17, 4, 5, 3, 8, e 4. Estes eluados não se ligam de modo algum a dOVA. Isto mostra que a sub-população de regiões de afinidade em IgIV que se ligam a A β 40 efetivamente se sobrepõe à sub-população de moléculas de Ig que se liga a BSA-AGE, mas não à sub- 10 população de moléculas de Ig que se liga a dOVA.

Com dOVA-Sepharose o esgotamento de IgIV Octagam FT para ligação a dOVA já é sub-ótima (83%) com a relação aplicada de matriz de afinidade e IgIV, i.e. com incubações consecutivas de FTs com matriz de dOVA não se obtém redução adicional de ligação dos FTs a dOVA. Os 15 fatores de enriquecimento, que se lê efetivamente como fatores de 'esgotamento', para ligação das frações de FT a BSA-AGE ou A β 40 não são afetados e permanecem em torno de 0,8 para BSA-AGE e em 1 para A β 40. Os eluados, contudo, são enriquecidos para ligação a BSA-AGE e A β 40 (fatores de enriquecimento são de 5 e 14, respectivamente). Os fatores de 20 enriquecimento não aumentam em eluados obtidos durante etapas de ligação sucessivas usando-se os FTs consecutivos.

Novamente, os experimentos mostram que IgIV enriquecida usando matriz de afinidade com proteína β cruzada dobrada incorretamente 'A' também é enriquecida para ligação a proteína β cruzada dobrada incorretamente 'B'. Estes experimentos também mostram que, com os ajustes experimentais, a sub-população de moléculas de Ig em IgIV Octagam que se liga a A β -Sepharose não se sobrepõe à sub-população de regiões de afinidade em IgIV Octagam que se liga a dOVA. No caso de BSA-AGE-Sepharose as 25 quantidades absolutas e relativas de IgIV enriquecidas em eluados de E1-6

foram de 31,5 µg (0,084%), 11,2 (0,062), 9,5 (0,098), 7,2 (0,16), 4,1 (0,145) e 0,27 µg (0,032%), respectivamente. No caso de A β 40 estes números foram de 33,9 (0,09), 29,4 (0,17), 11,2 (0,11), 9,45 (0,21), 9,8 (0,35) e 3,8 µg (0,22%), respectivamente. Para a matriz de dOVA estas figuras foram de 27,6 (0,07), 5 22,4 (0,07), 21,8 (0,12), 17,1 (0,15), 11,5 (0,13) e 2,8 µg (0,06%).

Os resultados também mostram que regiões de afinidade com especificidade por proteínas β cruzada dobradas incorretamente são selecionadas particularmente usando-se uma matriz de afinidade com proteína β cruzada dobrada incorretamente imobilizada. O esgotamento de uma 10 quantidade de IgIV é saturável, ou seja, o esgotamento de IgIV de uma sub-população com especificidade para proteínas dobradas incorretamente é obtido usando-se matriz de proteína dobrada incorretamente .

Embora BSA, Hb, A β 40 e OVA não apresentem homologia de seqüências e, em seu estado nativo, não apresentem homologia estrutural 3D, 15 BSA-AGE, HbAGE, A β 40 e dOVA compartilham a presença de extensões de aminoácidos com uma conformação β cruzada. Portanto, nossos resultados mostram que IgIV compreende uma sub-população de regiões de afinidade com amplo espectro de afinidade por conformação β cruzada ou conformação induzida com β cruzada em várias proteínas que não apresentam homologia 20 estrutural 3D em sua forma nativa e/ou não apresentam homologia de seqüências. Além disso, os resultados com A β -Sepharose e ELISAs de dOVA subseqüentes mostram que a estrutura β cruzada aparece com detalhes estruturais variados, resultando em ligação de diferentes sub-populações de IgIV, mas os mesmos corantes de β cruzada, i.e. vermelho Congo, ThT (ver 25 'Materiais e Métodos Gerais para os exemplos de 6 a 20'.

Exemplo 8

A liqüefação de IgIV Octagam e IgIV enriquecida, obtida com o uso de uma matriz de afinidade de HbAGE, a fibrina, agregados de A β e ovalbumina dobrada incorretamente .

Materiais e Métodos

Para testar se IgIV Octagam compreende moléculas de Ig com afinidade por fibrina, que são polímeros que compreendem estrutura β cruzada, (ver pedido de patente US2007003552, parágrafo [187, 188]), 5 realiza-se ELISAs em que a fibrina é formada *in situ* incubando-se fibrinogênio com trombina/fator IIa nos poços da placa de ELISA. Adicionalmente, para ligação de comparação de IgIV a ovalbumina dobrada incorretamente imobilizada (dOVA) com características de uma proteína com estrutura β cruzada (ver seção de Materiais) e a agregados de amilóide- β é 10 avaliada.

Ovalbumina (Sigma, A5503 de classe V) foi dissolvida cuidadosamente em PBS a uma concentração de 1 mg/ml, incubada durante 20 minutos a 37°C, subsequentemente durante 10 minutos à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento, e armazenada a -80°C → referida 15 como nOVA. nOVA foi aquecida de 30°C a 85°C a 5°C min⁻¹. Esta etapa foi repetida quatro vezes, e OVA desnaturada foi armazenada subsequentemente a -80°C → referida como dOVA std. Para estudos de ligação com dOVA std, revestiu-se 5 μ g/ml de dOVA std. Para analisar a afinidade de IgIV Octagam por A β imobilizada, os estoques de A β 40t=0 e A β 42t=0 foram incorporados 20 nos estudos de ligação. Ambas as preparações AB são revestidas a 5 μ g/ml. HbAGE também é revestida a 5 μ g/ml e determina-se a análise de ligação a esta proteína β cruzada como um controle positivo. Para testar a ligação de IgIV e tPA a fibrina imobilizada com uma conformação β cruzada, aplicou-se 25 o protocolo a seguir para se obter poços de placas ELISA de 96 poços com fibrina imobilizada:

1. Preparar um estoque de fator IIa de 2 U/ml em H₂O a partir de um estoque de trombina/fator IIa convencional (plasma humano, High Activity, Calbiochem, Alemanha, nº do produto: 605195)
2. Preparar uma solução de fibrinogênio a 50 μ g/ml (Fib3L

2170L em 20 mM de citrato de sódio-HCl pH 7,0, Kordia, Países Baixos) em PBS a partir de uma solução de consumo que é centrifugada durante 10 minutos a 16.000*g antes do uso.

3. Pipetar 5 μ l de solução de fator IIa nos poços, adicionar 100 μ l de solução de fibrinogênio, ou adicionar 100 μ l de PBS nos poços de controle. Concentrações finais: [fator IIa] \approx 0,1 U/ml, [fibrinogênio] \approx 47,5 μ g/ml.

4. incubar durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação cuidadosa. Controles de revestimento são realizados usando-se 10 anticorpo de fibrinogênio anti-humano (DAKO-Cytomation, P0455).

5. Poços esvaziados são lavados duas vezes com TBS/0,1% de Tween20. TBS: solução salina tamponada com Tris com 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 7,3.

Primeiramente, poços revestidos com A β , dOVA, fibrina ou tamponador de revestimento de controle são recobertos em triplicata com séries de concentrações de 50 μ l/poço de IgIV ou tPA durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação cuidadosa. Na série de tPA, inclui-se 10 mM de ϵ ACA no tamponador de ligação para evitar a ligação dos domínios *kringle* a radicais arginina e lisina expostos da fibrina, e dirigir a ligação do domínio de dedo de tPA à conformação de estrutura β cruzada exposta. Os sinais obtidos com poços de controle revestidos com fIIa sem fibrinogênio que são sobrepostos com a série de concentrações de tPA ou IgIV, são subtraídos dos poços correspondentes com fibrina imobilizada. Para todos os 15 sinais obtidos com proteínas imobilizadas com estrutura β cruzada, sinais 20 correspondentes obtidos com poços revestidos com tamponador de revestimento são subtraídos como fundo.

Em uma segunda série de experimentos, avaliou-se a ligação de IgIV enriquecida, que foi obtida mediante incubação da matriz de afinidade de HbAGE com Octagam IgIV, a fibrina.

Resultados e discussão/conclusões

Nós determinamos previamente que polímeros de fibrina apresentam características reminiscentes a proteínas com propriedades similares a amilóide, como ligação de corantes específicos para β cruzada, 5 vermelho Congo e Tioflavina T, e ativação de tPA e plasminogênio. Nós também determinamos que IgIV Octagam compreende uma sub-população de Ig's que apresenta afinidade por proteínas com estrutura β cruzada. Assim, nós avaliamos se IgIV se liga a fibrina em um ELISA. Na Figura 17 mostra-se 10 que a IgIV liga-se efetivamente a controle positivo HbAGE, como foi avaliado previamente (ver, por exemplo, Figura 1), e também a preparações de dOVA, A β 40 e A β 42. A afinidade por HbAGE é relativamente elevada, enquanto que a afinidade pelas três proteínas dobradas incorretamente referidas por último, é um tanto menor. Quando se considera a fibrina, tanto 15 tPA como também IgIV ligam-se de uma maneira saturável. A ligação semi-máxima da IgIV à fibrina é obtida a 200 μ g/ml (aproximadamente 1,3 μ M) e este valor é comparável com os valores obtidos com preparações de dOVA e 20 A β . Estas verificações mostram que IgIV Octagam não só se liga às proteínas compreendendo estrutura β cruzada usadas rotineiramente, i.e. HbAGE, dOVA, A β , mas também às moléculas compreendendo β cruzada recentemente identificadas na fibrina.

Estes resultados mostram que IgIV Octagam compreende uma sub-população de Ig's com afinidade por fibrina. Conseqüentemente, o uso 25 desta sub-população é benéfica em desordens em que a vida útil prolongada da fibrina, devido à competição de fibrina ligando IgIV com tPA, contribui para menores sintomas de doenças ou de problemas de saúde, ou em desordens em que a formação prejudicada de fibrina é benéfica, que é obtida introduzindo-se IgIV ligada a fibrina, que interfere com a polimerização de monômeros de fibrina.

Exemplo 9

Ligaçāo de regiōes de afinidade de IgIV a apoliproteína A-I de plasma humano dobrada incorretamente

Fundamentos

Amilóide nos meniscos da junta do joelho é uma das formas mais comuns de amiloidose localizada e é prevalente, de forma crescentemente prevalente, nos idosos. Os depósitos amilóides podem resultar em problemas de juntas que, finalmente, requerem ação cirúrgica. A apoliproteína A-I (ApoA-I) é detectável nas juntas dos joelhos, forma amilóide e está implicada numa variedade de doenças e de problemas de saúde, incluindo problemas de juntas. A ApoA-I é o componente protéico principal da lipoproteína de alta densidade. ApoA-I amilóide também é encontrada em placas ateroscleróticas e artérias de pacientes com aterosclerose. Conseqüentemente, a remoção de ApoA-I dobrada incorretamente da circulação ou alhures no corpo é benéfica para pacientes que sofrem de doenças associadas com ApoA-I amilóide. Nós testamos se regiões de afinidade são capazes de ligar-se a ApoA-I misfolded, e se os meios e métodos revelados são capazes de selecionar regiões de afinidade enriquecidas para aquelas regiões de afinidade que se ligam a ApoA-I. Os resultados apresentados abaixo mostram que regiões de afinidade reconhecem efetivamente ApoA-I e que os métodos e meios revelados são vantajosos para o isolamento de regiões de afinidade capazes de se ligarem a ApoA-I. Assim, a ApoA-I serve como outro exemplo de uma proteína associada com doença para a qual regiões de afinidade são isoladas.

Materiais e Métodos

Para análise das propriedades de ligação de IgIV enriquecida que foi obtida com a seleção de regiões de afinidade usando HbAGE-Sepharose que foi incubada com Octagam IgIV, no sentido de ApoA-I de plasma humano, realiza-se ELISAs diretos com preparações de ApoA-I imobilizada. Para estes estudos, incorpora-se ApoA-I nativa, e ApoA-I em

100 mM de NaOH, aquecido durante 30 minutos a 37°C, ou 75°C, 100°C, seguido de ajuste do pH com 5 M de NaOH, de volta ao pH fisiológico. Como se pode ver na Figura 14, observa-se a seguinte ordem na positividade relativa para marcadores β cruzada selecionados, i.e. aumento da fluorescência do

5 vermelho Congo, aumento da fluorescência de ThT, ativação de tPA/plasminogênio, ligação de fibronectina dedo4-5 e ligação de tPA:

vermelho Congo: 100°C < nativa < 37°C < 75°C

ThT: 100°C < nativa < 75°C < 37°C

tPA/PIg act.: fundo = nativo < 37°C < 75°C << 100°C

10 Fn F4/5 ligação: nativa = 37°C < 75°C < 100°C

tPA ligação: fundo = 100°C < nativa \approx 37°C \approx 75°C

A partir destas comparações fica claro que até mesmo ApoA-I nativa apresenta características de uma proteína dobrada incorretamente com estrutura β cruzada, i.e. isto aumenta a fluorescência do vermelho Congo e

15 ThT, e liga-se a tPA. De uma forma geral, as preparações de ApoA-I obtidas por meio de aquecimento a 37°C ou 75°C em condições básicas atuam como composições com um teor relativamente elevado de estrutura β cruzada. No entanto, quando se considera apenas a potência para ativar serina proteases (tPA/plasminogênio), claramente a ApoA-I aquecida a 100°C é descrita como 20 a composição com o maior teor de β cruzada 'biologicamente ativo'.

Resultados e discussão

Na Figura 18 apresenta-se curvas de ligação para ligação de IgIV enriquecida a ApoA-I nativa e três preparações dobradas incorretamente com calor/base. Quando se considera IgIV enriquecida, kD's encontram-se em

25 ordem crescente de 1,3, 1,6, 2,0 e 2,8 μ g/ml para ApoA-I a 75°C, ApoA-I a 37°C, ApoA-I nativa e ApoA-I a 100°C, respectivamente. O número de sítios de ligação é similar para ApoA-I nativa e ApoA-I a 75°C, um tanto maior para ApoA-I a 37°C, e muito menor para ApoA-I a 100°C. A partir de medições de A280 concluiu-se que o teor de proteína é similar nas quatro

preparações. Diferenças no número máximo de sítios de ligação podem ser refletidas por diferenças na eficiência de revestimento. No entanto, é a ApoA-I a 100°C que expõe a maior parte dos sítios de ligação para Fn F4-5 (Figura 14E). Quando se compara a afinidade de IgIV enriquecida para as quatro 5 preparações de ApoA-I com a afinidade de Octagam IgIV, de que se selecionou IgIV enriquecida, fatores de enriquecimento, calculados divindo-se as kD's obtidas com IgIV Octagam pelas kD's obtidas com IgIV enriquecida são de 4,8 para ApoA-I nativa e para ApoA-I a 75°C, enquanto que para ApoA-I-37°C o fator de enriquecimento é de 12,8. Para ApoA-I a 10 100°C não foi possível determinar um fator de enriquecimento, embora não se tenha detectado qualquer ligação de Octagam IgIV, e ligação modesta de IgIV enriquecida. No entanto, o enriquecimento para ligação a ApoA-I a 100°C é refletido pelas características de ligação como descrito na Figura 18C.

Em conclusão, os sinais obtidos com ApoA-I 'nativa' para 15 marcadores β cruzada são refletidos em características de ligação de IgIV (enriquecida), substanciando adicionalmente a conclusão de que a ApoA-I nativa compreende estrutura β cruzada, da forma como é adquirida do fabricante. Além disso, conclui-se que o aumento relativo da fluorescência de ambos, vermelho Congo e ThT, quando do contato com 20 preparações de ApoA-I tem poder preditivo com relação às características de ligação esperadas de IgIV (enriquecida), em que a fluorescência de ThT apresenta a correlação mais forte. A partir dos dados de ELISA com IgIV enriquecida e ApoA-I aquecida a 37°C conclui-se que esta preparação de ApoA-I compreende estrutura β cruzada ou conformação de 25 proteína induzida com estrutura β cruzada que apresenta a semelhança mais estreita com a conformação de proteína de HbAGE usada para enriquecimento de IgIV, e/ou o número mais comparável de epítopos com estrutura β cruzada expostos que servem como sítios de ligação em ApoA-I para IgIV enriquecida. De uma forma geral, os dados mostram

que aplicando-se uma matriz de afinidade de β cruzada apropriada, seleciona-se regiões de afinidade que se ligam a ApoA-I dobrada incorretamente. Desta maneira, obtém-se uma composição terapêutica que representa uma pista de regiões de afinidade para uso em regimes de tratamento de doenças ou problemas de saúde relacionados com a presença de ApoA-I dobrada incorretamente, como por exemplo, tratamento de dor causada por amiloidose das juntas dos joelhos, dissolução de deposição de amilóide nas artérias, e tratamento de aterosclerose acompanhado por acúmulo de amilóide de ApoA-I em placas.

Exemplo 10

Moléculas de IgG dobradas incorretamente compreendem o epítopo-alvo do Fator Reumatóide, auto-anticorpos presentes em 70-80% de pacientes com artrite reumatóide.

15 Materiais e métodos

Dobramento incorreto de IgG e análise de estrutura

Nós testamos nossa hipótese de que Fator Reumatóide (RF, *Rheumatoid Factor*) humano, um anticorpo presente em 70 a 80% de pacientes com artrite reumatóide (RA, *Rheumatoid Arthritis*), se liga a β cruzada ou conformação de proteína induzida com β cruzada no auto-antígeno de IgG. Nós verificamos que constitui senso comum para a detecção de ligação de IgG por RF [Fator Reumatóide], que é, particularmente, uma subclasse de IgM (embora também ocorra RF de IgG e IgA), com domínios Fc presumivelmente predominantes de seu auto-antígeno alvo, agregação da IgG quando da desnaturação com calor a 65°C é uma exigência. Nós aquecemos IgG humana purificada (Octagam IgIV) a 65°C de acordo com os procedimentos descritos na seção de Materiais e Métodos Gerais dos Exemplos de 6 a 20, e analisamos a estrutura por meio de fluorescência de vermelho Congo, fluorescência de Tioflavina T, fluorescência de ANS e análise da ligação e ativação de tPA. O

aumento da fluorescência de vermelho Congo e Tioflavina T foi determinado com suspensões de IgIV diluídas a 100 µg/ml. Subsequentemente, determinou-se o aumento da atividade de tPA/plasminogênio usando um ensaio cromogênico padronizado (como descrito no pedido de patente WO2006101387, parágrafo 5 [0195]). Ligação de tPA na presença de 10 mM de ácido ϵ -amino capróico a IgIV dobradas incorretamente foi avaliado em um ELISA convencional, como descrito aqui previamente, com imobilizada A β 40t=0 como um controle positivo para ligação de tPA.

Resultados

10 Aumento da fluorescência de vermelho Congo e ThT por meio de IgG desnaturada

O aumento da fluorescência do vermelho Congo e da fluorescência de Tioflavina T foi medido com IgIV dobrada incorretamente desnaturada com calor. Com base nos sinais relativos comparados com IgIV 15 de controle, IgIV aquecida é dobrada incorretamente com características marcantes de uma proteína dobrada incorretamente com uma conformação β cruzada (Figura 19A, B).

Ligação de tPA a IgG dobrada incorretamente

Nós observamos que tPA, que é um componente das Via β cruzada, liga-se a dIgIV (Figura 19E). Esta observação demonstra 20 adicionalmente que dIgIV é dobrada incorretamente de uma maneira em que componentes da Via β cruzada reconhecem as características estruturais recentemente introduzidas.

Ativação de tPA/Plg por IgG dobrada incorretamente

25 Agora que nós observamos ligação de tPA a dIgIV, nós testamos se dIgIV ativa tPA/plasminogênio em um ensaio cromogênico de tPA/plasminogênio. IgIV nativa não induz ativação de plasminogênio mediada com tPA (Figura 19D). No entanto, as amostras de IgIV misfolded desnaturadas com calor ativam tPA/plasminogênio, i.e. ambas as IgIV

desnaturadas a 65°C em tamponador com pH 2 (não mostrado), e também a IgIV desnaturada com calor em tamponador de NaPi.

Discussão

Introdução de dobramento incorreto com estrutura β cruzada em IgG

5 desmascara epítopos no auto-antígeno do (RF, fator reumatóide)

IgG humana aquecida a 65°C apresenta uma série de características estruturais comumente observadas com proteínas dobradas incorretamente similares a amilóide com estrutura β cruzada. A temperatura aplicada encontra-se ligeiramente acima da temperatura de 61°C em que se 10 induz alterações conformacionais, de acordo com medições de calorimetria diferencial de varredura descritas previamente por outros investigadores. IgG dobrada incorretamente aumenta a fluorescência de vermelho Congo e Tioflavina T, liga-se a tPA e ativa tPA/plasminogênio. Que o saibamos, nós somos agora os primeiros a reportar que auto-antígeno de IgG dobrada incorretamente para RF expõe neo-epítopos compreendendo propriedades 15 estruturais reminiscentes a amilóide com uma conformação β cruzada. De forma alinhada com nossas observações, o fato reportado de que a atividade de protease de tPA e fator XII, duas serina proteases ligadas e que são ativadas por proteínas compreendendo estrutura β cruzada, é aumentada em 20 pacientes de RA [artrite reumatóide], é explicada agora.

Nossas observações apontam o RF [fator reumatóide] como uma fonte útil de anticorpos humanos das classes IgG, IgA e IgM que apresentam especificidade por estrutura β cruzada, e/ou por conformações induzidas por estrutura β cruzada em proteínas. Combinando com nossas observações de que 25 uma sub-população de moléculas de Ig em IgIV se liga a moléculas de IgIV dobradas incorretamente (ver Tabela 7) e/ou a γ -globulinas de mouse dobrada incorretamente (ver Exemplo 19), nós concluímos que, efetivamente, a sub-população isolada em IgIV com afinidade por Ig dobrada incorretamente ou proteínas dobradas incorretamente em geral é reminiscente do RF. Ambas as

fontes de regiões de afinidade com afinidade por auto-antígeno de IgG dobrada incorretamente são benéficas para o desenvolvimento de terapêuticas à base de região de afinidade destinadas ao tratamento de doenças ou problemas de saúde associados com a ocorrência de IgGs dobrada incorretamente s.

5 **Exemplo 11**

Determinação de ocorrência relativa de subclasses de imunoglobulina e isótipos de IgG em diversas preparações de regiões de afinidade

Métodos

Para determinar o teor relativo de isótipos de IgG IgG1, IgG2, 10 IgG3 e IgG4 presentes na IgIV enriquecida obtida como eluado de uma matriz de afinidade de HbAGE, nós concentrarmos 550 µl da amostra usando dispositivos de centrifugação Nanosep 10k (Pall life science). A concentração final de IgIV enriquecida concentrada foi de 890 µg/ml, como determinado comparando-se a absorbância a 280 nm com uma curva padrão determinada 15 com diluições de IgIV Octagam em PBS. A isotipificação e determinação da abundância relativa de subclasses de Ig foi determinada usando-se métodos padronizados do Laboratory for Medical Immunology (UMC Utrecht, Países Baixos), com o nefelômetro Image Immunochemistry (Beckman Coulter). Para fins de comparação, IgIV Octagam de que IgIV enriquecida foi extraída, 20 também foi analisada quanto à abundância relativa de isótipos de IgG. Adicionalmente, determinou-se o aparecimento de subclasses de Ig. Além da amostra de IgIV enriquecida concentrada, também se submeteu material não-concentrado a 103 µg/ml em PBS a isotipificação e determinações de subclasses. De acordo com o fabricante, IgIV Octagam preparada da fração de Ig de mais 25 de 3500 doadores humanos, consiste de IgG's ($\geq 95\%$), com uma fração menor de IgA ($\leq 0,4\%$) e uma quantidade em traços $\leq 0,2\%$ de IgM. A distribuição sobre os quatro isótipos de IgG é: IgG1, 62,6%; IgG2, 30,1%; IgG3, 6,1%; IgG4, 1,2%. De acordo com o fabricante, na IgIV $\leq 3\%$ das moléculas de Ig são agregadas, e mais de 90% das moléculas são monômeros e dímeros.

Resultados e discussão

No caso de Octagam IgIV, todas as sete medições para determinação de subclasses e isotipificação de IgG encontram-se listadas na Tabela 8. Com IgIV Octagam confirmou-se que, efetivamente, a maior parte das Igs é da subclasse de IgG, i.e. aproximadamente 99,5%. A distribuição entre os quatro isótipos de IgG é bastante próxima do que é reportado na folha de dados da IgIV Octagam (como descrito na seção de Métodos). No caso da IgIV enriquecida não-concentrada a distribuição de subclasses não pôde ser determinada devido ao menor limite de detecção do nefelômetro Image Immunochemistry. A determinação da presença relativa de IgG2 também foi prejudicada devido a limites de detecção. Foi possível determinar concentrações de IgG1, IgG3 e IgG4 (Tabela 8). A concentração total de Ig em IgIV enriquecida foi estabelecida como sendo de 103 µg/ml, usando-se a técnica de determinação de concentração de proteína de BCA. Calculou-se com o nefelômetro que a concentração total de Ig foi de 108 µg/ml. Com IgIV enriquecida concentrada foi possível determinar as concentrações para todos os quatro isótipos de IgG, e também o teor total de IgG. Níveis de IgA e IgM foram menores do que o limite de detecção. Na fração de IgIV enriquecida, a abundância relativa de IgG3, quando comparada com IgG1 como uma referência, é aumentada em aproximadamente duas vezes se comparado com o material de partida IgIV Octagam do qual a IgIV enriquecida foi selecionada com matriz de afinidade de HbAGE. A abundância relativa de IgG2 e IgG4, quando comparada com a quantidade de IgG1, é pouco alterada com o enriquecimento. Assim, em conclusão, uma sub-população de IgG3 apresenta afinidade relativamente maior pela HbAGE-Sepharose do que os outros isótipos.

Com base no resultado de que todos os quatro isótipos de IgG são determinados na fração de IgIV enriquecida, conclui-se que a fração de Ig consiste de uma mistura de pelo menos quatro anticorpos humanos diferentes.

O aparecimento de IgIV enriquecida como um esfregaço em um gel de focalização isoelétrica, em condições não redutoras, também mostra que mais de um anticorpo monoclonal está presente na seleção de IgIV enriquecida (não mostrado). A concentração de anticorpos de IgA e IgM na população de 5 regiões de afinidade enriquecidas não pode ser determinada, mas a presença de quantidade de traços de um ou mais clones de IgA e IgM não pode ser excluída com base nos resultados.

Exemplo 12

10 Análise da influência de regiões de afinidade de IgIV sobre a agregação de plaquetas induzida por lipoproteína de baixa densidade dobrada incorretamente (oxLDL, *misfolded low density lipoprotein*), e análise da ligação de IgIV enriquecida, obtida de IgIV Octagam por meio de 15 aplicação de uma matriz de afinidade de HbAGE, a oxLDL.

LDL modificado, por exemplo, devido a oxidação (oxLDL) 20 desempenha um papel proeminente em doenças devastadoras e problemas de saúde, como por exemplo, aterosclerose. Nós demonstramos recentemente que, quando da oxidação, introduz-se características estruturais na porção de proteína do LDL, i.e. ApoB-100, que são reminiscentes da conformação β cruzada amilóide (ver pedido de patente WO2003NL00501). Nós avaliamos agora a possibilidade de que IgIV compreende regiões de afinidade dirigidas à 25 conformação β cruzada ou conformação induzida com β cruzada em oxLDL humano, e, ainda mais preferivelmente, em ApoB-100. Para este estudo, usa-se a IgIV enriquecida que foi obtida por meio de extração com HbAGE-Sepharose cujas regiões de afinidade de IgIV humana Octagam, que se liga especificamente à proteína dobrada incorretamente imobilizada (ver Exemplo 6, 7). Adicionalmente, IgIV Octagam é incluído nos estudos.

Materiais e métodos

Avaliou-se a influência de IgIV Octagam sobre a ativação de plaquetas sanguíneas humanas por oxLDL ou por TRAP (peptídeo ativador de

receptor de trombina, aminoácidos: SFLLRN). A oxLDL foi preparada incubando-se LDL purificado de sangue humano compreendendo FeSO_4 (ver seção de Materiais de Métodos do Exemplo 2 para mais detalhes). Determinou-se um grau de oxidação de 56% medindo-se o teo de dieno. Como determinado 5 previamente (pedido de patente WO2003NL00501), quando da oxidação o oxLDL aumenta a fluorescência de Tioflavina T (dados não mostrados, ver pedido de patente US2007003552 para exemplos). A agregação de plaquetas foi seguida ao longo do tempo em um agregômetro (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, E.U.A.) durante 15 minutos a 37°C a 900 rpm. Um volume de 270 μl de 10 suspensão de plaquetas (200.000/ μl) foi incubado com 30 μl de solução contendo amostras para análise em concentrações indicadas. Para experimentos de inibição com IgIV, 270 μl de suspensão de plaquetas foram incubados com 0,3 mg/ml de fibrinogênio (esgotado de plasminogênio, fibronectina e fator de von Willebrand factor, Enzyme Research Laboratories, Lafayette, IN, E.U.A.), 25 μl de LDL 15 oxidado, LDL nativo (nLDL) ou solução de TRAP e 5 μl de solução com IgIV. Em experimentos com inibidores, oxLDL, nLDL ou TRAP foram pré-incubados com concentrações crescentes de IgIV, a 22°C durante 10 minutos. A agregação máxima foi expressa como um percentual da resposta induzida com 8 μM de TRAP, que foi ajustada arbitrariamente em 100%.

20 A ligação de Octagam IgIV, IgIV esgotada (perfluxo após contactar IgIV com HbAGE -Sepharose) e IgIV enriquecida, a oxLDL foi avaliada usando-se um ELISA. Como um controle positivo, testou-se a ligação das regiões de afinidade preparações com BSA-AGE imobilizada.

Resultados e discussão

25 Na Figura 20A observa-se que IgIV Octagam inibe eficientemente a ativação de plaquetas induzida com oxLDL e a agregação de uma forma dependente da dose. A IgIV não influencia a agregação de plaquetas quando da ativação com TRAP. O baixo nível de agregação observado quando da exposição de plaquetas a LDL nativa não é alterado

quando o LDL nativo é pré-incubado com a série de concentrações de IgIV.

Em uma montagem ELISA direta avaliou-se a ligação de regiões de afinidade a LDL oxidado, e a afinidade relativa por oxLDL da IgIV que foi enriquecida usando matriz de afinidade de HbAGE dobrada incorretamente foi comparada com a afinidade de IgIV esgotada, recuperada como perfluxo da matriz de afinidade, e com material de partida de Octagam IgIV, usado como uma fonte para selecionar regiões de afinidade com afinidade por proteínas β cruzada dobrada incorretamente s. Características de ligação são comparadas com aquelas obtidas com BSA-AGE, outra proteína dobrada incorretamente. Na Figura 20 descreve-se os resultados dos estudos de ligação. Comparação das propriedades de ligação de IgIV enriquecida e material de partida com BSA-AGE e oxLDL, mostra que a seleção de regiões de afinidade usando matriz de HbAGE resulta em maior afinidade de IgIV enriquecida por ambas as proteínas dobrada incorretamente s. O fator de enriquecimento no sentido da ligação de albumina glicosada ou oxLDL, expresso como a relação entre os valores de kD obtidos com ligação da amostra de IgIV de partida, e calculou-se os valores de kD obtidos com IgIV enriquecida. No caso de BSA-AGE, o fator de enriquecimento é de 45. No caso de oxLDL, o fator de enriquecimento é de 27. Dificilmente o perfluxo liga-se a ambas as proteínas dobrada incorretamente s, indicando que, novamente, o esgotamento de IgIV de regiões de afinidade com especificidade por proteínas dobradas incorretamente usando HbAGE-Sepharose ocorre de forma bastante eficiente, reminiscente do que foi descrito no Exemplo 7.

Anticorpos, administrados passivamente ou induzidos por meio de vacinação, são considerados geralmente como bons terapêuticos para o tratamento de um número crescente de doenças. LDL modificado, incluindo LDL oxidado, é um alvo-candidato para o tratamento de doenças, notavelmente aterosclerose, associada com maior formação e deposição de LDL modificado. Estes resultados demonstram que o método revelado é

capaz de selecionar regiões de afinidade, como anticorpos humanos que se ligam preferivelmente a proteínas modificadas, compreendendo características de estrutura β cruzada, como LDL oxidado. Referidos anticorpos são usados, de preferência, para a detecção e, de preferência, para o tratamento de doenças, como aterosclerose, associadas com a formação de proteínas dobrada incorretamente s, de preferência, LDL dobrado incorretamente como uma consequência de modificação, como oxidação. Adicionalmente, aquelas regiões de afinidade selecionadas são usadas, de preferência, como moléculas de modelo apresentando seqüências de aminoácidos e características estruturais 3D de regiões de afinidade com afinidade por proteínas dobrada incorretamente s, for o projeto de regiões de afinidade sintéticas (ver Exemplo 20).

Na Figura 2OE, mostra-se que a IgIV liga-se de forma saturável ao oxLDL usado para ativação das plaquetas. Na Figura 2OG mostra-se que regiões de afinidade que são selecionadas com base em sua afinidade por Hb-AGE dobrada incorretamente também se ligam com maior afinidade a oxLDL, quando comparado com IgIV Octagam de que a IgIV enriquecida foi selecionada. Em conjunto com o efeito inibidor observado da IgIV sobre agregação de plaquetas induzida com oxLDL, nossos resultados mostram que IgIV comprehende regiões de afinidade com especificidade por ApoB100 dobrada incorretamente e que as regiões de afinidade são capazes de interferir em respostas de células a proteínas dobrada incorretamente s, i.e. neste Exemplo 12 a agregação de plaquetas mediante exposição ao oxLDL, uma proteína dobrada incorretamente relacionada com, por exemplo, aterosclerose.

25 **Exemplo 13**

Papel de compostos de ligação de estrutura β cruzada[,] imunoglobulinas intravenosas e domínio de dedo de ativador de fator de crescimento de hepatócitos sobre o tempo de sangramento em um experimento de corte da cauda de um camundongo

Materiais e métodos

Para a análise da influência de compostos de ligação de estrutura β cruzada sobre a coagulação e/ou agregação de plaquetas *in vivo*, realizou-se o ensaio de corte da cauda de camundongo para determinar o tempo de sangramento. Para esta abordagem usou-se 50 camundongos C57BL/6JOIaHsd pretos machos com de 11 a 13 semanas de vida de acordo com um protocolo que foi aprovado pelo comitê ético local para experimentos com animais (Utrecht University, Países Baixos). Camundongos foram injetados intravenosamente (i.v.) na veia da cauda com 100 μ l de tamponador (PBS, grupo de controle, n = 14) ou tamponador com composto testador ou heparina (controle positivo, conhecido por prolongar sangramento). Após de 5 a 20 minutos os camundongos foram anestesiados em uma câmara com 5% de Isoflurano (indução), seguido de anestesia com de 2 a 2,5% de Isoflurano usando-se uma máscara durante o curso do experimento (manutenção). Camundongos foram mantidos em um cobertor aquecido (37°C) com suas caudas pendendo da tabela. Cortou-se 5 mm da cauda com uma tesoura e coletou-se sangue em copos. Registrhou-se o tempo entre a injeção e o corte da cauda, e também o tempo entre o início do sangramento e a interrupção do sangramento. Pontos de viragem foram a interrupção do sangramento, em que o tempo de sangramento dura mais de 20 minutos, que foi interrompidoativamente por meio de fechamento da ferida mediante queima, e atingindo-se um volume de sangue acima de 200 μ l devido a sangramento rápido. Sangramento prolongado durante mais de 20 minutos e sangramento relativamente excessivo foram, ambos, ajustados arbitrariamente em um tempo de sangramento de 20 minutos. Como um controle positivo para sangramento prolongado esperado, nós usamos 10 I.E./heparina de camundongo (Leo Pharmaceutical Products B.V., 5000 IE/ml) i.v. em 100 μ l de NaCl a 0,9% (n = 8). Usou-se ativador de fator de crescimento de hepatócitos (HGFA, *Hepatocyte growth factor activator*) domínio de

dedo/fibronectina de tipo I a 4,7 mg/ml. Injetou-se cem μ l i.v. resultando em uma concentração final aproximada de 234 μ g/ml com base em um volume de sangue estimado de 2 ml/camundongo (n = 14). Usou-se imunoglobulinas intravenosas humanas (IgIV, Octagam, OctaPharma) de um estoque de 50 mg/ml conforme fornecido pelo fabricante, diluído 20 vezes (n = 14).

Para os estudos usou-se um domínio de dedo de HGFA sintético que foi sintetizado quimicamente de acordo com procedimentos convencionais (Dr. T. Hackeng, Academic Hospital Maastricht, Países Baixos; Hackeng, T. *et al.* (2001) *Protein Sci.* 10, 864-870, Hackeng, T. *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 94, 7845-7850). Para HGFA, tomou-se radicais de 200 a 240 (entrada Swiss-Prot Q04756). O domínio F de HGFA pode ligar-se a proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada (ver, por exemplo, pedido de patente WO2003NL00501).

Resultados

Determinou-se o tempo médio de sangramento de uma ferida na cauda após cortar-se aproximadamente 0,5 cm da cauda, em 14 camundongos dos camundongos tratados com IgIV e tratados com F de HGFA, tratados com tamponador (Figura 21). Tempos de sangramento foram classificados randomicamente por cinco pessoas diferentes. Controle positivo para induzir sangramento prolongado consistiu de heparina a uma dose de 10 IE/camundongo (n = 8). No grupo de referência injetou-se PBS (n = 14). O tempo médio de sangramento é de 368 segundos para camundongos de controle injetados com PBS, e de 1056 segundos para camundongos de controle injetados com heparina. F de HGFA e IgIV prolongaram o tempo de sangramento a, em média, 706 e 765 segundos. De acordo com um teste t não-pareado com valores P bicaudados, os tempos de sangramento em camundongos injetados com F de HGFA e camundongos injetados com IgIV diferem significativamente do tempo de sangramento observado em camundongos injetados com PBS (ver Figura 21). Valores P são de 0,013 para F de HGFA e de 0,0045 para IgIV, respectivamente,

quando comparados com o grupo de controle injetado com PBS. Estas observações demonstram um papel para proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada nas cascatas que resultam em coagulação e formação de um plugue de plaquetas. Como descrito por nós previamente (ver, por exemplo, 5 pedido de patente WO2003NL00501), a polimerização de fibrina requer formação de estrutura β cruzada, e lise de coágulos de fibrina por tPA e plasminogênio é inibida com compostos de ligação de estrutura β cruzada. Além disso, plaquetas são ativadas por proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada, e plaquetas ativadas expõem, elas próprias, estrutura β cruzada. Nos Exemplos 2 e 12 nós mostramos que IgIV interfere com agregação 10 de plaquetas iunduzida com β cruzada. No Exemplo 8 nós demonstramos que IgIV enriquecida com HbAGE-Sepharose liga-se com maior especificidade a fibrina, quando comparado com material de partida usado para enriquecimento de IgIV. Os dados obtidos agora com F de HGFA e IgIV no ensaio de 15 sangramento de corta da cauda mostram que estas moléculas de ligação β cruzada são um ponto de partida valioso para o desenvolvimento de terapêuticos anti-coagulantes baseados em compostos de ligação de estrutura β cruzada ou baseados em compostos que se ligam às moléculas que se ligam à estrutura β cruzada durante a coagulação e ativação de plaquetas, e, com isto, facilitam a 20 coagulação e/ou formação de trombos. Em uma concretização do terapêutico sugerido, seleciona-se regiões de afinidade com especificidade para as proteínas com estrutura β cruzada que contribuem para a coagulação e agregação de plaquetas, dirigindo com isso a ação terapêutica mais especificamente para as 25 proteínas com estrutura β cruzada que subjazem à coagulação e/ou formação de trombos.

Exemplo 14

Isolamento e identificação de proteínas de plasma de pacientes de amiloidose sistêmica, e de soro e fluido sinovial de pacientes de RA [artrite reumatóide], usando-se matriz com regiões de afinidade por

proteínas dobrada incorretamente s

Como estruturas β cruzada e proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada são ligadas efetivamente a uma coleção de moléculas de IgIV de acordo com a invenção e/ou a uma composição de acordo com a invenção, elas são separadas e/ou isoladas efetivamente de uma amostra e/ou de um corpo de animal ou humano, e identificadas subsequentemente. IgIV após enriquecimento usando matriz de afinidade de β cruzada, foram usadas para isolar estruturas β cruzada e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada e/ou proteínas capazes de ligação específica com estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada em proteínas. Proteínas capazes de ligar-se especificamente a uma estrutura β cruzada e/ou uma conformação induzida com β cruzada em proteínas são identificadas pelo fato de que, quanto ligadas a proteína com estrutura β cruzada e/ou conformação induzida com β cruzada de uma maneira insaturada, matrizes de IgIV enriquecida ligam-se aos sítios de ligação livres na proteína com β cruzada e/ou conformação induzida com β cruzada, desta forma ligando-se indiretamente às proteínas que se ligam à estrutura β cruzada ou conformação induzida com estrutura β cruzada ligada à estrutura β cruzada e/ou conformação induzida com β cruzada. A presença e/ou identidade de uma estrutura β cruzada, e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada e/ou proteínas capazes de se ligarem especificamente à estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada em proteínas, de indivíduos saudáveis foi comparado com a presença e/ou identidade de uma estrutura β cruzada, e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada e/ou proteínas capazes de se ligarem especificamente à estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada em proteínas, de indivíduos com uma doença ou problema de saúde relacionado e/ou associado com uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada e/ou proteínas capazes de se ligarem especificamente a estrutura β cruzada ou

conformações induzidas com estrutura β cruzada em proteínas, como por exemplo, de indivíduos com amiloidose AL primária ou artrite reumatóide (RA). A identidade das proteínas isoladas com uma matriz de regiões de afinidade foi identificada por meio de análises de espectrometria de massa. Os 5 resultados de uma amostra que se origina de um indivíduo saudável e uma amostra que se origina de um paciente foram comparadas. Além disso, resultados obtidos com uma amostra de um paciente ou de um indivíduo saudável contactada com matriz de IgIV enriquecida foram comparados com resultados obtidos após o contato das mesmas amostras com matriz de 10 controle sem regiões de afinidade imobilizadas. Desta maneira, obteve-se informação acerca da identidade e/ou suscetibilidade de proteínas propensas a dobramento incorreto e a adotarem conformação de estrutura β cruzada durante estados de doença definidos, e acerca da(s) proteína(s) que se liga(m) preferencialmente àquelas proteínas dobrada incorretamente. Isto fornece 15 informação-chave para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas que são específicas para doença, por exemplo para monitorar estado de doença, para monitorar efetividade da terapia, para monitorar a ocorrência de doença, e fornece pistas valiosas para o desenvolvimento de terapêuticos objetivados para estruturas β cruzada e/ou proteína(s) compreendendo uma estrutura β 20 cruzada e/ou proteínas capazes de se ligarem especificamente a estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada em proteínas, que são, de preferência, específicas para as desordens exemplares. Os terapêuticos, por exemplo, eliminam as proteínas dobradas incorretamente *in situ*, ou eliminam as proteínas dobradas incorretamente extracorporeamente, 25 usando, por exemplo, matriz de afinidade durante regimes de diálise.

Material e métodos

IgIV Octagam (Octapharma, lote 5024018434) foi enriquecida em A β -Sepharose, HbAGE-Sepharose e dIgIV-Sepharose, como descrita alhures neste pedido. Os eluados destas matrizes foram dialisados contra PBS

(2 h, 1:2000, 4°C), combinados e revestidos sobre CNBr-Sepharose (GE-Healthcare, Amersham Biosciences). A imobilização de IgIV enriquecida foi realizada substancialmente como descrito alhures neste pedido para NHS-Sepharose. A matriz de CNBr foi dissolvida a 200 mg/ml em 1 mM de HCl e 5 tratada da mesma forma com o matriz de NHS, exceto por uma etapa adicional de ativação de 5 minutos em 1 mM de HCl, em um dispositivo de rolamento, antes da lavagem neste tamponador. As frações enriquecidas combinadas foram diluídas em tamponador de imobilização (50 mM de NaCl e 40 mM de NaHCO₃) a uma concentração de 15 µg/ml. Matriz de controle 10 foi expostos a tamponador de imobilização, apenas. Após imobilização de um dia para o outro a matriz foi bloqueada com Tris e lavada.

Seis amostras foram incubadas com a IgIV-Sepharose e a Sepharose de controle: plasma combinado normal, plasma de um paciente I ou de um paciente II, com amiloidose AL, soro de um paciente III com RA (Fator Reumatóide, titulação de RF de 682), soro de controle e fluido sinovial de um paciente IV com RA (titulação de RF de 23). Todas as amostras foram diluídas 20x em HBS e aplicadas a 200 µl de pérolas em dois volumes de 500 µl. Um volume foi incubado durante 4 h à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado após centrifugação (2 minutos a 1400 rpm). 15 Subsequentemente, o segundo volume foi aplicado na mesma matriz e incubado de um dia para o outro em um dispositivo de rolamento a 4°C. A matriz de afinidade ou matriz de controle foi lavada 12 vezes com HBS e as proteínas ligadas foram eluídas com 2 x 50 µl de uréia 8 M em PBS, em duas etapas de incubação subseqüentes de 1 h cada. Para coletar os eluados, as 20 matrizes foram centrifugadas e os dois eluados foram combinados para cada 25 amostra.

Códigos das amostras:

A1 plasma combinado normal

C1 plasma combinado normal

- A2 paciente de amiloidose AL I
C2 paciente de amiloidose AL I
A3 paciente de amiloidose AL II
C3 paciente de amiloidose AL II
- 5 A4 soro do paciente III com RA (titulação de RF de 682)
C4 soro do paciente III com RA (titulação de RF de 682)
A5 soro de controle
C5 soro de controle
A6 fluido sinovial do paciente IV com RA (titulação de RF de 23)
- 10 C6 fluido sinovial do paciente IV com RA (titulação de RF de 23)
série A: matriz de afinidade de IgIV-Sepharose enriquecia
série C: matriz de controle (Sepharose ativada/desativada)
- 15 Proteínas eluídas foram reduzidas com ditiotreitol (DTT) (60 minutos, concentração final de 6,5 mM) e, depois, alquiladas com iodoacetamida (30 minutos, concentração final de 54 mM), seguido de digestão tríptica de um dia para o outro (10 ng/μl). Digestões de proteína foram dessalinizadas como descrito (Rappaport *et al* 2003, *Anal. Chem.* 75, 663-670), secadas a vácuo e dissolvidas em 2,5% de ácido fórmico.
- 20 Para análise de misturas de peptídeos usou-se um sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies) conectado a um Thermo Finnigan LTQ-MS (Thermo Electron, Bremen, Alemanha). Digestões de proteína foram injetadas em uma coluna de aprisionamento (Reprosil C18 RP (Dr Maisch, Alemanha), 20 mm x 100 μm de diâmetro interno) a 5 μl/minuto. Subsequentemente, os peptídeos foram transferidos com uma taxa de fluxo
- 25 parcialmente reduzido de 100 nl/minuto de solvente A (0,1 M de ácido acético) na coluna analítica (Reprosil C18 RP, 20 cm x 50 μm de diâmetro interno). Eluição dos peptídeos foi obtida com um gradiente linear de 0 a 40% de B (0,1 M de ácido acético em 80% (v/v) de acetonitrila) em 40 minutos. O efluente de coluna foi introduzido diretamente na fonte de ESI do

espectrômetro de massa via um emissor de nano-ESI conectado ao fundo (New Objectives, Woburn, MA). O espectrômetro de massa foi operado no modo de íon positivo, e íons parentais foram selecionados para fragmentação em modo dependente de dados. Após medições espectrométricas de massa, 5 gerou-se listas de picos usando o programa [*software*] BioWorks (Thermo Electron, Bremen, Alemanha). A identificação da proteína foi realizada usando o programa Mascot (www.matrixscience.com) mediante busca no banco de dados IPIhuman (versão 3.24, descarregado de <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/IPI/current>) usando-se os seguintes ajustes: 10 peptídeos totalmente trípticos, tolerância de peptídeo de 0,8 Da, tolerância MS/MS de 0,9 Da, 1 clivagem perdida permitida, carbamidometila (Cys) e oxidação (Met) como fixado e modificação variável, respectivamente. Usou-se o programa [*software*] Scaffold (www.proteomesoftware.com) para 15 classificar os dados e para filtrar peptídeos num nível de confiança de 95%, permitindo apenas identificação de proteína com pelo menos 2 peptídeos identificados.

Resultados e discussão

Na Tabela 9 os resultados são apresentados para as diferentes amostras. Para os pacientes com amiloidose usou-se sangue combinado humano como um controle. Para o paciente de RA, usou-se soro de um indivíduo saudável como um controle. Os resultados para soro de controle e plasma combinado normal são usados para identificação de peptídeos que estão presentes apenas em composições de peptídeos obtidas com amostras de pacientes. As proteínas apresentaram são as proteínas ou fragmentos de 20 proteínas que se ligam especificamente de plasma ou soro de paciente, em comparação com o plasma ou soro de controle. Como não havia disponibilidade de fluido sinovial de um indivíduo saudável, usou-se apenas a matriz de controle como um controle negativo para o fluido sinovial de um paciente de RA. Como mencionado, realizou-se a identificação de proteína 25

mediante busca no banco de dados IPIhuman. IPI significa 'International Protein Index' [índice internacional de proteínas], e é usado para identificar proteínas, precursores de proteínas e fragmentos de proteínas em diferentes bancos de dados, como Swiss-Prot, TrEMBL, e PIR (estes bancos de dados 5 são, todos, acoplados em UniProt). Prepara-se conjuntos de proteínas IPI para um número limitado de espécies eucarióticas superiores cuja seqüência genômica foi determinada completamente, mas para a qual há um grande número de seqüências de proteínas preditas que (ainda não) estão listadas no UniProt. IPI usa dados do UniProt e também de fontes compreendendo 10 previsões, e os combina de forma não-redundante a um conjunto abrangente de proteoma para cada espécie. Toda esta informação foi obtida por meio do website [endereço da rede mundial de computadores] do European Bioinformatics Institute (EBI) que é acessível via: www.ebi.ac.uk.

Uma proteína (IPI00807428) para a qual um peptídeo foi 15 identificado no eluado de matriz de controle que foi contactada com fluido sinovial encontra-se listada porque sete peptídeos desta proteína foram identificados no eluado da matriz de IgIV enriquecida. Como se vê, há 20 diversas proteínas 'hipotéticas' e proteínas indicadas pelo peso molecular das proteínas detectadas. Como seqüências de aminoácidos relativamente curtas nem sempre podem ser atribuídas a apenas uma proteína específica, que é observada particularmente entre imunoglobulinas, são possíveis múltiplos resultados para alguns dos fragmentos de proteína identificados. Em alguns outros casos, o número IPI da proteína hipotética refere-se a uma proteína já identificada.

25 Nas amostras 2/3, o soro de pacientes de amiloidose AL I e II, uma proteína identificada foi 'domínio 3 de cadeia pesada de dineína [*dynein heavy chain domain 3*]'. Dineína é uma 'proteína motora', que move a carga intracelular da membrana celular para o interior da célula. Este é, por exemplo, o caso na autofagia e transporte axonal. Dineína está envolvida no

transporte de agregados de proteína. De modo que, se havia alguma razão relacionada com um agregado de proteínas no plasma, isto poderia terminar eventualmente ligando a matriz de IVIg enriquecida. Portanto, a dineína é identificada como uma proteína de ligação β cruzada. Adicionalmente na amostra 2/3, identificou-se uma proteína hipotética, duas proteínas de 25 kDa e uma região constante lambda de imunoglobulina 1. A proteína de 25 kDa com número IPI IPI00747752 não apresentou referência em qualquer um dos bancos de dados. No entanto, ela apresentava todas as características estruturais de imunoglobulinas. A outra protein de 25 kDa apresentou uma referência gênica com o lócus lambda da imunoglobulina. A proteína hipotética apresentava um gene e uma proteína de referência para imunoglobulina lambda variável 4-3. Imunoglobulinas consistem de duas cadeias pesadas, cada uma com uma região constante e uma região variável de ligação de antígeno, e também de duas cadeias leves apresentando, cada uma, uma região constante e uma região variável de ligação de antígeno. Como os pacientes sofrem de amiloidose AL primária, as cadeias leves identificadas são, mui provavelmente as cadeias leves de imunoglobulina dobradas incorretamente relacionadas com a patologia da doença.

Na amostra 4, identificou-se várias proteínas unicas no soro de um paciente de RA III. Este paciente apresentou uma titulação de RF acima de 600, indicando que este paciente sofre de RA grave. Quatro das proteínas identificadas foram proteínas hipotéticas, em que uma delas (IPI00760678) apresentava uma referência gênica com o lócus lambda de imunoglobulina e uma referência de proteína com as regiões constantes lambda de imunoglobulina. As outras três apresentam todas as características estruturais de imunoglobulinas. Duas proteínas identificadas como proteínas de 25 kDa, apresentavam uma referência gênica com o lócus lambda de imunoglobulina. Uma apresentou uma referência de proteína específica para a cadeia leve do Fator Reumatóide G9, uma região variável lambda 3 aparentemente específica

para Fator Reumatóide. Portanto, conclui-se que este fragmento é parte de uma imunoglobulina de ligação β cruzada. Havia duas proteínas identificadas como imunoglobulina lambda constante 1 (IPI00658130, IPI00719373) e duas proteínas como imunoglobulina lambda constante 2 (IPI00555945, IPI00450309). Havia uma outra proteína identificada como uma região de imunoglobulina, ou seja imunoglobulina lambda variável 3-25. Conclui-se que este fragmento comprehende as seqüências de aminoácidos que apresentam afinidade por proteínas dobrada incorretamente s. Mostrou-se, em estudos diferentes, que o Fator Reumatóide contém, em muitos casos, regiões lambda específicas, em que uma delas foi aparentemente identificada neste experimento. As outras regiões lambda identificadas também poderiam ser parte do Fator Reumatóide. Estas regiões também poderiam ser parte de moléculas de imunoglobulina dobrada incorretamente , ou elas foram parte do auto-antígeno do RF, que é a região Fc de imunoglobulinas, que apresenta características de uma proteína dobrada incorretamente compreendendo estrutura β cruzada (ver Exemplo 10). Identificou-se três outras proteínas. Uma foi identificada como Isoforma 1 da proteína Centrossômica Cep290 (IPI00784201). Proteínas associadas com Centrosoma e Cilia desempenham papéis cruciais na determinação da polaridade e na regulação do transporte intracelular em células pós-mitóticas. Devido a sua localização intracelular, a presença indica que o teor de células lisadas está presente na amostra do paciente. A segunda foi identificada como a Isoforma Gama-B do precursor de cadeia gama de fibrinogênio (IPI00021891). Formas diferentes de fibrinogênio são antígenos para auto-anticorpos na artrite reumatóide. A forma desiminada de fibrinogênio é um destes antígenos, que é encontrado abundantemente na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide.

A proteína final identificada (IPI00004233) foi o antígeno para o anticorpo monoclonal Ki-67. Este antígeno é usado como um marcador de proliferação. Em alguns casos ele é usado como um marcador para o

crescimento de tumor. O mais interessante é que ele também foi descrito como um marcador de proliferação na artrite reumatóide, para se avaliar a proliferação de tipos de células inflamatórias no sinóvio.

Na amostra 6, o fluido sinovial de um paciente de artrite reumatóide IV, temperatura se identificou unicamente diversas proteínas. Três destas proteínas eram proteínas hipotéticas. Uma (IPI00807428) não apresentou quaisquer referências gênicas ou protéicas, mas todas apresentaram as características de imunoglobulinas. Uma (IPI00760678) apresentou referências gênicas de banco de dados com o lócus lambda de imunoglobulina (constante 2) e referências protéicas de banco de dados para a região constante de lócus lambda de imunoglobulina, mas também referências protéicas para a região variável 2-14 e para proteínas hipotéticas. A última (IPI00003362) era efetivamente proteína de choque com calor BiP (GRP78). BiP é um dos constituintes da Via β cruzada e liga-se a proteínas dobradas incorretamente (ver Tabela 4 e 5). BiP é identificado comprovavelmente na amostra do paciente porque encontra-se ligado a uma proteína misfolded. BiP também foi identificado como um auto-antígeno alvo *per se* em pacientes de RA. Diferentemente das proteínas hipotéticas, identificou-se três outras proteínas não-denominadas; duas proteínas com 25 kDa e uma proteína com 26 kDa. Ambas as proteínas com 25 kDa apresentaram referências gênicas para o lócus lambda de imunoglobulina (IPI00747752, IPI00154742). Uma destas (IPI00154742) também apresentou uma referência de proteína com a cadeia leve G0 do Fator Reumatóide, a região variável lambda 3 específica para fator reumatóide, como indicado previamente. A proteína de 26 kDa apresentou referência gênica para variável κ de imunoglobulina 1-5. Também foram identificadas algumas outras regiões de imunoglobulina. Uma foi a constante κ de imunoglobulina (IPI00807413), um (IPI00166866) uma imunoglobulina de constante alfa 1 pesada, uma (IPI00748998) um fragmento de imunoglobulina Fv de cadeia simples (região variável de cadeia pesada) e,

finalmente, um (IPI00658130) que foi identificada como uma imunoglobulina de cadeia leve constante 1.

O fluido sinovial também continha alguns componentes do sistema de complemento, nominalmente subunidade C de subcomponente de complemento C1q (IPI00022394), subcomponente C1r de complemento (IPI00296165) e proteína 1 relacionada com fator H de complemento (IPI00011264). Mostrou-se que, no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, encontra-se abundantemente micropartículas C4 e/ou C3 com C1q ligado, em comparação com soro tanto de pacientes com artrite reumatóide como também de controles saudáveis. Verificou-se também que C1q acumula-se em placas beta amilóides. Por fim, C1q é estruturalmente similar à proteína tensoativa A (SP-A), em que ambos apresentam uma região de cabeça globular e uma cauda similar a colágeno. SP-A foi associado com corpos lamelares no sinóvio, e estão presentes auto-anticorpos para SP-A no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. Estes auto-anticorpos apresentam alguma reatividade cruzada com C1q. C1q atua na Via β cruzada (ver Tabela 4 e 5). Julgando a reatividade cruzada de auto-anticorpos contra SP-A com C1q, também se considera ser um auto-antígeno. Particularmente porque o colágeno é um auto-antígeno na artrite reumatóide.

C1r de complemento é uma serina protease que é capaz de associar-se com C1q. C1r pode ativar outros fatores de complemento. Não se encontrou uma associação clara com a artrite reumatóide ou dobramento incorreto de proteína até aqui. Proteína relacionada com fator H de complemento 1 (FHR-1, *complement factor H-related protein 1*) consiste de cinco curtas repetições de consenso (também encontradas no fator H) e sua função é desconhecida até aqui. FHR-1 é encontrado no plasma humano como parte de determinadas partículas de lipoproteína. Mostrou-se que FHR-1 está associada com um complexo de lipoproteína de fosfolipídeo e outras proteínas no plasma e que este complexo media respostas de células a

lipopolisacarídeos (LPS). Nós demonstramos que LPS induz conformação β cruzada em proteínas. Nós também determinamos que ApoA-I é capaz de adotar conformação β cruzada. Adicionalmente, ApoA-I é capaz de ligação com outras proteínas compreendendo conformação β cruzada. A lipoproteína no complexo consiste de fosfolipídeos, apoliproteína A-I (apoAI), proteína de ligação de lipopolissacarídio (LBP), e proteínas relacionadas com fator H (FHRs). Conclui-se que FHR-1 apresenta um papel na realização e/ou regulação da função de LBP. Como FHR-1 é o componente de proteína dominante destas partículas, FHR-1 parece muitas vezes mais abundante do que ApoA-I ou LBP. Previamente, mostrou-se que uma proteína relacionada constituída de seis repetições curtas consenso conhecidas como beta 2-glicoproteína I (também denominada apoliproteína H) associa-se tanto com partículas de HDL e com fosfolipídeos. Beta 2-glicoproteína I (IPI00298828) também foi identificada na amostra de fluido sinovial. Beta 2-glicoproteína I é um auto-antígeno conhecido na aterosclerose e síndrome anti-fosfolipídeo, uma condição com risco incrementado de trombose. As funções de beta 2-glicoproteína I permanecem obscuras. No entanto, mostrou-se que ele inibe reações de coagulação dependentes de fosfolipídeo, como a atividade do complexo pró-trombinase - tenase, e ativação de fator XII. Ele também se liga a fator XI e inibe sua ativação. Em contraste, ele inibe a atividade anti-coagulante de proteína C ativada e pode contribuir para a geração de trombina *in vivo*. Quando beta 2-glicoproteína I é clivada por plasmina, ela se liga ao plasminogênio e suprime a geração de plasmina. Nós mostramos que 62gpi compreende conformação β cruzada quando contactado com cardiolipina ou análogos quando alquilado, dotando-o com potencial imunogênico. Outras três proteínas foram identificadas na amostra de fluido sinovial, ou seja proteína 5 similar a calmodulina (IPI00021536) (também denominada proteína da pele similar a calmodulina), isoforma I de desmoplaquina (DPI) (IPI00013933) e isoforma I de gelsolina (IPI00026314). Proteína 5 similar a

calmodulina é uma proteína de ligação de cálcio específica para a pele e sua expressão é restrita ao *stratum granulosum* e às camadas inferiores do *stratum corneum*. Ela é expressa durante a diferenciação celular. Esta proteína está provavelmente presente no fluido sinovial como uma contaminação (células da pele). A desmoplaquina é um regulador da organização de microtúbulos na epiderme, e associa-se com queratinas da epiderme. Esta proteína provavelmente também é uma contaminação. A Gelsolina termina filamentos de actina, e uma forma secretada de gelsolina está presente no plasma, onde provavelmente atua como um aglutinador de actina. A gelsolina também é capaz de formar depósitos amilóides e é uma das proteínas que causa angiopatia amilóide cerebral. Mutações no gene de gelsolina resultam no tipo Finlandês de amiloidose familiar de relacionada com gelsolina. Quando agregados de gelsolina ou gelsolina dobrada incorretamente se encontravam presentes na amostra de fluido sinovial, não é de surpreender que se ligaram à matriz de IVIg enriquecida.

Com o uso de matriz de afinidade de IgIV enriquecida, como descrito no presente Exemplo, nós identificamos diversas proteínas únicas para pacientes de amiloidose, e identificou-se unicamente séries de proteínas em amostras obtidas de pacientes com artrite reumatóide. Estas proteínas, ou contêm uma estrutura β cruzada ou são, elas próprias, proteínas de ligação β cruzada. Estas proteínas formam a base para o desenvolvimento de uma ferramenta diagnóstico específica para doença e/ou são alvos recentemente identificados para o desenvolvimento de terapêuticos objetivados para esgotar pacientes de proteínas dobradas incorretamente moduladoras de doença *in vivo* (por exemplo, por meio de administração de drogas) e/ou *ex vivo* (p. ex., dispositivo extracorpóreo). Além disso, os estudos proporcionaram compreensão sobre várias moléculas de ligação β cruzada identificadas aparentemente relacionadas com a doença. As regiões variáveis de Ig's identificadas servem como um bom ponto de partida para o

desenvolvimento de regiões de afinidade sintéticas (ver abaixo, Exemplo 20).

Exemplo 15

Modulação da interação de proteínas dobradas incorretamente com 5 células por regiões de afinidade.

Proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada são capazes de ligação a células e evocam respostas celulares, incluindo embora sem limitação, respostas inflamatórias e alterações no crescimento de células ou apoptose. Nos avaliamos se regiões de afinidade 10 modulam a interação de referidas proteínas dobradas incorretamente com células. Nós usamos células endoteliais primárias humanas (HUVECs, *human primary endothelial cells*) isoladas de veias umbilicais.

Materiais e métodos

Isolamento, cultura e análise de células endoteliais primárias humanas 15 (HUVECs, *human primary endothelial cells*)

Isolamento e cultura

HUVECs são células endoteliais primárias (ECs, *endothelial cells*), isoladas de cordões umbilicais usando 0,1% de colagenase (Sigma, C0130, 100 mg, dissolvido em 100 ml de meio M199 suplementado com 10% 20 de FCS (Gibco 10106-169) e Penicilina- Estreptomicina (P/S, Gibco, 15140-122)), de acordo com procedimentos convencionais amplamente usados conhecidos por uma pessoa versada na arte. HUVECs apresentam as características típicas de ECs, p. ex. morfologia de pedra de rio e armazenamento de fator de von Willebrand em corpos de Weibel-Palade. 25 HUVECs podem ser cultivadas regularmente até a passagem 5; além da passagem 5 as HUVECs perdem marcadores típicos de EC. O isolamento é descrito aqui de forma resumida. O cordão umbilical é lavado durante menos de 3 minutos em etanol e subsequentemente com PBS. A veia é conectada a cânulas e enxaguada com enxaguada com 10 ml de PBS, seguido de

carregamento com a solução de colagenase a 0,1%. Após uma incubação de 15 minutos a 37°C, a suspensão de células endoteliais destacadas é recuperada por meio de enxágue da veia com 10 ml de meio que é adicionado subsequentemente à solução de colagenase. A suspensão de EC é centrifugada 5 durante 5 minutos à temperatura ambiente, com baixa força g. O sobrenadante é descartado e o pellet de células é ressuspenso em 5 ml de 'meio rico' (EGM-2; meio endotelial basal (EBM-2, Cambrex, CC-3156) e Singlequots contendo suplementos para células endoteliais (Cambre, CC-4176)). Células (passagem 0, PO) são semeadas em um frasco de cultura revestido com 0,5% 10 de gelatina (Sigma, G1393). Para facilitar a adesão das células endoteliais, adiciona-se fibronectina humana à cultura de células a uma concentração final de 2 µg/ml. EC's são cultivadas a 37°C, a 5% CO₂. O meio de cultura de células é renovado a cada 2-3 dias até a confluência. Em seguida, com a adição de tripsina-EDTA, as células são destacadas do frasco, centrifugadas 15 com baixa força g, ressuspensas em meio rico e semeadas em frascos de cultura de células maiores previamente revestido com gelatina a 0,5%.

Expressão e purificação de sRAGE

Para uma descrição da clonagem, expressão e purificação de sRAGE humana recombinante, ver pedido de patente WO2006101387 20 (parágrafo [0303]). O estoque de sRAGE-FLAG-His purificado foi de 284 µg/ml em PBS, armazenado a -80°C.

Adesão de células a proteínas dobrada incorretamente s

Em placas de 96 poços (Immulon 1B Thermo Labsystems 3355) proteínas, i.e. BSA-AGE (5 µg/ml), 10 µg/ml de IVIg nativa (Octagam 25 charge024018434), 10 µg/ml de IVIg enriquecida (enriquecida por meio de contato de IgIV Octagam com Hb-AGE-Sepharose [ver alhures no pedido para uma descrição]) ou gelatina (Sigma G1393, solução a 2% em H₂O ou PBS, controle positivo para adesão a ECs) foram revestidas usando-se soluções de 100 µl. Após incubação durante 2 horas a 37°C as soluções foram

descartadas e os poços bloqueados durante 1 hora a 37°C com 100 µl/poço de polivinilpirrolidona a 0,5% (PVP, Sigma P5288) em PBS, esterilizadas por filtração (0,22 µm). PVP é um polímeros inerte que não suporta adesão celular. Subsequentemente, a solução com PVP foi descartada. Em seguida, as 5 placas foram incubadas com 40 µl de meio RPMI 1640 (Gibco 52400) e 10 µl de inibidor potencial, como regiões de afinidade. HUVECs foram obtidas por meio de tripsinização. Após centrifugação, células foram suspensas em meio RPMI 1640 com P/S e diluídas a 80.000- 100.000 células/ml. Cada poço foi semeado com 100 µl da suspensão de células. Células foram deixadas aderir 10 durante 1 hora a 37°C. Placas foram lavadas cuidadosamente com meio RPMI 1640 com P/S. O meio foi removido por meio de pipetamento ao longo das paredes dos poços. Placas foram lavadas até que os poços vazios contivessem quase nenhuma célula residual, i.e. de 1 a 3 vezes. Subsequentemente, adicionou-se 50 µl de meio RPMI em cada poço, seguido da adição de 5 15 µl/poço de 10% de Triton-X1000 em PBS e incubação durante 10 min a 37°C. Em seguida, adicionou-se 50 µl de solução de lactodesidrogenase (LDH, Roche Applied Science, 11644793001) de acordo com instruções do fabricante. A placa foi incubada durante de 0,5 a 3 horas à temperatura ambiente no escuro. A absorbância a 490 nm foi medida em uma leitora de 20 microplacas Versamax em diversos momentos.

Ligaçāo de proteínas dobradas incorretamente a células avaliada por meio de análise de seleção de células ativada por fluorescência (FACS)

Para estes experimentos HUVECs foram isoladas por tripsinização. Após a tripsinização células foram coletadas em RPMI 1640, 25 contendo P/S e 10% FCS e centrifugadas. Após a centrifugação, células foram ressuspensas em meio RPMI sem FCS a uma concentração de 250.000 células/250 µl. Preparou-se tubos individuais de 4 ml (polipropileno, Greiner), contendo 250 µl de suspensões de células. Adicionou-se em cada tubo 75 µl de uma amostra, contendo tamponador (PBS) apenas, 50 µl de tamponador

com 25 μ l de oxLDL (1 mg/ml) ou 74 μ l de tamponador com 1 μ l de BSA-AGE (25 mg/ml). Subsequentemente, as células foram incubadas com a amostra durante aproximadamente 3,5 horas a 4°C. Em seguida, células foram pelletizadas por meio de centrifugação e o sobrenadante foi descartado.

5 Células foram lavadas subsequentemente com tamponador de FACS (PBS/0,5% de BSA/0,05% m/v de NaN₃) a 4°C e ressuspensas em tamponador de FACS a aproximadamente 1×10^5 células/100 μ l para análise subsequente. A morte celular foi determinada adicionando-se 3 μ l de solução de 7-aminoactinomicina D (7AAD) (preparada de acordo com procedimentos convencionais). A ligação da amostra BSA-AGE (ver alhures neste pedido para detalhes sobre a preparação) foi determinada com anticorpo monoclonal anti-AGE 4B5 (10 μ g/ml) e, após lavagem, com anticorpos anti-camundongo de cabra secundários PE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, E.U.A.). A ligação de BSA-AGE também foi avaliada usando-se a fluorescência intrínseca de BSA-AGE no canal de PE. A ligação de LDL oxidado (oxLDL, oxidado a 56% após incubação com FeSO₄; aumento específico da fluorescência de Tioflavina T) foi determinada com soro de coelho com anticorpos anti-ApoB100 policlonais (Dade Behring, Newark, DE, E.U.A., lote 153670) a uma concentração de 160 μ g/ml e, após lavagem das células,

10 com anticorpos anti-coelho de cabra marcados com FITC (1:200, Jackson).

15

20

Resultados e conclusão

Adesão de células a proteínas dobrada incorretamente s

Verificou-se que HUVECs aderem a proteínas dobrada incorretamente s, i.e. como mostrado aqui com BSA-AGE, em grau um pouco maior, aproximadamente 125%, do que gelatina (Figura 22A, barras 1 versus 3). Concentrações crescentes de regiões de afinidade, i.e. IgIV, inibiram a adesão de ECs a BSA-AGE (barras de 7 a 9 versus a barra 3). Estes dados revelam que regiões de afinidade interferem com a interação de proteínas dobradas incorretamente com as células.

A Figura 22B mostra que células também se ligam a regiões de afinidade (IVIg, Octagam), de forma mais eficiente a regiões de afinidade enriquecidas (IVIg enriquecida, após enriquecimento por meio de contato de Octagam com Hb-AGE-Sepharose, ver alhures neste pedido para descrição).

5 A ligação de ECs às regiões de afinidade imobilizadas compreendendo domínios Fc não é mediada por receptores de Fc clássicos, como referidos receptores, i.e. CD16, CD32a e b e CD64, não estiveram presentes nas células, como determinado usando análise FACS (não mostrado). Como regiões de afinidade são capazes de se ligarem especificamente a proteínas dobrada incorretamente s, esta interação entre regiões de afinidade e células é explicada por meio da ligação de proteínas dobradas incorretamente nas células às regiões de afinidade, especificamente. Efetivamente, aproximadamente de 1 a 2% das células se mostraram menos viáveis, como determinado com FACS (não mostrado).

10 **15 Ligação de proteínas dobradas incorretamente a células determinada por meio de citometria de fluxo**

Usando-se dois métodos, verificou-se que BSA-AGE liga-se eficientemente a 96% das ECs com uma intensidade média de fluorescência (intensidade de fluorescência média (MFI, *mean fluorescence intensity*) de 20 13,9. OxLDL ligou-se a 18% das ECs incubadas e apresentou uma MFI de 1,6. As características de ligação obtidas com ECs incubadas em suspensão com BSA-AGE estão alinhadas com a observação de que ECs se ligam eficientemente em poços de placas de cultura de células que são revestidos com BSA-AGE (ver Figura 22).

25 Considerado em conjunto, estes resultados demonstram que células são capazes de ligar-se especificamente a proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada e que regiões de afinidade, de preferência, regiões de afinidade enriquecidas, modulam a interação de referidas proteínas dobradas incorretamente com células. Neste Exemplo, nós

observamos que regiões de afinidade de IgIV presentes em IgIV Octagam bloqueiam eficientemente a adesão de ECs a BSA-AGE dobrada incorretamente imobilizada. Conclui-se que regiões de afinidade dirigidas contra a proteína dobrada incorretamente imobilizada ligam e protegem a 5 proteína dobrada incorretamente contra interação com receptores de superfície de EC.

Exemplo 16

Esgotamento de soluções de proteínas dobradas incorretamente usando IgIV enriquecida

10 Nós analisamos se a IgIV enriquecida, obtida após seleção de regiões de afinidade que se ligam a matrizes com proteínas dobradas incorretamente imobilizadas compreendendo estrutura β cruzada, são vantajosas para esgotar soluções de estrutura β cruzada. Em resumo, em uma abordagem ELISA, uma mistura de IgIV enriquecida com o uso de A β fibrilo-15 Sepharose, dIgIV-Sepharose, dHSA-Sepharose e BSA-AGE-Sepharose, como descrito no Exemplo 6, foi imobilizada, exposta a soluções com um pico de HbAGE dobrada incorretamente e dOVA, e subsequentemente avaliou-se a ligação das proteínas dobradas incorretamente a IgIV enriquecida.

Materiais e Método

20 IgIV Octagam (lote 5024018434) foi enriquecida com o uso de AB fibrilo-Sepharose, dIgIV-Sepharose, dHSA-Sepharose e BSA-AGE-Sepharose, como descrito no Exemplo 6. As concentrações de Ig foram de aproximadamente 30 μ g/ml. Para o corrente experimento, os quatro eluados das matrizes de afinidade foram misturadas a 1:1:1:1 numa base em volume, e 25 revestidas a uma concentração de 5 μ g/ml em placas de alta ligação Greiner Microlon, durante 1 h à temperatura ambiente com movimento. Como um controle revestiu-se apenas tamponador de controle negativo ou albumina de soro humano (HSA [*Human Serum Albumine*] nativa (CEALB, Sanquin, Países Baixos). Realizou-se ELISAs substancialmente como descrito acima.

Poços bloqueados (reagente de bloqueio Roche) revestidos com IgIV enriquecida ou HSA ou tamponador de revestimento foram recobertos em duplicata com 0, 1, 10 ou 100 µg/ml de dOVA ou HbAGE. Avaliou-se a ligação de dOVA usando albumina de ovo anti-frango monoclonal (Sigma, 5 A6075, 1:10,000) e RAMPO (Dako Cytomation, P0260, 1:3,000). HbAGE foi detectado usando-se um hibridoma de camundongo específico para AGE IgG 4B5, desenvolvido contra fibronectina humana glicada com glucose-6-fosfato, e RAMPO. Obteve-se sinais de fundo com poços revestidos com tamponador que foram recobertos subsequentemente com soluções de proteína (ver 10 abaixo), [que] foram subtraídos de sinais obtidos com poços revestidos com IgIV enriquecida ou HSA. Adicionalmente, sinais de fundo obtidos para incubações de anticorpos primários e secundários com poços em que não se adicionou dOVA ou HbAGE (controle de tamponador para ligação), foram 15 subtraídos dos sinais obtidos com 1, 10 e 100 µg/ml de proteína dobrada incorretamente.

Resultados e discussão

Figura 23 mostra que dOVA é extraída da solução por meio de IgIV enriquecida imobilizada, em que dificilmente ocorreu qualquer ligação a HSA. De forma análoga, HbAGE também foi extraída especificamente pela 20 IgIV enriquecida. Estes resultados mostram que a IgIV enriquecida com afinidade maior por proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada, que é imobilizada sobre um suporte sólido vantajoso, é vantajosa para ser aplicada no esgotamento de soluções de proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada, como por exemplo, 25 dOVA e HbAGE.

Aplicações para este método revelado com o fim de esgotar soluções-de-proteína de proteínas dobradas incorretamente encontram-se no campo de, por exemplo, embora sem restrição, i) diagnósticos para doenças de dobramento incorreto de proteínas, como por exemplo, falha renal,

amiloidose sistêmica, como por exemplo, amiloidose AL, AA ou ATTR, ou RA, ii) controle de qualidade de soluções de proteína, como por exemplo, biofarmacêuticos e vacinas, iii) diálise, usando, por exemplo, dispositivos extracorporais, de pacientes que sofrem de doenças de dobramento incorreto de proteínas, como por exemplo, falha renal, amiloidose sistêmica, como por exemplo, Amiloidose AL, AA ou ATTR, ou RA, e iv) eliminação de biofarmacêuticos de proteínas dobradas incorretamente apresentando um risco de indução de efeitos colaterais (imunogênicos). Para todas as aplicações mencionadas acima, as especificações das regiões de afinidade aplicadas com relação a ligação preferencial e específica a proteínas dobrada incorretamente s, são ajustadas de acordo com a necessidade. Em uma concretização preferida, com os métodos e meio descritos no Exemplo 6 e 7 e no "Sumário baseado nos Exemplos de 1 a 20", dados abaixo, seleciona-se aquelas regiões de afinidade específicas dentre uma composição de regiões de afinidade que são exigidas para determinados fins objetivados, como por exemplo, aqueles listados acima.

Exemplo 17

Imunomodulação de respostas celulares a proteínas dobradas incorretamente por meio de regiões de afinidade enriquecidas

Para eliminar do corpo proteínas dobrada incorretamente s, células imunes respondem a proteínas dobradas incorretamente de diversas maneiras. Respostas incluem a opsonização de proteínas dobrada incorretamente s, a produção de citocinas e quimiocinas para ativar e atrair outras células do sistema imunológico e a expressão de marcadores de superfície celular para ativar outras células. Em particular, anticorpos, como regiões de afinidade capazes de se ligarem especificamente a proteínas dobrada incorretamente s, interagem com células imunes para ativar referidas células imunes. Nós testamos se regiões de afinidade, enriquecidas com anticorpos que reconhecem proteínas dobrada incorretamente s, como BSA

glicosadas, são capazes de aumentar a resposta a proteínas dobrada incorretamente s. Nós usamos células dendríticas humanas primárias (DCs) isoladas do sangue periférico de um voluntário saudável. Nós determinamos a produção da citocina interleucina-6 (IL-6) e quimiocina IL-8, expressão de 5 marcadores de superfície celular (CD80, CD83, CD86 e CD40), e também a viabilidade e sobrevida das células (ligação de 7AAD).

Materiais e métodos

Geração *in vitro* de células dendríticas derivadas de monócitos humanos do sangue periférico, e análises para ativação

10 DCs humanas geradas de precursores não-proliferadores selecionados dentre células mononucleares do sangue periférico (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*), substancialmente por meio de métodos publicados (Sallustro e Lanzavecchia [1994], *J. Exp. Med.* 179 1109-1118). A presença relativa abundante de CD1a, CD32, CD36, CD40, CD54, CD86, 15 HLA-DR e CD206 e o teor relativamente baixo de células positivas para CD14, positivas para CD16, positivas para CD64, positivas para CD80, positivas para CD83 e positivas para CD163 servem como uma medida de qualidade para as DCs imaturas. Após se obter as DCs imaturas mediante estimulação com GM-CSF e IL-4, suspensões de células de 1 ml são 20 incubadas durante 22 h com 50 µl dos seguintes compostos (concentrações finais), i) PBS, ii) 50 µg/ml de poli-IC com 100 ng/ml de TNF α , iii) 50 µg/ml de BSA-AGE, iv) BSA-AGE + 4,4 µg/ml de IgIV enriquecida, v) como iv) mas as células são pré-incubadas com uma concentração de saturação de anticorpo anti-CD32a de bloqueio, vi) BSA-AGE + 660 µg/ml de Octagam 25 IgIV, vii) como vi) mas as células são pré-incubadas com uma concentração de saturado de anticorpo anti-CD32a de bloqueio. A IgIV enriquecida é obtida por meio de contato da IgIV Octagam com HbAGE-Sepharose e, subseqüentemente, por meio de isolamento daquelas regiões de afinidade que se ligam à matriz de proteína dobrada incorretamente .

As DCs foram analisadas quanto aos seguintes parâmetros: densidade de superfície (intensidade de fluorescência média, MFI, ou% de células positivas) de CD83, CD86, CD80 e CD40 medido usando-se FACS, e também densidade de células/viabilidade celular, como determinado pela 5 ligação do marcador de apoptose 7-amino-actinomicina D (7 AAD). Adicionalmente, determinou-se a extensão da secreção de IL-6 e a secreção de IL-8 no sobrenadante de cultura de células usando-se ELISA Pelipair (M9316, Sanquin Reagents, Amsterdam, Países Baixos) para IL-6 e um kit Cytosets CHC 1304 (Biosource) para IL-8.

10 Resultados e discussão

A Tabela 10 mostra os resultados da análise. Verificou-se que as DCs respondem potencialmente ao estímulo de controle (poli I-C na presença de TNFalpha). Os dados demonstram que IgIV enriquecida é capaz de estimular DCs na presença de BSA-AGE. Em contraste, IgIV não-enriquecida a uma concentração 150 vezes maior, dificilmente é capaz de 15 potencializar DCs. Por exemplo, a expressão de IL-6 (4433 pg/ml) e IL-8 (19316 pg/ml) é estimulada potencialmente por IgIV enriquecida, mas só a um grau limitado com IgIV não-enriquecida (191 pg/ml e 4682 pg/ml), respectivamente. Adicionalmente, IgIV enriquecida também estimula a 20 expressão de moléculas co-estimuladoras, como CD80, CD83, CD86 e CD40. A resposta é inibida por anticorpos dirigidos contra FcγRIIa (anti-CD32a), indicando que os efeitos são mediados por este receptor de Fc.

Considerados em conjunto, estes resultados mostram que 25 regiões de afinidade, de preferência, regiões de afinidade enriquecidas, têm um papel de potencializar o sistema imunológico para remover proteínas dobrada incorretamente s, notavelmente por meio de FcR. Assim, por meio do método descrito, uma pessoa versada na arte é capaz de selecionar regiões de afinidade a serem usadas, de preferência, no tratamento de uma doença, para remover proteínas dobrada

incorrectamente s, para diminuir a contribuição das proteínas dobradas incorretamente na patologia da doença.

Exemplo 18

Análise da presença de anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico em 5 regiões de afinidade de IgIV enriquecida e em IgIV de que IgIV enriquecida foi selecionada usando-se matriz de afinidade de proteína dobrada incorretamente HbAGE-Sepharose

Nos Exemplos 1 e de 3 a 9 nós demonstramos que diversas preparações de regiões de afinidade, i.e. IgIV humana, são capazes de ligar-se 10 especificamente a proteínas dobradas incorretamente com estrutura β cruzada.

No Exemplo 10 nós demonstramos que o método amplamente disseminado de agregação por aquecimento a 65°C para a preparação de IgG humana para uso em ensaios para análise de titulações de Fator Reumatóide (RF), auto-anticorpos dirigidos contra o domínio Fc de moléculas de IgG, induz estrutura 15 β cruzada nas moléculas de IgG. Verificou-se titulações de RF em de 70 a 80% de todos os pacientes com artrite reumatóide. Adicionalmente, aproximadamente 5% da população aparentemente saudável também é positiva para RF. Nós avaliamos agora a possibilidade de que a sub-população 20 de Ig na IgIV que é capaz de ligar-se especificamente à estrutura β cruzada ou conformação de proteína induzida com estrutura β cruzada apresenta afinidade por peptídeo citrulinado cíclico (CCP, *cyclic citrullinated peptide*).

Descreveu-se extensivamente que uma população de auto-anticorpos, encontrada em mais de 80% dos pacientes com artrite reumatóide, objetiva formas desiminadas de determinadas proteínas, como fibrinogênio, 25 filagrina e vimentina. Recentemente descreveu-se que anticorpos anti-seqüências de filagrina citrulinada sintética ligam-se efetivamente a fibrina citrulinada em pacientes. Nós mostramos antes que a fibrina porta conformação de estrutura β cruzada. Na desiminação, o aminoácido arginina é convertido ao aminoácido citrulina. Portanto, este processo é referido como

citrulinação, resultando em proteínas citrulinadas. Usa-se rotineiramente testes diagnósticos para artrite reumatóide que se baseiam na ligação destes auto-anticorpos anti-proteína citrulinada para proteínas citrulinadas, como o teste ELISA de peptídeo citrulinado cíclico (CCP, *cyclic citrullinated peptide*) 5 (ELISA anti-CCP). Até a presente invenção não se sabia, em grande parte, como a citrulinação de proteínas provoca uma resposta auto-imune em pacientes com RA. Nós observamos que um resultado bem documentado de citrulinação de uma proteína é o desdobramento/redobramento da proteína. De acordo com a invenção, a citrulinação de radicais arginina pela enzima 10 peptidilarginina desiminase induz dobramento incorreto da proteína que compreende o radical arginina. O resultado da citrulinação da arginina é a perda pura de uma carga positiva na proteína. Esta perda pura de carga positiva contribui para o dobramento incorreto por meio da modulação de interações iônicas e de ligações hidrogênio, envolvidas na estabilidade e 15 integridade da estrutura tridimensional da proteína. Nós demonstramos previamente que o dobramento incorreto de proteínas com a ocorrência de conformação β cruzada torna a proteína em uma entidade imunogênica (ver pedido de patente "adjuvância β cruzada", WO2007008070). Assim, nós concluímos agora que a citrulinação de proteínas e o resultante dobramento 20 incorreto destas proteínas são acompanhados pela formação de estrutura β cruzada, explicando as características auto-imunogênicas destas proteínas citrulinadas. Para substanciar esta conclusão, nós testamos a presença de anticorpos anti-CCP em nossas regiões de afinidade de IgIV enriquecida 25 população que foi recuperada contactando-se IgIV Octagam com hemoglobina glicada dobrada incorretamente, imobilizada em NHS-Sepharose.

Materiais e métodos

As preparações de regiões de afinidade a seguir foram analisadas quanto à ocorrência de titulações de anticorpos anti-CCP:

1. IgIV Octagam (Octapharma, carga nº: 5024018434, 50 mg/ml)

5 2. 10 mg/ml de γ -globulinas humanas (Sigma G4386, lote 21k7600). Dissolvido em PBS, incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento, e subsequentemente durante 10 minutos a 37°C e novamente durante 10 minutos à temperatura ambiente em um dispositivo de rolamento.

10 3. IgIV Gammagard (Baxter Hyland Immuno Gammagard S/D 5 g, Lote LE08E044AL, 52 mg/ml, dissolvido na solução fornecida, repartido e armazenado a -20°C).

4. 103 μ g/ml de IgIV enriquecida em PBS. Enriquecida de IgIV Octagam (carga nº: 5024018434) usando-se HbAGE-Sepharose, como descrito no Exemplo 6, 7.

15 Realizou-se determinações de titulação de rotina pelo Laboratório de Imunologia Médica [*Laboratory for Medical Immunology*] (UMC Utrecht, Países Baixos) usando-se o sistema ELISA (Phadia GmbH) para a determinação de titulação de anticorpos anti-CCP. Amostras de 1 a 4 foram diluídas 10x para a análise, em lugar da diluição de 100x que é realizada rotineiramente para soro de pacientes.

20 **Resultados e discussão**

25 Determinou-se as titulações de anticorpo anti-CCP em várias preparações de regiões de afinidade, por meio do laboratório local de imunologia médica [*Laboratory for Medical Immunology*] (UMC Utrecht, Países Baixos) usando-se o sistema ELISA. Ver a Tabela 11 para as titulações determinadas. Os valores obtidos com preparações de γ -globulinas e IgIV enquadram-se nos limites indicados para determinar uma proteína de soro anti-CCP no soro como negativa com relação à finalidade de diagnosticar uma doença, i.e. <7 U/ml. Efetivamente, as titulações medidas são encontradas regularmente em soros de indivíduos aparentemente saudáveis.

Com IgIV enriquecida, agora, a titulação obtida de 2,7 U/ml é comparável com o que se mediu com Octagam IgIV, de que a IgIV enriquecida foi isolada. No entanto, a concentração de IgIV enriquecida é 485 vezes inferior, implicando a um enriquecimento de 437 vezes daa preparação de regiões de 5 afinidade de IgIV enriquecida para anticorpos anti-CCP. A partir disto, nós concluímos que as regiões de afinidade selecionadas com base em sua afinidade por Hb dobrada incorretamente também apresentam afinidade por peptídeo citrulinado.

A peptidilarginina desiminase foi localizada no nível de 10 proteína e no nível de mRNA em uma ampla variedade de tecidos e células, mas não em eritrócitos. Além disso, a presença de peptidilarginina desimases no proteoma de eritrócito não foi detectada em uma abordagem proteômica. Portanto, com base nestas verificações, nós concluímos que a hemoglobina humana (Hb) usada para glicação extensiva nos radicais lisina e arginina não 15 é citrulinada. Adicionalmente, os peptídeos citrulinados cíclicos usados na análise de titulação anti-CCP são seqüências modificadas com base na filagrina humana e efetivamente não compreendem seqüências de aminoácidos de Hb. Um alinhamento de seqüências com seqüência de aminoácido filagrina humana e seqüência de aminoácidos de Hb humana com 20 cadeia α ou cadeia β revela homologia de seqüências que é de baixa a inexistente (i.e. aproximadamente de 20 a 35%) entre filamentos de peptídeos de aproximadamente 19 radicais de aminoácidos, i.e. o comprimento da CCP da segunda geração usada na análise. Como mencionado acima, a citrulinação 25 é bem conhecida para a indução de redobramento de proteína. Portanto, nossos resultados demonstram que, com o uso de uma proteína dobrada incorretamente que compreende estrutura β cruzada, i.e. HbAGE, nós fomos capazes de selecionar, dentre uma coleção de regiões de afinidade de IgIV, um conjunto de regiões de afinidade com especificidade para CCP, que apresenta uma seqüência de aminoácidos que não é relacionada com a Hb

humana. Com esta verificação, nós substanciamos nossa conclusão de que o dobramento incorreto, seja induzido por glicação, ou induzido por citrulinação, ou induzido por qualquer outros meios ou métodos para mal dobramento de proteínas, resulta na adoção de uma característica estrutural comum na proteína, i.e. a estrutura β cruzada e/ou uma conformação induzida com estrutura β cruzada, que é independente da seqüência de aminoácidos. Isto tem uma implicação importante para a interpretação de dados de titulação anti-CCP. Agora que se revelou que regiões de afinidade que são capazes de ligar-se especificamente a proteínas citrulinadas compreendem efetivamente uma população de regiões de afinidade com especificidade para características estruturais independentes de seqüência de aminoácidos que são induzidas com citrulinação da proteína, a implicação de dobramento incorreto de proteína na patologia das doenças de que sofrem os pacientes com as titulações anti-CCP identificadas, obviamente não pode ser negligenciada.

Proteínas dobradas incorretamente formadas por meio de citrulinação são, portanto, um objetivo recentemente identificado para a direção da pesquisa conduzida para o desenvolvimento de, por exemplo, terapias específicas para RA. Nossos resultados demonstram agora que as regiões de afinidade de IgIV enriquecida obtidas usando uma matriz de proteína dobrada incorretamente, são um composto importante recentemente identificado para o desenvolvimento de drogas contra proteínas dobradas incorretamente relacionadas com RA.

Exemplo 19

Regiões de afinidade de IgIV humana enriquecida com especificidade para γ -globulinas dobradas incorretamente de camundongo

Fundamentos

Fator Reumatóide (RF) é uma composição de auto-anticorpos de IgA, IgG, IgM dirigida para epítopos no domínio Fc de moléculas auto-IgG, que são expostas quando do dobramento incorreto da IgG por exposição

ao calor. RF ocorre em de 70 a 80% dos pacientes de artrite reumatóide (RA), e titulações de RF relativamente elevadas correlacionam-se com progressão de doença grave. No Exemplo 10, nós demonstramos que métodos para expor o epítopo de RF dobrado incorretamente efetivamente as IgGs de uma maneira a formar-se estrutura β cruzada, resultando na conclusão de que RF 5 compreendem regiões de afinidade com afinidade por estrutura β cruzada ou conformação induzida com estrutura β cruzada na IgG. Nós verificamos que a imunização de um camundongo com quatro proteínas diferentes com estrutura β cruzada, i.e. A β 1-40 humana sintética, amilóide A de soro de galinha, 10 hemoglobina humana glicosada e fragmento sintético de cadeia α de fibrina humana, elicitou uma resposta imune resultando em um clone de IgM de hibridoma com especificidade por IgG humana dobrada incorretamente, que 15 comprehende estrutura β cruzada. Um ou mais dos quatro抗ígenos de proteína com seqüências de aminoácidos não-relacionadas, mas com a presença de estrutura β cruzada ou conformações induzidas com estrutura β cruzada em comum, compreendem estrutura β cruzada ou características estruturais induzidas com estrutura β cruzada que, por sorte é estreitamente 20 reminiscente das características β cruzada em IgG humana dobrada incorretamente. Uma explicação alternativa é que características β cruzada estruturais em um ou mais dos quatro抗ígenos assemelha-se à estrutura β cruzada ou conformação induzida com estrutura β cruzada em auma auto-molécula de Ig de camundongo. Pode ter ocorrido reatividade cruzada durante 25 a alta atividade do sistema imunológico, acompanhada de super-produção de Ig por células B. Conclui-se reatividade anormal do sistema imunológico de camundongo considerando o baço extremamente grande (número de células aumentado sete vezes), acompanhado de um grande número de fibroblastos infiltrados. Além disso, o camundongo apresentava-se criticamente doente durante algum tempo no ensaio de imunização. Estas observações podem ser a conseqüência de uma resposta autoimune contra auto-IgG, refletida pela

afinidade observada da IgM de hibridoma por IgG humana dobrada incorretamente. Uma terceira explicação plausível é que o camundongo apresentava um clone de IgM de ligação β cruzada geral com propriedades em comum com RF em seu repertório, assemelhando-se a IgGs que são selecionadas de IgIV humana por meio de aplicação de uma matriz de afinidade de β cruzada. Nós avaliamos agora se IgIV humana que é enriquecida de regiões de afinidade com afinidade por proteínas dobradas incorretamente quando da seleção em uma matriz de HbAGE, compreende regiões de afinidade com especificidade para IgG de camundongo dobrada incorretamente. Isto substanciará adicionalmente o nosso conhecimento sobre a existência de uma população de auto-imunoglobulinas com especificidade por proteínas dobradas incorretamente em geral.

Materiais e métodos

Para testar se o material de partida de IgIV Octagam usado como um combinado para seleção de regiões de afinidade que se ligam a estrutura β cruzada, e IgIV humana enriquecida, compreende uma população de regiões de afinidade com especificidade por IgG de camundongo dobrada incorretamente com estrutura β cruzada, nós analisamos a ligação de IgIV Octagam e IgIV enriquecida a diversas formas dobradas incorretamente de IgG de camundongo e comparamos os resultados com a ligação a IgG de camundongo nativa. Medindo-se a fluorescência de ThT e a fluorescência do vermelho Congo com IgG nativa de camundongo, IgG de camundongo expostos a elevado pH (dmIgG BASE), IgG de camundongo exposta a baixo pH (dmIgG ÁCIDO) e IgG de camundongo aquecida a 85°C em PBS (dmIgG 85°C) revelou que a estrutura β cruzada é induzida pelos diversos métodos de dobramento incorreto. O ELISA foi realizado de duas maneiras diferentes. Em uma abordagem, a IgG de camundongo foi revestida diretamente sobre os poços e recoberta com uma série de concentrações de IgIV enriquecida. De uma maneira alternativa, primeiramente revestiu-se os poços com

imunoglobulinas anti-camundongo de coelho (RAMPO, Dako Cytomation, Dinamarca). Os poços foram bloqueados (reagente de bloqueio da Roche) e, subsequentemente, as preparações de IgG de camundongo foram ligadas aos anticorpos imobilizados, antes de se aplicar nos poços uma série de 5 concentrações de IgIV Octagam humana em triplicata.

Resultados e discussão

Na Figura 24 resume-se os resultados das duas abordagens ELISA alternativas. Em ambas as abordagens experimentais as regiões de afinidade humanas ligam-se, de preferência, às diversas formas dobradas incorretamente de IgG de camundongo. Dificilmente detecta-se qualquer ligação de IgIV enriquecida a IgG nativa de camundongo, e IgIV Octagam não se ligou de forma alguma a IgG nativa de camundongo. Tanto IgIV Octagam como também IgIV enriquecida ligaram-se com a maior afinidade a dmIgG BASE, com concentrações resultando em ligação semi-máxima de 10 aproximadamente 200 µg/ml e 4,4 µg/ml de IgIV, respectivamente. O fato de que é possível observar, com IgIV enriquecida, alguma ligação a IgG nativa de camundongo, enquanto que não foi possível detectar qualquer ligação com IgIV Octagam aponta para a presença de uma determinada fração de 15 moléculas de IgG dobradas incorretamente na composição de IgG de camundongo, para a qual IgIV enriquecida possui afinidade incrementada. Deduz-se destas figuras que IgIV enriquecida é enriquecida para ligação com IgG de camundongo dobrada incorretamente por um fator de 20 aproximadamente 50.

Em conclusão, as três formas diferentes de IgG de camundongo dobradas incorretamente compreendem sítios de ligação para IgIV humana enriquecida e Octagam IgIV, de que a IgIV enriquecida é 25 selecionada. dmIgG BASE expõe a conformação de proteína dobrada incorretamente para que ambas, IgIV Octagam e IgIV enriquecida expressem a maior afinidade. Estes dados mostram que com o uso de uma matriz de

afinidade constituída de hemoglobina glicada dobrada incorretamente , uma população de regiões de afinidade é selecionada de uma composição de moléculas de IgG, i.e. Octagam IgIV, que apresenta afinidade por IgG de camundongo dobrada incorretamente . Isto aponta para a ocorrência de 5 regiões de afinidade similares a RF na fração selecionada de IgIV enriquecida, e, assim, na Octagam IgIV, i.e. regiões de afinidade que se ligam preferivelmente a regiões de afinidade dobradas incorretamente com estrutura β cruzada.

Exemplo 20

10 Uma IgM de hibridoma com propriedades de ligação reminiscentes de Fator Reumatóide

Fundamentos

Como mencionado previamente na seção de Materiais e Métodos dos Exemplos de 1 a 5, IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 15 liga-se especificamente a algumas formas dobradas incorretamente de imunoglobulinas humanas. Assim, nós designamos 7H2H2 como um anticorpo similar a Fator Reumatóide. O camundongo foi imunizado consecutivamente com A β 1-40 humano sintético, amilóide A de soro de frango, hemoglobina humana glicada e peptídeo sintético de cadeia α de 20 fibrina humana, antes de se isolar o cérebro para a preparação de hibridoma. É digno de nota observar que, no momento em que o baço foi removido, ele compreendia uma número extraordinariamente grande de células, $7*10^8$ (número normal é de $1*10^8$ células). Adicionalmente, o baço compreendia um número excepcionalmente grande de fibroblastos infiltrados. Estas 25 observações apontam para um baço altamente ativo, devido à elevada atividade do sistema imunológico do camundongo. É digno de nota observar que, aproximadamente 40 semanas após as primeiras imunizações com A β , antes de qualquer imunização com um segundo, terceiro ou quarto antígeno dobrado incorretamente , o camundongo ficou doente, mas recuperou-se

dentro de algumas poucas semanas, bem antes da imunização com o segundo antígeno, i.e. SAA de frango. O fato de que 7H2H2 reconhece γ -imunoglobulinas e IgIV dobrada incorretamente, enquanto que se usa quatro antígenos para imunizações que compreendem seqüências de aminoácidos 5 não relacionadas, e não se usa imunoglobulinas (estranhas) como antígeno, combinado com a observação de um sistema imunológico altamente ativado e a doença do camundongo em algum ponto durante o procedimento de imunização, o que nos permitiu concluir que o camundongo desenvolveu resposta autoimune dirigida para auto-anticorpos. Para analisar 10 adicionalmente as exigências estruturais de IgGs humanas para expor o epítopo a 7H2H2, nós realizamos experimentos de ligação com uma série de preparações de IgG humana que compreendem anticorpos dobrado incorretamente obtidos por meio de métodos diferentes.

Materiais e métodos

15 Para a análise da ligação do clone de hibridoma IgM 7H2H2 a diversos aspectos estruturais da IgG humana, usou-se uma série de diluições de 7H2H2 purificada (2,5 mg/ml em PBS; P. van Kooten, instalação de ABC-Hibridoma, University of Utrecht/UMC Utrecht, Países Baixos) ou uma concentração fixa de 12,5 μ g/ml de IgM em ELISAs com IgGs humanas 20 imobilizadas. Como um controle negativo usou-se IgM de hibridoma 2G10. Formas dobradas incorretamente de IgGs humanas e controles nativos usados para as análises são descritos na Figura 25, e são: 1) IgIV, 5 minutos a 65°C 25 (método de 'RF'), 2) IgIV 65°C, 3) IgIV 69, 4) IgIV 76, 5) IgIV 80, 6) IgIV 83, 7) IgIV 86, 8) controle de IgIV Ácido/base, 9) IgIV Ácido, 10) IgIV base, 11) IgIV Gammagard nativa, 12) IgIV HFIP/TFA, 13) IgIV NaPi 5 mg/ml, 14) IgIV NaPi 20 mg/ml, e 15) IgG BASE desnaturada, 37°C. Para detalhes estruturais, referir à seção de 'Materiais e Métodos Gerais' por os exemplos de 6 a 20 sobre a preparação e determinação da estrutura de padrões β cruzada. Na Figura 8 e 9 descreve-se características estruturais das 15 formas de IgG

humana. As γ -globulinas humanas que foram aquecidas durante 30 minutos a 37°C após adição de NaOH (hIgG-BASE-37°C) aparecem como grandes particulados em suspensão (Figura 9L), apresentam fluorescência de Trp incrementada se comparada com IgIV nativa (Figura 8F) e a preparação 5 aumenta a fluorescência de ThT e CR (Figura 8A, B).

Em um segundo experimento, a ligação de uma série de concentrações de IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 purificada a diversas preparações de γ -globulinas de camundongo foi comparado com hIgG-BASE-37°C e o controle de IgIV Gammagard nativa, e comparada com 10 a ligação do controle de IgM de hibridoma de camundongo 2G10 à mesma série de preparações de IgG. As mesmas preparações de IgG de camundongo que no Exemplo 19 foram incorporadas no estudo, i.e. mIgG nativa, dmIgG ÁCIDO, dmIgG BASE, dmlgG 85°C. As preparações de IgG de camundongo e humana à base de 5 μ g/ml ou tamponador de controle foram aplicadas 15 revestindo placas de ELISA de alta ligação Microlon (Greiner), que foram bloqueadas com reagente de bloqueio (Roche) após o revestimento. IgM 7H2H2 e IgM 2G10 (controle negativo) foram aplicadas nos poços em triplicata a 0/1/10/100 μ g/ml em PBS/0,1% de Tween20. Após a lavagem, detectou-se a ligação de IgM usando anticorpo secundário anti-camundongo- 20 IgM-PO de cabra (Jackson), diluído a 1:5000 em PBS/0,1% de Tween20. A absorbância foi lida a 450 nm. Sinais de fundo medidos para poços não revestidos com a série de concentrações de IgM, e sinais de fundo obtidos com poços revestidos com IgG com 0 μ g/ml sw IgM, mas com anticorpo secundário, foram subtraídos dos sinais correspondentes com poços revestidos 25 com IgG recobertos com IgM.

Resultados e discussão

Na Figura 25A descreve-se que 12,5 μ g/ml de IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 não se ligam ou dificilmente se ligam a preparações de IgG humana 1, 2, 3, 9, 10, 11, 13 e 14, ligam-se em menor

grau a preparações 4 e 5, ligam-se moderadamente a 6, 7, 8 e 12, e ligam-se melhor à preparação de IgG humana 15 (γ -globulinas, condições básicas, tratadas durante 30 minutos a 37°C, seguido de ajuste do pH com HCl de volta ao pH fisiológico). Quando a ligação da 7H2H2 purificada é analisada 5 com as preparações 1, 6, 11, 14 e 15, não se detecta IgIV Octagam nativa, 1) IgIV 5 minutos a 65°C (método 'RF'), 11) IgIV Gammagard nativa ou 14) IgIV NaPi 20 mg/ml (Figura 25B). Observa-se ligação similar de alta-afinidade com preparação de IgG humana 6) IgIV Gammagard aquecida a 10 83°C a 5 mg/ml em 20 mM de fosfato de sódio pH 5,0, e 15) IgG BASE desnaturada, 37°C, a 5 mg/ml, a 37°C. O número dos sítios de ligação é comparável (B_{max} é de 0,65 e 0,59 a.u., respectivamente), e também a concentração de 7H2H2 à qual metade dos sítios de ligação são ocupados, i.e. 15 3,3 μ g/ml de 7H2H2 para ambas as preparações de IgG dobrada incorretamente imobilizadas. Preparação 15) apareceu em imagens de TEM como estruturas agregadas similares a IgIV BASE (amostra 10) e IgIV HFIP/TFA (amostra 12). O controle negativo para a ligação de IgM com as 20 IgGs humanas imobilizadas, IgM de hibridoma 2G10, não mostrou qualquer afinidade pelas preparações de IgG humana (dados não mostrados). No caso da preparação 6) é evidente, a partir da Figura 9, que todas as sondas 25 fluorescentes se ligam em grau relativamente elevado, e até mesmo no maior grau, com respeito ao vermelho Congo e Tioflavina S, em comparação com todas as outras preparações (Figura 8). No entanto, a amostra 6) aumentou moderadamente a ativação de tPA/plasminogênio, enquanto que 9) e 12) potencializaram fortemente a atividade de protease (Figura 9M). Análise de imagens TEM revelou que o aumento da fluorescência de corantes 30 correlaciona-se positivamente, até certo ponto, com um aumento do tamanho dos multímeros. Conclui-se que os seis pontos de dados de fluorescência (CR, ThT, ThS, Trp, bis-ANS e ANS) formam, em conjunto, potência preditiva da ligação esperada de 7H2H2. A multiplicação dos sinais para cada preparação

de IgG poderia predizer efetivamente que a amostra 6) apresentará, na melhor das hipóteses, ligante vantajoso para o clone de hibridoma. Quando também se considera a ativação de tPA/plasminogênio, prediz-se uma ligação um tanto maior de 7H2H2 com as amostras 9) e 12). Em conclusão, parece que a magnitude aumentada de ligação de uma série de corantes fluorescentes com afinidade por estrutura β cruzada, i.e. CR, ThT e ThS, ou que a exposição a solvente de sonda de remendos hidrofóbicos na estrutura de proteína, i.e. bis-ANS e ANS, e alterações no ambiente local de radicais Trp, apresentados como aumentos da intensidade de fluorescência, predizem se o clone de IgM de hibridoma 7H2H2 se ligará com maior afinidade. Estes resultados demonstram claramente que, em algum momento, o camundongo desenvolveu, seja como uma resposta imune inata, ou como uma resposta adaptativa à exposição a um ou mais dos quatro antígenos β cruzada estranhos usados para imunização, uma resposta imune a epítópos que estão ocultos ou não presentes em IgGs dobradas nativamente, i.e. estrutura β cruzada exposta, ou conformação induzida com estrutura β cruzada. Em resumo, nossos resultados mostram que, selecionando uma determinada proteína dobrada incorretamente ou conjunto de proteínas dobrada incorretamente s, inflige-se uma resposta imune em camundongos, resultando em regiões de afinidade com clara especificidade por uma proteína dobrada incorretamente definida, com ligação preferencial a um determinado aspecto da estrutura β cruzada ou conformação exposta mediada com β cruzada.

Na Figura 25C mostra-se que 7H2H2, em todas as concentrações testadas, liga-se a hIgG-BASE-37°C, de acordo com o que se demonstrou na Figura 25A e B. A 100 μ g/ml também se observa alguma ligação a IgIV Gammagard nativa. Isto pode refletir a presença de um determinado percentual de agregados de IgIV em Gammagard, ou isto pode apresentar as condições desnaturadoras da placa de ELISA usada. O controle negativo IgM 2G10 não ligou-se de forma alguma. Na Figura 25D observa-se

que, já a 1 μ g/ml, 7H2H2 liga a γ -globulinas de camundongo desnaturadas com ácido (dmIgG-ácido). A 10 e 100 μ g/ml a IgM de hibridoma liga-se a todas as três formas de auto-IgG dobrada incorretamente, com os maiores sinais obtidos a 100 μ g/ml para dmIgG-ÁCIDO e dmIgG-BASE. A 100 μ g/ml 5 também ocorre alguma ligação a mIgG nativa. O controle negativo IgM 2G10 não se ligou a qualquer uma das preparações de IgG de camundongo (não mostrado). Com estes resultados demonstra-se claramente que a IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 não só se liga especificamente a formas dobradas incorretamente de IgG humana, mas também a formas dobradas incorretamente de auto-IgG de camundongo. Isto mostra que o camundongo 10 que o clone de hibridoma 7H2H2 foi selecionado desenvolveu uma resposta auto-imune contra auto-IgG. Isto pode ter ocorrido durante os ensaios de imunização com as quatro diferentes proteínas não-IgG, não-auto dobrada incorretamente s, i.e. AB sintético humano, SAA de frango, HbAGE humana e fragmento de fibrina humana sintética. Com a observação de que 15 7H2H2 se liga a auto-IgG de camundongo dobrada incorretamente com estrutura β cruzada, esta IgM de hibridoma é projetada como um anticorpo de Fator Reumatóide. Doença do camundongo durante o experimento de imunização e o baço incomumente grande com uma quantidade incomumente 20 grande de fibroblastos infiltrados estão relacionados com uma resposta auto-imune disparada enquanto imunizada com diferentes proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada.

Regiões de afinidade recombinantes/sintéticas

Geração de regiões de afinidade recombinantes/sintéticas obtidas de IgIV 25 enriquecida

A presente invenção revela métodos e meio para a seleção de regiões de afinidade específicas para proteínas dobradas incorretamente para o diagnóstico e tratamento de dobramento incorreto de proteína e doenças de dobramento incorreto de proteínas. Regiões de afinidade são selecionadas de

qualquer biblioteca combinatorial de regiões de afinidade, como por exemplo, imunoglobulinas humanas naturalmente ocorrentes (i.e. IgIV ou IVIg humana). Regiões de afinidade análogas àquelas obtidas desta maneira são preparadas, por exemplo, por via recombinante ou sintética com a aplicação de técnicas convencionais conhecidas por uma pessoa versada na arte, incluindo análise de seqüência de proteínas, tecnologia de expressão e clonagem de DNA. Este exemplo descreve uma concretização. Em etapas subseqüentes: (1) a seqüência de aminoácidos, pelo menos das regiões variáveis das cadeias de cadeia pesada e de cadeia leve, ou pelo menos das regiões determinadoras de complementaridade 1-3 (CDRs), ou pelo menos de CDR3 da cadeia pesada (HC, *heavy chain*) das regiões de afinidade isoladas individuais, é obtida por meio de análise de seqüência de proteínas. (2) Uma seqüência de DNA que codifica a seqüência de aminoácidos identificada é preparada sinteticamente. Como uma alternativa para a seqüência exata determinada por meio de análise de proteína, é possível usar uma seqüência em que se introduz uma ou mais mutações, de preferência, na CDR3, e, de forma ainda mais preferível, na CDR3 da cadeia pesada (HC, *heavy chain*), de forma a produzir regiões de afinidade com afinidade alterada, de preferência, afinidade aumentada e/ou mais específica. (3) O DNA é clonado em um vetor de expressão apropriado. Referido vetor já contém, de preferência, as seqüências que codificam as regiões constantes de imunoglobulinas do tipo desejado, como para se obter IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM, IgA, IgE etc. (4) O vetor é transduzido por qualquer via em um sistema de expressão de escol, de preferência, uma célula mamífera. (5) Seleciona-se as células que expressam a região de afinidade. (6) Regiões de afinidade preparadas por via recombinante são purificadas das células ou de sobrenadante de cultura derivada de células. Caso se venha a introduzir mutações na seqüência de região de afinidade original para otimizar a afinidade, as regiões de afinidade recentemente preparadas podem ser re-selecionadas usando-os métodos em meios

divulgados. Referida geração de regiões de afinidade semi-sintéticas com um repertório ainda mais aumentado de regiões de afinidade, de preferência, nas regiões determinadoras de complementaridade, de preferência, na CDR3, ainda mais preferivelmente na CDR3 da HC, é realizada, de preferência, por 5 meio de geração de uma biblioteca semi-sintética, como uma biblioteca de apresentação de fago (ver abaixo).

Geração de regiões de afinidade recombinantes/sintéticas

Além de uma coleção de imunoglobulinas humanas, como IVTg obtida de sangue, também é possível obter uma biblioteca combinatorial 10 a partir de outro conjunto de regiões de afinidade, de preferência, um conjunto de regiões de afinidade recombinantes, como aquelas presentes em uma biblioteca de apresentação de fago (Winter *et al.* 1994; Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005). De preferência, uma biblioteca do tipo referido 15 constitui-se de seqüências relacionadas com regiões de afinidade mamíferas, de preferência, regiões de afinidade humanas, como imunoglobulinas. De preferência, uma biblioteca de apresentação de fago do tipo referido 20 compreendendo uma coleção de regiões de afinidade é preparada como a seguir (Winter *et al.* 1994, de Kruif *et al.* 1995a, 1995b). Em primeiro lugar, extrai-se RNA de células B ou de um tecido compreendendo células B. 25 Subsequentemente, prepara-se cDNA. Em seguida, amplifica-se cDNA codificando as regiões variáveis, que é clonado em um vetor de fagomídeo apropriado e transformada em um hospedeiro apropriado, como por exemplo, uma cepa de *Escherichia coli*. Desta maneira expressa-se regiões de afinidade, i.e. apresentadas por fagos, como proteínas de fusão sobre a superfície de 30 bacteriófagos filamentosos. Uma biblioteca de apresentação de fago é preparada, por exemplo, a partir de células B obtidas de um mamífero saudável, de preferência, um humano, camundongo, rato ou lhama, ou, alternativamente, de um mamífero imunized com uma proteína dobrada incorretamente. Em uma concretização, uma biblioteca de apresentação de 35

fago é preparada de Células B de um mamífero, de preferência, um humano que sofre de uma doença particular, de preferência, uma doença de mal dobramento, como por exemplo, RA. Desta maneira, prepara-se uma coleção de regiões de afinidade com um objetivo específico de compreender aquelas 5 regiões de afinidade específicas para proteínas dobrada incorretamente s, por exemplo, um camundongo é imunized uma vez ou várias vezes com uma, ou uma seleção de, proteínas dobradas incorretamente (como neste exemplo 20), células B são isoladas do baço e usadas para preparar uma biblioteca de apresentação de fago. Em outro exemplo, células B são isoladas de um 10 humano com uma doença particular, por exemplo, artrite (reumatóide). cDNA preparado a partir destas células B é então usado para preparar uma biblioteca de apresentação de fago. Desta maneira, prepara-se uma biblioteca de apresentação de fago para compreender regiões de afinidade com especificidade por proteínas dobradas incorretamente envolvidas na doença de 15 mal dobramento selecionada. Por exemplo, uma biblioteca é preparada com regiões de afinidade para o domínio Fc de Igs, i.e. regiões de afinidade, como Fator Reumatóide (RF) (van Esch *et al.* 2003, *Clin Exp. Immunol.*). Da maneira descrita acima, uma pessoa versada na arte é capaz de projetar e 20 preparar uma biblioteca de apresentação de fago com qualquer coleção de regiões de afinidade, com ênfase em uma aplicação ou doença particular.

Também é possível preparar sinteticamente uma biblioteca de apresentação de fago com uma coleção de regiões de afinidade do tipo referido com um repertório incrementado (Hoogenboom, 1992, 1997, 2000, 2002, 2005; de Kruif *et al.* 1995a, 1995b). Desta maneira, uma pessoa versada na arte é capaz 25 de projetar uma biblioteca compreendendo regiões de afinidade de diversidade adicional considerável. É muito notável que, implementando-se seqüências adicionais nas regiões hipervariáveis, as CDRs que interagem com o antígeno, se prepara regiões de afinidade adicionais, remodelando os domínios variáveis. Além de regiões de afinidade obtidas de seqüências humanas, uma pessoa versada na

arte é capaz de criar uma coleção de regiões de afinidade de qualquer outra espécie, como lhama, camelo, alpaca ou camelídeo, para obter regiões de afinidade, como anticorpos de lhama, também referidos como nanocorpos, com propriedades relacionadas com estas espécies. Assim, prepara-se de muitas maneiras uma biblioteca de apresentação de fago e/ou uma coleção de regiões de afinidade, de preferência, de um mamífero imunizado com uma, ou um conjunto de, proteínas dobrada incorretamente s. Em uma concretização particularmente preferida, prepara-se uma biblioteca de apresentação de fago e/ou uma coleção de regiões de afinidade de um mamífero com uma doença, de preferência, uma doença de mal dobramento. Regiões de afinidade específicas para proteínas dobradas incorretamente são selecionadas de uma biblioteca de apresentação de fago usando-se os meios e métodos revelados, combinados com procedimentos convencionais para isolar fagos. Da maneira mais direta, em uma concretização preferida, proteínas dobradas incorretamente são preparadas e são imobilizadas, de preferência, de acordo com qualquer um dos procedimentos divulgados neste pedido e, subsequentemente, deixados ligarem-se a fagos. Após lavagem extensiva, fagos ligados são recuperados e amplificados por meio de reinfecção do hospedeiro. Para permitir a recuperação de fagos específicos, o procedimento de seleção é repetido, de preferência, diversas vezes. Finalmente, isola-se aqueles fagos que são capazes de se ligarem especificamente a alvos dobrado incorretamente s. Alternativamente, proteínas dobradas incorretamente são isoladas da amostra de tecido obtida de um indivíduo ou de uma combinação de indivíduos com uma doença. Por exemplo, proteínas dobradas incorretamente são isoladas usando-se uma proteína que é capaz de ligar-se especificamente a proteínas dobradas incorretamente compreendendo estrutura β cruzada, como tPA, RAGE ou um equivalente funcional da mesma (ver Tabela 4), de fluido sinovial de um paciente com artrite (reumatóide). Em analogia, é possível considerar qualquer outra amostra.

Usando abordagens como descritas acima, obtém-se, por via

recombinante, regiões de afinidade para proteínas dobrada incorretamente s.

Após seleção dos fagos apropriados, isola-se, de preferência, DNA que codifica as regiões variáveis das regiões de afinidade isoladas, do DNA de fagomídeo para gerar anticorpos plenos. Isto é facilmente realizado por uma

5 pessoa versada na arte de acordo com procedimentos convencionais. O DNA é clonado, de preferência, em vetores que codificam as regiões constantes para as cadeias pesada e leve. É possível usar qualquer vetor e qualquer tipo desejado de região constante. O vetor é transduzido por meio de qualquer maneira conhecida para um sistema de expressão de escol, de preferência, a célula mamífera.

10 Seleciona-se as células que exprssam a região de afinidade. Regiões de afinidade preparadas por via recombinante são purificadas, de preferência, das células ou sobrenadantes de culturas derivadas de células. Desta maneira é possível preparar qualquer região de afinidade de imunoglobulina (Bloemendal *et al* 2004; Huls *et al* 1999a, 1999b; Boel *et al* 2000).

15 **Geração de regiões de afinidade recombinantes "quiméricas" ou "humanizadas"**

Para uso em humanos, regiões de afinidade obtidas de outras espécies são modificadas, de preferência, de tal modo que seqüências não-humanas são substituídas por seqüências humanas, sempre que possível,

20 embora, de preferência, sem influenciar demais as propriedades de ligação da região de afinidade. Regiões de afinidade também são preparadas durante estratégias clássicas de imunização, de preferência, usando camundongos ou ratos, ainda mais preferivelmente usando camundongos transgênicos que codificam imunoglobulinas humanas. Após a imunização, linhas de células de

25 hibridoma expressando anticorpos monoclonais são preparados por meio de procedimentos convencionais, ou aplicando-se a tecnologia indicada acima de apresentação de fago. Seleciona-se anticorpos monoclonais que são capazes de interagir especificamente com proteínas dobrada incorretamente s. Versões "quiméricas" ou "humanizadas" de referidas regiões de afinidade, quando

preparadas usando-se camundongos ou ratos normais, são preparadas, por exemplo, substituindo-se as regiões constantes não-humans e as regiões variáveis não-humanas relevantes pelas regiões homólogas humanas relevantes (Morrison *et al* 1984; Jones *et al*. 1986). Além disso, introduz-se 5 regiões constantes quando desejado.

Sumário baseado nos Exemplos de 1-20

Procedimento para selecionar regiões de afinidade enriquecidas com uma ou um conjunto de proteínas dobrada incorretamente s, de preferência, específicas para uma doença ou problema de saúde particular associado 10 com a proteína dobrada incorretamente ou conjunto de proteínas dobrada incorretamente s.

Nos Exemplos de 1 a 9 nós demonstramos que com o uso de matrizes de afinidade contendo proteínas dobradas incorretamente compreendendo proteínas dobradas incorretamente e/ou estrutura β cruzada, 15 regiões de afinidade são selecionadas de qualquer composição de regiões de afinidade, que se ligam preferivelmente e seletivamente e com maior afinidade a proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo estrutura β cruzada, que não foram incluídas necessariamente no conjunto de regiões de afinidade usadas para a seleção. Os Exemplos demonstraram que, 20 com o uso de um suporte solidocom proteínas dobradas incorretamente imobilizadas selecionadas compreendendo estrutura β cruzada, nós somos capazes de isolar de uma coleção de regiões de afinidade aquelas regiões de afinidade que apresentam afinidade por virtualmente qualquer proteína dobrada incorretamente . Com matrizes de HbAGE, dHSA, fibrilos de A β e 25 de dIgIV que se ligam a dHSA, fibrilos de A β , agregados de A β não-fibrilares, dOVA, BSA-AGE, Hb-AGE, IgG de camundongo dobrada incorretamente , proteína/peptídeo citrulinado, ApoA-I e oxLDL. Múltiplos membros desta lista de ligantes para a composição de IgIV contribuem para a patologia de doenças de dobramento incorreto de proteínas, como por

exemplo, A β (doença de Alzheimer), oxLDL e ApoA-I (aterosclerose, amiloidose), proteínas glicadas (amiloidose, doença renal de estágio final, diabetes, RA), IgG dobrada incorretamente , proteínas citrulinadas (AL amiloidose, RA).

5 Adicionalmente, nós mostramos que tanto com proteínas dobradas incorretamente com aspecto fibrilar, como também com agregados de proteína dobrada incorretamente não apresentando características fibrilares, seleciona-se regiões de afinidade que apresentam ampla faixa de especificidade por proteínas dobradas incorretamente compreendendo
 10 estrutura β cruzada. Com matriz de afinidade de fibrilos de A β selecionou-se regiões de afinidade que apresentaram afinidade por multímeros não-fibrilares de, por exemplo, BSA-AGE dobrada incorretamente , agregados de A β e dOVA. Por outro lado, com o uso de matriz de HbAGE não fibrilar ou matriz de IgIV não-fibrilar dobrada incorretamente , selecionou-se regiões de
 15 afinidade que se ligam eficientemente a fibrilos de A β .

Com o uso de uma matriz de AGE-albumina de soro bovino, demonstramos regiões de afinidade com afinidade por A β humano, albumina humana e ovalbumina de galinha. Com o uso de matriz de A β humano selecionou-se regiões de afinidade que se ligam a albumina de soro bovina glicada e ovalbumina de galinha. Com matriz de Hb humana glicado selecionou-se regiões de afinidade que se ligam a IgG de camundongo dobrada incorretamente . Estes dados mostram que com proteínas dobradas incorretamente que se originam de um espécie, seleciona-se regiões de afinidade humanas que apresentam afinidade por proteínas dobradas incorretamente que se originam de outra espécie.
 20
 25

Em conclusão, nós demonstramos que, de uma coleção de regiões de afinidade IgIV humana selecionou-se uma seleção de regiões de afinidade que se originam de pelo menos quatro diferentes clones de células B produzindo isótipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que apresentam propriedades

de ligação no sentido de uma ampla faixa de proteínas que se originam de diversas espécies e que nem apresentam homologia substancial de seqüências de aminoácidos, nem comprimento similar de seqüências de aminoácidos, nem estrutura 3D congruente ou similar em sua dobra nativa, embora 5 compartilhem uma característica estrutural comum a proteínas dobrada incorretamente s. Esta característica estrutural pode ser introduzida na estrutura da proteína por diversos meios, como por exemplo, mas sem restringir-se, a glicação de radicais lisina e arginina, citrulinação de argininas, oxidação de cadeias laterais de aminoácidos, e qualquer combinação de 10 exposição a baixo pH, alto pH, calor, carboidratos, todos em concentração variável de proteína. As regiões de afinidade selecionadas com especificidade por proteínas dobradas incorretamente e/ou proteínas compreendendo estrutura β cruzada são úteis para uma variedade de aplicações. Indica-se 15 abaixo, de maneira mais detalhada, regiões de afinidade enriquecidas usadas para terapia contra doenças de dobramento incorreto de proteínas.

Os meios e métodos revelados permitem a seleção de regiões de afinidade que são aplicáveis em terapêuticas e/ou diagnósticos para doenças associadas com mal dobramento de proteínas. Um sumário que delineia as 20 características gerais de procedimentos preferidos encontra-se descrito na Figura 26. É possível usar qualquer proteína dobrada incorretamente de escolha (*mistura X* e *Y* na Figura 26, representando o *Misfoldome*) que é vantajosa para ser usadas na seleção de regiões de afinidade, porém, de preferência, proteínas dobradas incorretamente (*mistura A* na Figura 26) que estão implicadas em doença. Como 25 proteínas dobradas incorretamente compartilham características comuns, de uma maneira geral se selecionará regiões de afinidade que se ligam a mais de uma proteína dobrada incorretamente em particular. No entanto, como revelado neste pedido, também é possível selecionar regiões de afinidade que se ligam, de preferência, a um subconjunto ou mesmo a um tipo único de proteína dobrada incorretamente. Combinando-se um conjunto de colunas, uma pessoa versada na

arte é capaz de selecionar aquelas regiões de afinidade que são aplicáveis na terapêutica e/ou no diagnóstico do dobramento incorreto em geral, ou que são aplicáveis, de preferência, a uma doença ou conjunto de doenças em particular em que uma proteína dobrada incorretamente de escol está implicada. Como descrito 5 na Figura 26 aplicação de coluna I (mistura de proteínas dobradas incorretamente não necessariamente relacionadas com uma doença) resultará em regiões de afinidade (preparação 1) com afinidade por proteínas dobradas incorretamente em geral, i.e. o *Misfoldome*. Referidas regiões de afinidade são vantajosas para diagnósticos e também para terapia. No entanto o uso de referidas regiões de 10 afinidade para fins terapêuticos implica os riscos potenciais de efeitos colaterais, devido ao fato de se introduz no paciente regiões de afinidade que não só se ligam à proteína dobrada incorretamente relacionada com doença (efeitos terapêuticos desejados), mas, adicionalmente, a outras proteínas dobradas incorretamente presentes (efeitos colaterais impredizíveis da terapia). Combinando-se as colunas I 15 e III, e, mais preferivelmente, II e IV, uma pessoa versada na arte seleciona aquelas regiões de afinidade que interagem, de preferência, com proteínas dobradas incorretamente específicas para uma doença ou um conjunto de doenças. A coluna IV é usada para remover aquelas regiões de afinidade que são capazes de interagir com proteínas dobradas incorretamente que não são relacionadas com a 20 doença-alvo de escol. Conseqüentemente, preparações 3 e 4 são selecionadas, de preferência, para fins terapêuticos.

Tabelas:

Tabela 1: Efeitos colaterais reportados relacionados com a administração de IgIV a pacientes‡			
trombose venosa	trombose arterial	cefaléia	alafrios
náusea	febre	câimbras	taquicardia
meningite asséptica	falha renal (aguda)	anafilaxia	eventos tromboembólicos
pseudo-hiponatremia	dor nas costas	cefaléia passageira	ataques apopléticos
hipotensão	anemia hemolítica	hemólise hemolítica	nefro-toxicicidade
intolerância (anticorpos anti-IgA quando deficientes de IgA)	pseudo-hiponatraemia em neonatos	resposta imune reduzida contra algumas vacinas de vírus vivo (vacina contra caxumba, sarampo, varicela/rubéola)	síndrome de von Willebrand adquirida em associação com um anticoagulante similar a lúpus
exantema	eczema	aplasia de células vermelhas pura	fadiga
acidentes	hiperviscosidade em	isquemia miocárdica aguda	ataques isquêmicos

cerebrovasculares	neonatos		transientes
neutropenia transiente	lesão de transplante renal aguda	infarto miocárdico agudo	síndrome urêmica hemolítica
dora no sítio de injeção			
‡ Dados são obtidos de referências da literatura obtidas por pesquisa de dados Pubmed, e de folhas de dados de Octagam e Gammagard			

Tabela 2: Identidades de seqüências de peptídeos sintéticos

Peptídeo	Identidade de seqüências	Seqüência de aminoácidos
FP13 K157G	SEQ-ID 1	KRLEVDIDIGIRS
A β (1-40)	SEQ-ID 2	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
A β (1-40) E22Q	SEQ-ID 3	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAQDVGSNKGAIIGLMVGGVV
FP10	SEQ-ID 4	KRLEVDIDIK
peptídeo de príon de levedura	SEQ-ID 5	GNNQQNY
FP6	SEQ-ID 6	IDIKIR
TRAP	SEQ-ID 7	SFLLRN
PPACK	SEQ-ID 8	FPR-clorometilcetona
Abeta1-42	SEQ-ID 9	DAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAETDVGSNKG AIIGLMVGGV VIA

Tabela 3: Compostos de ligação de conformação de estrutura β cruzada

vermelho Congo	crisamina G	tioflavina T
2-(4'-(metilamino)fenil)-6-metilbenzotiazol	qualquer outro químico/corante de ligação amilóide	glicosaminoglicanos
tioflavina S	corantes de estirila	BTA-1
poli(ácido tiofeno acético)	polieletrólito conjugado PTAA-Li	

Tabela 4: Proteínas que atuam na Via β cruzada por meio de ligação a e/ou interação com proteínas dobrada incorretamente

ativador de plasminogênio de tipo tissular	domínio(s) de dedo de tPA, fator XII, fibronectina, HGFA	apoliproteína E
domínios de dedo	proteínas compreendendo domínios de dedo, p. ex. tPA, HGFA, fator XII, fibronectina	Regiões de afinidade
fator XII	plasmina(ogênio)	metaloprotease-1 de matriz
fibronectina	receptor de 7KD-neurotrofina (p75NTR)	metaloprotease-2 de matriz
ativador de fator de crescimento de hepatócitos	α 2-macroglobulina	metaloprotease-3 de matriz
componente amilóide P do soro	quininogênio com alto peso molecular	anticorpo monoclonal 2C11 (F8A6)‡
C1q	catepsina K	anticorpo monoclonal 4A6(A7)‡
CD36	metaloprotease 9 de matriz	anticorpo monoclonal 2E2(B3)‡
receptor para produtos finais de glicação avançada	Haem oxigenase-1	anticorpo monoclonal 7H1(C6)‡
receptor aglutinador-A	proteína relacionada com receptor de lipoproteína de baixa	anticorpo monoclonal 7H2(H2)‡

	densidade (LRP, CD91)	
receptor de aglutinador-B	DnaK	anticorpo monoclonal 7H9(B9) ‡
guia ER Erp57	GroEL	anticorpo monoclonal 8F2(G7) ‡
Calreticulina	VEGF165	anticorpo monoclonal 4F4‡
anticorpo conformacional monoclonal WO1 (ref.(O'Nuallain e Wetzel, 2002))	anticorpo monoclonal conformacional WO2 (ref. (O'Nuallain e Wetzel, 2002))	anticorpo específico para oligômero amilóide (ref. (Kayed <i>et al.</i> 2003))
similar a receptor de peptídeo de formila 1	$\alpha(6)\beta(1)$ -integrina	CD47
anticorpo AGE-anti-albumina de coelho, purificado com $A\beta^a$)	CD40	apo A-I pertencente a lipoproteínas pequenas de alta densidade
apoJ/clusterina	10 vezes o excesso molar de PPACK 10 mM ϵ (ACA, (100 pM - 500 nM) tPA ²)	ligante de CD40
receptor de aglutinador de macrófagos CD163	região de afinidade com afinidade por d- γ -globulinas de camundongo	BiP/grp78
Erdj3	haptoglobina	complexo de $\alpha 2$ -macroglobulina-tripsina
complexo de $\alpha 2$ -macroglobulina- α -quimiotripsina	$\alpha 2$ -macroglobulina-bromelaína	Fator reumatóide
isótipo IgA de Fator reumatóide	isótipo IgB de Fator reumatóide	isótipo IgM de Fator reumatóide
receptor de células B com cadeias alfa, ou gama, ou mu	(auto)anticorpo de peptídeo citrulinado anti-cíclico	(auto)anticorpo anti-proteína citrulada
HSP60	HSP90	DNAK
HSP104	CIpA	CIpB
regiões de afinidade com afinidade por proteínas dobrada incorretamente das	anticorpo anti-peptídeo/proteína citrulindada	regiões de afinidade coletadas de uma composição de regiões de afinidade usando-se uma matriz de afinidade de β cruzada
regiões de afinidade coletadas de uma composição de regiões de afinidade usando uma matriz de afinidade de HbAGE β cruzada	regiões de afinidade coletadas de uma composição de regiões de afinidade usando-se uma matriz de afinidade de dIgIV β cruzada	regiões de afinidade coletadas de uma composição de regiões de afinidade usando-se uma matriz de afinidade de BSSAGE β cruzada
regiões de afinidade coletadas de uma composição de regiões de afinidade usando-se uma matriz de afinidade de $A\beta$ β cruzada	regiões de afinidade coletadas de uma composição de regiões de afinidade usando-se uma matriz de afinidade de fibrilos de $A\beta$ β cruzada	regiões de afinidade collected from uma composição de regiões de afinidade usando-se uma matriz de afinidade de dHSA β cruzada
anticorpos de imunoglobulina G (IgG) (humana) de amplo espectro (IgIV, IVIg)	regiões de afinidade com afinidade por estrutura β cruzada ou conformação induzida com β cruzada, p. ex. coletada de uma composição de regiões de afinidade	regiões de afinidade coletadas de soro/plasma/fluido sinovial do paciente usando-se matriz de região de afinidade com afinidade por estrutura β cruzada e/ou conformação induzida com β cruzada
região de afinidade com afinidade por oxDL/ApoB-100	região de afinidade com afinidade por ApoA-I dobrada incorretamente	região de afinidade com afinidade por $A\beta$
região de afinidade com afinidade por fibrilos de $A\beta$	região de afinidade com afinidade por agregados de $A\beta$ não-	região de afinidade com afinidade por fibrina

região de afinidade com afinidade por HbAGE	fibrilares	região de afinidade com afinidade por BSAAGE	região de afinidade com afinidade por proteína glicada
região de afinidade com afinidade por proteína citrulinada		região de afinidade com afinidade por dOVA	região de afinidade com afinidade por dHSA
região de afinidade com afinidade por dIgIV humana	receptor de aglutinador de macrófagos-1 (MSR-1)		anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico
‡ Anticorpos monoclonais desenvolvidos em colaboração com a instalação de hibridoma do ABC, Utrecht University, Utrecht, Países Baixos.			
a) antígeno albumina-AGE e ligante A β foram enviados à Davids Biotechnologie (Regensburg, Alemanha); um coelho foi imunizado com albumina-AGE, antiboc contra um epitopo estrutural foram purificados por afinidade usando-se uma coluna com A β imobilizado.			
2) PPACK é Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (SEQ-ID 8) ϵ ACA é ácido ϵ -amino capróico, tPA é ativador de plasminogênio de tipo tissular			

Tabela 5: Proteínas que são parte da Via β cruzada

anticorpo monoclonal 4B5	proteína de choque com calor 27	proteína de choque com calor 40
anticorpo monoclonal 3H7‡	Nod2 (= CARD15)	proteína de choque com calor 70
FEEL-1	Pentraxina-3	HDT1
LOX-1	proteínas de amilóide A do soro	GroES
MD2	estabilina-1	proteína de choque com calor 90
FEEL-2	estabilina-2	CD36 e LIMPII análogo-I CLA-1
lipoproteína de baixa densidade	proteína de ligação de LPS	CD14
proteína C reativa	CD45	Orosomucóide
integrinas	alfa-1 antitripsina	complexo apo A-IV- transtiretina
albumina	glicoproteína de ácido alfa-1	β 2-glicoproteína I
lisozima	lactoferrina	megalina
proteína de Tamm-Horsfall	apoliproteína E3	apoliproteína E4
receptores similares a <i>toll</i>	(pré) calcreína	CD11d/CD18 (subunidade aD)
CD11b2	CD11a/CD18(LFA-1, subunidade aL)	CD11c/CD18 (CR4, subunidade ax)
fator de Von Willebrand	miosina	agrína
Perlecan	Chaperone60	subunidade de integrina b2
proteínas que atuam na proteína que atuam na via de receptor de macrófagos com resposta de proteína não-resposta de estresse do retículoestruktura de colágeno dobrada (UPR, <i>unfolded endoplasmatic (ESR)</i> de (MARCO, <i>macrophage protein response</i>) do retículocélulas procarióticas endoplasmático (ER) de eucarióticas células procarióticas e eucarióticas		<i>receptor with collagenous structure)</i>
20S	membros da família de HSC73 CHAPERONE16	
HSC70	Plasmina(ogênio)	26S proteasoma

terminal 19S do proteasoma (PA700)	fator de crescimento hepáticos/fator espalhamento	de ponta carbóxi da proteína que deinterage com CHAPERONE70 (CHIP)
receptores de reconhecimento de padrão	Derlina-1	Calnexina
Trombospondina	GRP94	Retículo endoplasmático p72
anticorpos de imunoglobulina M (IgM) (humana) (amplo espectro)	proteínas que atuam no sistema de receptor de M (IgM) (humana) (amplo degradação associado com olipoproteína de baixa densidade)	família de receptor de M (IgM) (humana) (amplo degradação associado com olipoproteína de baixa densidade)
receptores de Fc (p. ex. CD16 humana, CD32A, CD32B, CD64)	atanogênio associado com Bcl-2 (Bag-1)	UDP-glucose: glicoproteína glucosil transferase (UGGT)
transportador de múltiplas drogas, variadamente resistência a múltiplas drogas 1 (MDR1), P-glicoproteína (glicoproteína pleiotrópica), Pgp, ou P-170	proteína de canal de translocação Sec61p	de receptor de complemento CD11b/CD18 (Mac-1, CR3)
caseína, α -caseína, β -caseína	NFKB	Vitronectina
cromozima p450	c3	CD79
GrpE	TLR2	TLR4
TLR9	(pro)trombina	receptores de Fc ϵ
MAC-2		

‡ Anticorpos monoclonais desenvolvidos em colaboração com a instalação de hibridoma do ABC, Utrecht University, Utrecht, Países Baixos.

Tabelas de 6 a 11 (Exemplos de 6 a 20)

Tabela 6 Determinação dos níveis de endotoxina em diversas soluções de proteína, usando um ensaio de LAL		
Amostra ‡	Nível de endotoxina (EU)	Teor estimado de LPS (/ml)
padrão dOVA (1 mg/ml)	115,6	250
Octagam (lote 5024018434, 50 mg/ml)	0,033, 0,147	<0,25
IgIV enriquecida (HbAGE-Sepharose) (52 μ g/ml em PBS) Lote 1	19,2	25
IgIV enriquecida (HbAGE-Sepharose) (103 μ g/ml em PBS) Lote 2, concentrado	35	
IgIV esgotada após contato com HbAGE-Sepharose (27,35 mg/ml)	0,772, 1,112	1
HbAGE (1,6 mg/ml)	0,122	<0,25
CEALB (Sanquin, lote 05C29H120A, 200 mg/ml)	0	0
Camundongo 7H2 IgM (em meio de cultura de hibridoma)	0	0
IgM de 7H2H2 camundongo (purificada, em PBS)	>3	
Fibronectina dedo4-5-FLAG-His (290 μ g/ml em PBS com 10% de glicerol)	1,7	
tPA (Actilise, 50 μ M 3,65 mg/ml)	2,7	
dHSA, (20 mg/ml) obtida de CEALB	0,043	

‡ dOVA foi obtida dissolvendo-se ovalbumina a 1 mg/ml em PBS e aquecimento em um termociclizador de PCR durante cinco ciclos de 30°C a 85°C a 5°C/minuto e rapidamente de volta a 30°C, como descrito acima. HbAGE foi glicado durante 38 semanas e subsequentemente dialisado contra água. dHSA foi obtido desnaturando-se CEALB a 20 mg/ml, a pH 2, a 65°C durante 6 horas, seguido de neutralização com solução de NaOH até pH fisiológico.

Tabela 7

Fatores de enriquecimento para ligação de IgIV após enriquecimento em diversas matrizes de afinidade de proteína β cruzada dobrada incorretamente s, a várias proteínas β cruzada dobradas incorretamente ‡

→ matriz de afinidade	Fatores de enriquecimento obtidos com IgIV eluída de matrizes com proteína β cruzada dobrada incorretamente			
	BSA-AGE	A β 42/A β 40 fibrilos	dHSA	dIgIV
ligante imobilizado em estudo de ligação				
BSA-AGE	30,15,44	5,5,5	1,9,0,7,5	2,1,8,2
fibrilos de A β 42/A β 40	53,25,6	35,23,3	18,11,3	34,21,2
agregados não-fibrilares de A β 42/A β 40	25,13	6,12	7,0,6	5,9
nOVA	1	0,6	0,8	0,5
dOVA	1,9,1,3,2,9	0,5,6,1,7	0,5,0,25,1,3	1,6,4,1,4
DHSA*	116	145	186	1170
HSA	0	0	0	0
dmy-globulinas	>1**	0	0	0
γ -globulinas de camundongo	0	0	0	0

‡ fatores de enriquecimento são dados para cada experimento individual. N.d., não determinado; 0, nenhuma ligação; 1, nenhum enriquecimento

* ligação da IgIV Octagam a HSA e dHSA resulta em sinais muito baixos. Enriquecimento em uma matriz de proteína dobrada incorretamente aumenta claramente a ligação a dHSA, porém prejudica-se a determinação de fatores de enriquecimento precisos.

** observa-se o mesmo para ligação de IgIV Octagam a γ globulinas de camundongo. A ligação de BSA-AGE IgIV enriquecida a my globulinas é aumentada em comparação com o material de partida. Este efeito é mais forte para γ globulinas desnaturadas (Mdy-globulinas)

Tabela 8

Determinação de subclasses e isotipificação de IgG de prps de regiões de afinidade (enriquecidas)

Octagam IgIV				IgIV enriquecida		IgIV enriquecida concentrada	
Ig	mg/ml	%	% (folha de dados)	mg/ml	%	mg/ml	%
IgG	47,2	99,45	\geq 9,5	n.d.	-	0,434	-
IgA	0,185	0,39	\leq 0,4	n.d.	-	n.d.	-
IgM	0,0756	0,16	\leq 0,2	n.d.	-	n.d.	-
IgG1	28,6	56,1	62,6	0,0823	76,3	0,242	51,3
IgG2	18,6	36,5	30,1	n.d.	-	0,169	35,8
IgG3	3,20	6,3	6,1	0,0236	21,9	0,0538	11,4
IgG4	0,548	1,1	1,2	0,00191	1,8	0,0067,5	1,4

n.d., não detectado. Para IgG2 o limite de detecção é <0,093 mg/ml. Para IgA o limite de detecção é de 0,0667 mg/ml, para IgM 0,0417 mg/ml, enquanto que os valores aproximados esperados são menores em uma ordem de magnitude.

Tabela 9: Proteínas identificadas unicamente em eluados de matriz com regiões de afinidade com especificidade por proteínas dobrada incorretamente s, que foram contactados com amostras de pacientes com amiloidose RA ou AL

nome da proteína‡	números de acesso IPI‡	nº de peptídeos na amostra A ¹	nº de peptídeos na amostra C [#]
Amostra A2 e A3 [plasma de paciente de amiloidose AL]			
domínio de cadeia pesada de dineína 3 (nome do gene: KIAA1503)	IPI00783464	1	0
proteína IGLC1/cadeia lambda de imunoglobulina	IPI00658130 (também em A4 e A6)	1	0
proteína de 25 kDa/lócus lambda de imunoglobulina (gene)	IPI00747752 (also in A4 e A6)	1	0
proteína hipotética/imunoglobulina lambda variável 4-3	IPI00382938	1	0
25 kDa protein/imunoglobulina lambda chain/fator reumatóide G9(also in A4 cadeia leve (lambda V3)/IGLC1and A6) protein	IPI00154742	1	0
amostra A4 [soro de paciente com RA]			
proteína IGLV3-25 (imunoglobulina lambda variável 3-25: sinônimo: V2-17)	IPI00550162	1	0
proteína hipotética /lócus lambda de imunoglobulina/regiões C da cadeia lambda de imunoglobulina (1/2/3)/imunoglobulina lambda variável V2-14/proteína Ig lambda C3 (proteína de segmento C2/proteína de segmento C3)/proteína hipotética DKFZp667J0810 (fragmento)	IPI00760678	1	0
Proteína hipotética	IPI00784519	1	0
Proteína hipotética	IPI00784711	1	0
Proteína hipotética	IPI00784983	1	0
proteína IGLC2 (imunoglobulina lambda C2)	IPI00555945	1	0
proteína IGLC2 (imunoglobulina lambda C2)	IPI00450309	1	0
isoforma 1 da proteína centrossómica Cep290/proteína centrossómica Cep290: sinônimos (Nefrocistina-6) (antígeno de tumor se2-2)	IPI00784201	1	0
isoforma Gama-B de precursor de cadeia gama de fibrinogênio	IPI00021891	1	0
proteína IGLC1 (imunoglobulina lambda C1)/cadeia de imunoglobulina lambda	IPI00658130 (também em A2, A3 e A6)	1	0
proteína de 25 kDa/cadeia de	IPI00747752	1	0

imunoglobulina lambda	(também em A2, A3 e A6)		
proteína de 25 kDa/cadeia de	IPI00154742	1	0
imunoglobulina lambda/fator	(também em A2, A3 e A6)		
reumatóide G9 cadeia leve (lambda			
V3)/proteína IGLC1			
proteína IGLC1 (imunoglobulina	IPI00719373	1	0
lambda C1)/cadeia de			
imunoglobulina lambda/proteína de			
segmento de imunoglobulina C1			
(fragmento)			
isoforma longa do antígeno KI-67/antígeno KI-67	IPI00004233	1	0

Tabela 9 (continuação)

amostra A6 [fluido sinovial de paciente com RA]			
proteína IGKC (constante de imunoglobulina κ)	IPI00807413	10	0
proteína hipotética/constante de imunoglobulina lambda 2 /IGLV2-A4)	IPI00760678 (também em	1	0
14 (imunoglobulina variável 2-14/proteína de Ig lambda C3 (proteína de segmento C2/proteína de segmento C3)/IGLC1 (constante de imunoglobulina lambda 1)/proteína hipotética			
DKFZp667J0810			
Proteína hipotética	IPI00807428	7	1
proteína IGHA1 (constante pesada de imunoglobulina alfa 1)	IPI00166866	10	0
cadeia simples Fv (fragmento)/região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (fragmento) /	IPI00748998	2	0
precursor de beta-2-glicoproteína 1/Beta-2-glicoproteína (apoliproteína H)	IPI00298828	7	0
precursor de subunidade de subcomplemento de complemento C1q/componente de complemento 1, subcomponente q, cadeia C	IPI00022394	1	0
precursor de subcomponente de complemento C1r/componente de complemento 1, subcomponente r/proteína hipotética	IPI00296165	1	0
DKFZp686002154			
proteína 5 similar a calmodulina (proteína de pele similar a calmodulina)	IPI00021536	2	0
precursor de proteína 1 relacionado com fator de complemento/relacionado 1 com fator de complemento H	IPI00011264	2	0
isoforma DPI de Desmoplaquina (antígeno de pênfigo paraneoplástico de 250/210 kDa)/desmoplaquina	IPI00013933	1	0
isoforma 1 de precursor de	IPI60026314	3	0

gelsolina/gelsolina			
proteína hipotética/proteína 5 de choque com calor de 70kDa (proteína regulada com glucose = 78kDa = GRP78 = BiP = HSPA5)	IPI00003362	2	0
proteína IGLC1 (imunoglobulina lambda C1)/cadeia imunoglobulina lambda	IPI00658130 (também em A2, A3 e A4)	1	0
proteína de 25 kDa/lócus imunoglobulina lambda (gene)	IPI00747752 (também em A2, A3 e A4)	1	0
proteína de 25 kDa/cadeia imunoglobulina lambda/fator reumatóide G9 cadeia leve (lambda V3)/imunoglobulina lambda C1	IPI00154742 (também em A2, A3 e A4)	1	0
proteína de 26 kDa/imunoglobulina κ variável 1-5	IPI00738024	1	0
‡ Lista-se proteínas que são identificadas com base em massas peptídicas identificadas. Para massas de peptídeos que não são unicas para uma única proteína, todas as proteínas com a seqüência identificada são listadas.			
† séries A eluado analisado de matriz de IgIV enriquecida após contato com amostras de pacientes indicados; a série de controle Capresentada são as análises de eluados de matriz de controle com regiões de afinidade contactadas com as mesmas amostras de paciente; medição de fundo.			
1) Os códigos de acesso IPI referem-se a códigos de entrada de proteínas para vários bancos de dados de proteínas/peptídeos. Quando a(s) mesma(s) proteína(s) também foi/foram identificada(s) em um ou mais dos outros eluados analisados após contato da matriz de região de afinidade com amostras de pacientes, indica-se estes códigos de amostras de pacientes.			

Tabela 10 Efeito de regiões de afinidade enriquecidas sobre células imunes capazes de opsonizar proteínas.							
estimulador de DC →	controle de PBS	BSA-AGE	BSA-AGE + enr. IgIV	BSA-AGE + enr. IgIV + anti-CD32a	BSA-AGE + IgIV	BSA-AGE + IVIg + anti-CD32a	Poly I-C + TNFalfa
↓ marcador							
IL-6 (pg/ml)	104	118	4433	1417	191	25	15119
IL-8 (pg/ml)	2452	1842	19316	20260	4682	638	26225
morte celular (%)	17	11	8	6	14	16	15
CD80 (relação MFI)	8,9	4,2	11,9	11,7	5,2	3,5	25,7
CD83 (% de células pos.)	5	5	25	23	8	3	66
CD86 (relação de MFI)	7,3	3,8	9,5	8,6	4,3	2,9	14,4
CD40 (relação de MFI)	16,1	9,5	13,4	10,6	9,6	5,8	20,7

Tabela 11 Titulações anti-CCP em várias preparações de regiões de afinidade humanas		
preparação de Ig	[titulação anti-CCP] (U/ml)	Fator de enriquecimento
1. Octagam IgIV, 50 mg/ml	3	1
2. y-globulinas, 10 mg/ml	2,6	-
3. IgIV Gammagard, 52 mg/ml	3,1	-
4. IgIV enriquecida, 0,1 mg/ml	2,7	437

Quando a titulação anti-CCP no soro de um indivíduo é >10 U/ml, o soro é designado como positivo para anticorpo anti-CCP. As titulações medidas de 2,63,1 U/ml encontram-se bem dentro dos limites de detecção do sistema EliA, e esta faixa de titulações é regular; medido para soros de indivíduos saudáveis. ‡ O enriquecimento para a concentração de anticorpos anti-CCP é determinada com IgIV enriquecida, em comparação com Octr IgIV de que a IgIV enriquecida foi selecionada usando-se matriz de afinidade de HbAGE-Sepharose.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. IgIV humana liga-se especificamente a proteínas glicadas dobrada incorretamente s

Em montagens ELISA a ligação de IgIV humana para uso terapêutico, obtida de dois fabricantes, I e II, foi avaliada com proteínas glicadas imobilizadas. A. Testou-se a ligação de IgIV do fabricante I (IgIV (I)) a hemoglobina humana glicada revestida (Hb-AGE), Hb recentemente dissolvido e peptídeo β -amilóide agregado ($A\beta$). B. Testou-se a ligação de IgIV do fabricante II (IgIV (II)) a Hb-AGE revestida, Hb recentemente dissolvido e $A\beta$ agregado. C. Analisou-se a ligação de IgIV (I) a albumina glicada revestida (BSA-AGE), albumina de controle recentemente dissolvida e FP13 K157G amilóide. D. A influencia de tPA e K2P tPA sobre a ligação de 15 μ g/ml IgIV (I) a Hb-AGE revestida foi avaliada mediante adição de séries de concentrações de tPA ou K2P tPA à mistura de incubação de IgIV (I). Adiciona-se 10 mM de ϵ ACA à mistura para evitar liqüefação de tPA a cadeias laterais lisina ou arginina expostas.

Figura 2: Agregação de plaquetas induzida com proteínas glicadas dobradas incorretamente com conformação similar a amilóide é inibida com IgIV e uma mistura de anticorpos monoclonais.

20 Agregação de plaquetas após introdução de colágeno ou TRAP (controles positivos), tamponador (controle negativo) ou hemoglobina ou albumina glicada similar a amilóide dobrada incorretamente foi acompanhada em um agregômetro usando-se plaquetas isoladas de plasma citrado recentemente coletado em tamponador HEPES-Tyrode. Avaliou-se as 25 propriedades inibidoras propostas de IgIV humana e anticorpos monoclonais murinos desenvolvidos contra quatro diferentes estruturas amilóides, sobre a

agregação de plaquetas. A. IgIV adquirida do fabricante I inibe efetivamente a agregação de plaquetas induzida com hemoglobina glicada de doador humano 'A'. IgIV (I) por si só não têm efeito sobre plaquetas, o que quer dizer, nenhuma agregação é induzida pela adição de IgIV (I) às plaquetas. A 5 concentração de IgIV (I) usada foi de 4,7 mg/ml, a concentração de Hb-AGE foi de 18 µg/ml, colágeno foi usado a uma concentração de 10 µg/ml. B. Determinou-se a influência de 10 µg/ml de colágeno, 18 µg/ml de Hb-AGE, 10 4,7 mg/ml de IgIV (I) e 18 µg/ml de Hb-AGE que foi pré-incubado com 4,7 mg/ml de IgIV (I) sobre a agregação de plaquetas do doador. C. Similar ao experimento realizado com plaquetas de doadora A (A.), agregação de 15 plaquetas com plaquetas de doadora 'B' foi acompanhada ao longo do tempo. Agora usou-se 10 µg/ml de colágeno, 90 µg/ml de Hb-AGE, 4,7 mg/ml de IgIV (I) e 90 µg/ml de Hb-AGE pré-incubado com 4,7 mg/ml de IgIV (I). D. Em um experimento de controle com plaquetas de doador 'C' usou-se 5 µM de 20 TRAP como um controle positivo. A influência de 100 µg/ml de uma mistura de cinco anticorpos monoclonais com afinidade por proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada foi determinada com TRAP como ativador de agregação, ou com controle de tamponador de HEPES-Tyrode. E., F. Agregação de plaquetas (doador C) foi induzida com 25 25 µg/ml de albumina de soro bovina glicada (BSA-AGE, E.) ou hemoglobina humana glicada (Hb-AGE, F.). Determinou-se a inibição desta agregação com 25 ou 100 µg/ml de mistura de cinco anticorpos monoclonais com afinidade por proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada.

25 **Figura 3: Agregação de plaquetas do sangue é induzida por amilóide- β , e inibida por IgIV ou anticorpos monoclonais**

A., B. Indução de agregação de plaquetas com 50 µg/ml de amilóide- β é inibida quando 2,5 mg/ml de IgIV (I) são pré-incubados com amilóide- β (A.), ou quando 160 µg/ml da mistura de cinco anticorpos

monoclonais que se ligam a proteínas dobradas incorretamente (B.) são pré-incubados com amilóide- β . Plaquetas de dois doadores D e E são analisadas separadamente.

5 **Figura 4. Compostos pequenos específicos para amilóide influenciam de maneira diferente a ligação de IgIV ou tPA a proteínas dobradas incorretamente imobilizadas.**

Em montagens ELISA de ligação de IgIV ou tPA, uma proteína de ligação de multi-ligantes com afinidade por proteínas dobradas incorretamente que compreendem a dobra terciária/quaternária de estrutura β cruzada, foi analisada sob a influencia de séries de concentrações de corantes vermelho Congo e Tioflavina T específicos para amilóide. A-C. A influência de corantes específicos para amilóide, vermelho Congo (A.), Tioflavina T (B.) e Tioflavina S (C.) sobre a ligação de 15 μ g/ml de IgIV (I) a Hb-AGE imobilizada foi avaliada por meio de pré-incubação da IgIV (I) com séries de concentrações dos três corantes antes de se adicionar as soluções em placas ELISA. D., F. A influência do vermelho Congo sobre a ligação de uma concentração sub-ótima of tPA a BSA-AGE revestida (D.) ou A β (F.). E., G. Influência da Tioflavina T sobre a ligação de uma concentração sub-ótima of tPA a BSA-AGE revestida (E.) ou A β (G.).

20 **Figura 5. Uma matriz de afinidade com a capacidade de ligar-se a proteínas que se ligam a proteínas dobradas incorretamente com uma conformação de estrutura β cruzada.**

Hemoglobina humana glicada e dobrada incorretamente foi ligada a CNBr-Sepharose e determinou-se, por meio de análise da ligação de tPA, a capacidade de ligar proteínas com afinidade por proteínas dobradas incorretamente que compreendem a dobra de estrutura β cruzada. Em seguida, a matriz de afinidade foi aplicada para isolar um subconjunto de imunoglobulina moléculas de IgIV-I compreendendo regiões de afinidade para estrutura β cruzada e/ou proteínas compreendendo estrutura β cruzada.

A. Hb-AGE Sepharose e pérolas de controle vazias foram incubadas com 6 μ M de solução de tPA e o sobrenadante foi analisado subsequentemente quanto à presença de atividade de tPA por meio de adição de substrato cromogênico de tPA S2765. B. Após incubação com tPA a Hb-AGE 5 Sepharose e as pérolas de controle foram lavadas várias vezes com tamponador de lavagem. A presença de tPA no eluado de primeira lavagem foi analisada novamente acompanhando-se ao longo do tempo a conversão de substrato de tPA S2765 a 37°C. C. Após lavagem extensiva, o tPA ligado foi eluído de pérolas de controle de Sepharose vazias e Hb-AGE Sepharose com 10 alto teor de sal. Eluado diluído dez vezes foi analisado quanto à presença de tPA por meio de adição de S2765. D. Curva padrão da absorbância a 590 nm de estoque de IgIV diluído (Octagam), manchado com ADV01. E. Curva padrão da ligação de uma série de diluições de estoque de IgIV (Octagam) a 15 Hb-AGE, como determinado com ELISA. F. Ligação a Hb-AGE imobilizada de estoque de IgIV diluído 1000 vezes, IgIV após contato com Hb-AGE — Sepharose e IgIV após contato com matriz de controle, conforme avaliado com um ELISA. G. Ligação a Hb-AGE imobilizada de IgIV eluída de Hb-AGE - Sepharose e IgIV eluiu de matriz de controle, como analisado com um 20 ELISA. Sinais são dados como números relativos, como calculado de uma curva de ligação de estoque de IgIV (ver Figura E). H. Curva padrão de ligação de uma série de diluições de estoque de IgIV (Octagam) a BSA desnaturada com calor, como determinado com ELISA. I. Ligação a BSA desnaturada com calor imobilizada de estoque de IgIV diluída 1000 vezes, 25 IgIV após contato com Hb-AGE — Sepharose e IgIV após contato com matriz de controle, como analisado com um ELISA. J. Ligação a BSA desnaturada com calor imobilizada de IgIV eluída de Hb-AGE - Sepharose e IgIV eluiu de matriz de controle, como analisado com um ELISA. Sinais são dados como números relativos, conforme calculado da curva de ligação de estoque de IgIV (ver Figura H).

Figura 6. Análise de TEM de hemoglobina (HbAGE) e albumina (BSA-AGE) dobrada incorretamente , por meio de glicação

As imagens mostram que BSA-AGE (A.) e HbAGE (B.) formam agregados amorfos não-fibrilares.

5 **Figura 7. Dobramento incorreto de IgIV Octagam induz estrutura β cruzada A-E.**

Análise de TEM de IgIV Octagam dobrada incorretamente a 1 mg/ml (A), 2,5 mg/ml (B), 5 mg/ml (C), 10 mg/ml (D) e 20 mg/ml (E) em 10 mM de tamponador de NaPi pH 8,1. F. Análise de Tioflavina T de IgIV Octagam dobrada incorretamente . Verificou-se que diferentes condições de desnaturação resultam em proteínas dobradas incorretamente com diferentes características de TEM e Tioflavina T.

10 **Figura 8. Dobramento incorreto de IgIV Gammagard induz estrutura β cruzada**

15 Fluorescência de tioflavina T (A), vermelho Congo (B), ANS (C), Bis-ANS (D) e Tioflavina S (E) de várias preparações de IgIV Gammagard dobrada incorretamente preparações. F. Fluorescência de triptofano das várias preparações de IgIV Gammagard dobrada incorretamente quando a intensidade de fluorescência a 375 nm é medida com 20 excitação a 283 nm.

Figura 9. Dobramento incorreto de IgIV Gammagard induz agregação, acompanhada da capacidade de ativar tPA/plasminogênio.

Análise de TEM de A. IgIV Gammagard nativa, e várias forma de IgIV Gammagard dobrada incorretamente , i.e. B. IgIV RF, C. IgIV 65, D. IgIV 69, E. IgIV 76, F. IgIV 80, G. IgIV 83 Gammagard, H. IgIV 86. I. IgIV Ácido e J. IgIV Base. K. IgIV HFIP/TFA, L. hIgG-BASE-37°C, M. Geração de plasmina mediada com tPA quando da exposição a várias preparações de IgIV Gammagard desnaturadas a uma concentração final de 100 μ g/ml. A estimulação de co-fator de dOVA a 40 μ g/ml foi ajustada arbitrariamente em

100%.

Figura 10. Análise de com ThT, vermelho Congo e ANS de preparações de A β .

Figura 11. Análise de A β com TEM.

5 A. A β 40t=0, B. A β 40HC1, C. fA β 40 (i.e. armazenado durante 168 h), D. A β 42t=0, E. A β 42HBS, e F. fA β 42 (i.e. HCl tratamento a 37°C durante 24 h).

Figura 12. Análise da estrutura de HSA.

Fluorescência de Tioflavina T de HSA nativa e desnaturada
10 (A) e análise de TEM de HSA nativa (B) e HSA desnaturada a 1 mg/ml (C),
2,5 mg/ml (D), 5 mg/ml (E) 10 mg/ml (F) ou 20 mg/ml (G).

Figura 13. Fluorescência incrementada de ThT e CR com IgG de camundongo dobrada incorretamente .

Tioflavina T (A) e vermelho Congo (B) fluorescência de IgG
15 desnaturada com calor de camundongo (dmIgG 85°C), IgG desnaturada com ácido de camundongo (dmIgG ÁCIDO), IgG desnaturada com base de camundongo (dmIgG BASE) e IgG nativa de camundongo (nmIgG). A preparação de IgG de camundongo usada é uma composição de γ -globulinas de camundongo.

20 **Figura 14. Análise de estrutura de ApoA-I humana.**

(A) Fluorescência de ThT, (B) fluorescência de vermelho Congo, (C) determinação de fluorescência a A280 nm, (D) ensaio de ativação de tPA/plasminogênio (PIg) e (E) ligação de fibronectina F4-5-FLAG-His a ApoA-I imobilizada e HbAGE (controle positivo). Sinais de fundo obtidos com poços revestidos com tamponador de controle são subtraídos de sinais obtidos com séries de diluições Fn F4-5 em proteínas imobilizadas. ApoA-I dobrada incorretamente de a a c: a = incubada durante 30 minutos a 37°C após adição de NaOH a uma concentração final de 100 mM a estoque de ApoA-I nativa; adição de HCl a uma concentração final de 100 mM após

aquecimento; b = como em a, agora aquecido a 75°C; c = como em a, b, aquecida agora a 100°C. (F). Ligação de tPA às preparações de ApoA-I e HbAGE, similar como em A. Para maior clareza, apresenta-se um eixo y de dois segmentos, porque sinais absolutos obtidos com preparações de tPA e 5 ApoA-I são substancialmente menores do que o sinal obtido com HbAGE.

Figura 15. Ligação incrementada a BSA-AGE dobrada incorretamente de regiões de afinidade que são enriquecidas usando proteínas β cruzada dobradas incorretamente indicadas acopladas a matrizes.

Na figura indica-se as proteínas dobradas incorretamente indicadas que foram imobilizadas sobre uma matriz. 'FT', matriz de afinidade de perfluxo; 'EL', eluado de matriz de afinidade, ou fração recuperada após eluição de regiões de afinidade ligadas às proteínas dobradas incorretamente indicadas. A linha sólida em um fator de enriquecimento 1 indica o limite entre esgotamento ou enriquecimento com relação à ligação de regiões de 10 afinidade a, como neste exemplo ilustrativo, BSA-AGE.

Figura 16. Ligação de IgIV enriquecida ou esgotada com proteínas β cruzada dobradas incorretamente após contato de IgIV com matriz de afinidade BSA-aGE β cruzada dobrada incorretamente .

IgIV Octagam foi incubada com BSA-AGE Sepharose. Uma 20 parte das frações de perfluox (FT, *flow trough*) foi testada em um ELISA para ligação a BSA-AGE, o FT restante foi novamente aplicado a uma quantidade recente de matriz de BSA-AGE (A). As frações de eluado E foram coletadas e testadas em um ELISA quanto à ligação a BSA-AGE e também (B). O fator de enriquecimento é dado como a ligação a proteína dobrada incorretamente 25 por unidade de massa, em comparação com o material de partida Octagam IgIV. Durante as sucessivas etapas de ligação isola-se mais moléculas de Ig de ligação a BSA-AGE do combinado de Octagam, resultando em um fator de enriquecimento decrescente para as sucessivas frações de FT. Moléculas de Ig ligadas especificamente à matriz de BSA-AGE são eluídas da matriz de

afinidade (eluados, E). Fatores de enriquecimento de FTs e frações de eluado também foram determinados com A β (C e D), dOVA (E e F) e HbAGE (G e H).

5 **Figura 17. Ligação de IgIV Octagam a várias proteínas com uma conformação β cruzada, incluindo fibrina, analisada com ELISAs.**

A-D. ELISAs apresentando ligação de IgIV Octagam a HbAGE imobilizada (A., controle positivo), dOVA (B.), fibrina (C), e A β 1-40 e A β 1-42 (D.). E. Ligação de tPA a fibrina (controle positivo para C).

10 **Figura 18. Ligação de várias preparações de IgIV a várias preparações de apoliproteína A-I dobrada incorretamente de plasma humano**

A. Em um ELISA avaliou-se a ligação de IgIV Octagam a ApoA-I nativa imobilizada e ApoA-I dobrada incorretamente por meio de adição de NaOH a uma concentração final de 100 mM, seguido de incubação durante 30 minutos a 37°C, ou 75°C, ou 100°C. Não se observou ligação com a ApoA-I que foi aquecida a 100°C B. ELISA como em A., com perfluxo de IgIV esgotada que foi recuperada de uma matriz de afinidade de HbAGE após contato da matriz com Octagam IgIV. Novamente, não se observou ligação com ApoA-I aquecida a 100°C. C. ELISA como em A. e B., com o eluado de IgIV enriquecida após contato da matriz de afinidade de HbAGE com Octagam IgIV.

20 **Figura 19. Aumento da fluorescência de vermelho Congo e Tioflavina T, ligação de tPA e ativação de tPA/plasminogênio por IgIV dobrada incorretamente.**

IgIV foi desnaturada com calor em concentrações crescentes, seja a 65°C em tamponador de NaPi, pH 8,1, ou em HCl, pH 2, durante 6 horas a 25 65°C. Mediú-se o aumento de fluorescência de vermelho Congo (A) e Tioflavina T (B). A fluorescência de vermelho Congo não foi testada com IgIV desnaturada a 1 mg/ml. Ativação de tPA/plasminogênio por IgIV nativa e IgIV misfolded desnaturada com calor, aquecida a 1 mg/ml ou 5 mg/ml é determinada usando-se um substrato cromogênico para plasmina. C. A atividade máxima de plasmina foi

determinada com IgIV aquecida que foi dobrada incorretamente nas concentrações indicadas. D. Gráfico representativo mostrando atividade de plasmina induzida por IgIV dobrada incorretamente em tamponador de NaPi a 1 mg/ml e 5 mg/ml. E. Ligação de tPA a A β 40 $t=0$ e IgIV dobrada incorretamente .

5 **Figura 20. Agregação de plaquetas de sangue humano por meio de oxLDL é inibida por IgIV; afinidade de IgIV enriquecida por oxLDL, em comparação com material de partida de IgIV não-enriquecida e esgotada, coletada como perfluxo, após exposição de IgIV à matriz de afinidade de HbAGE dobrada incorretamente .**

10 A. Influência de IgIV sobre agregação de plaquetas induzida com oxLDL. Agregação induzida com TRAP é máxima e é ajustada arbitrariamente em 100%. A influência de uma série de concentrações de IgIV é avaliado por meio de pré-incubação do controle de LDL nativo ou oxLDL com IgIV, antes da adição à suspensão de plaquetas e início do 15 experimento de agregação. B.-D. ELISA: Ligação de IgIV Octagam a BSA-AGE imobilizada (B.), IgIV esgotado de regiões de afinidade que foram imobilizadas em uma matriz de HbAGE (C), e IgIV que foi enriquecida por meio de aplicação de uma matriz de afinidade de HbAGE (D.). E.-G. apresentam ligação a oxLDL dos mesmos três estoques indicados de região de 20 afinidade. E. material de partida, Octagam IgIV, F. IgIV esgotado de regiões de afinidade com afinidade por β cruzada proteínas e/ou conformação induzida com β cruzada em proteínas, e G. ligação de IgIV enriquecida a oxLDL. Se possível, calcula-se valores de kD para se obter uma medida de 25 qualidade comparável para os experimentos. A relação entre as kDs obtidas para a ligação de IgIV a oxLDL e para ligação de IgIV enriquecida, usando uma matriz de HbAGE dobrada incorretamente , a oxLDL é de 27, mostrando que o fator de enriquecimento obtido com o procedimento acompanhado é de 27 para a ligação de regiões de afinidade a ApoB100 dobrada incorretamente .

Figura 21. Influência de ligação de compostos de IgIV de estrutura β

cruzada e F de HGFA sobre o tempo de sangramento em um ensaio de tempo de sangramento em camundongo *in vivo*.

A. Em um ensaio de corte de cauda em camundongo, tanto F de HGFA (aproximadamente 234 µg/ml de concentração final) como 5 IgIV (aproximadamente 2,5 mg/ml de concentração final) prolongam显著mente o tempo de sangramento. Usou-se o tamponador (PBS) como uma referência para o tempo de sangramento. Usou-se dez IE de heparina por camundongo em um grupo de controle positivo de tempo de sangramento prolongado. Indica-se tempos de sangramento médio 10 calculados e barras de erro. B. Os dados cujas médias foram calculadas são mostrados em A. são apresentados agora em um gráfico de espalhamento de forma a proporcionar compreensão sobre a distribuição de tempos de sangramento medidos. Nota: tempos de sangramento acima de 20 minutos foram ajustados em 20 minutos e o sangramento foi interrompido 15ativamente, e, adicionalmente, sangramento excedente que resulta em perda de sangue acima de 200 µl também foi ajustado em um tempo de sangramento de 20 minutos e o sangramento foi interrompido ativamente (ambos os procedimentos estão de acordo com o protocolo que foi aprovado pelo comitê ético local).

20 Figura 22. Adesão de células a proteínas dobradas incorretamente e modulação com regiões de afinidade enriquecidas.

A. ECs ligam-se a poços de um placa de cultura que são pré-revestidos com gelatina (ajustado arbitrariamente em 100%) ou BSA-AGE. Quando IgIV Octagam é titulado na suspensão de células, inibe de 25 forma dependente-da-dose a aderência a albumina glicada. Observa-se inibição similar de aderência com fragmento solúvel recombinante de RAGE humana. B. ECs ligam-se, de preferência, a IgIV enriquecida sobre IgIV nativa revestida à mesma concentração. Controles positivos para adesão são gelatina (ligação ajustada em 100%) e BSA-AGE. Controle

negativo compreende a aderência de células a poços de placas de cultura de células que não foram de modo algum revestidas com proteína (0% de aderência).

5 **Figura 23. Esgotamento de soluções de proteínas dobradas incorretamente usando IgIV enriquecida**

10 A-B. Extração de dOVA dobrada incorretamente (A.) ou HbAGE (B.) de uma solução de proteína por meio do uso de regiões de afinidade de IgIV enriquecida que são imobilizadas sobre um suporte sólido, i.e. os poços de uma placa ELISA. Controle negativo: HSA imobilizada sobre o suporte sólido.

15 **Figura 24. Ligação de IgIV humana enriquecida e IgIV Octagam a várias formas de IgG de camundongo dobrada incorretamente .**

20 A. A ligação de IgIV humana enriquecida a IgG de camundongo dobrada incorretamente foi avaliada em um ELISA direto com preparações de IgG imobilizada de camundongo. B. Em uma segunda abordagem, primeiramente anticorpo anti-IgG de camundongo foi aplicado revestindo os poços de uma placa de 96 poços, seguido de ligação de várias preparações de IgG de camundongo, e se sobrepõe a uma série de concentrações de IgIV humana Octagam.

25 **Figura 25. Ligação de IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 a várias formas de γ -imunoglobulinas humanas dobradas incorretamente e auto- γ -globulinas de camundongo.**

20 A ligação de IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 a várias formas de preparações de IgG humana dobradas incorretamente foi analisada com ELISAs. A. IgM 7H2H2 a 12,5 μ g/ml em PBS/0,1% de Tween 20 foi testados quanto à ligação a 15 diferentes preparações de IgG humana, como indicado na seção de 'Materiais e Métodos Gerais, por exemplo, de 6 a 20'. B. Em um segundo experimento, IgM 7H2H2 de clone de hibridoma purificada, nas concentrações indicadas, foi novamente analisada quanto à

ligação a cinco preparações de IgG humana. IgGs nativas de controle são IgIV Gammagard e IgIV Octagam. Números para as preparações de IgIV referem-se a preparações de IgIV usadas em A. (ver também o texto). C. Ligação de IgM de hibridoma de camundongo 7H2H2 a hIgG-BASE-37°C e 5 IgIV Gammagard nativa. D. Ligação de 7H2H2 a várias preparações de IgG de camundongo dobrada incorretamente e γ -globulinas nativas de camundongo.

10 **Figura 26. Sumário de procedimento preferido para selecionar regiões de afinidade para diagnósticos e terapêuticas específicos para doenças por mal dobramento de proteínas.**

Regiões de afinidade dirigidas contra qualquer conjunto de proteínas dobradas incorretamente podem ser selecionadas aplicando-se uma composição compreendendo regiões de afinidade sobre uma matriz de afinidade de proteínas dobrada incorretamente s. Quando referida matriz 15 contém uma ou um conjunto de proteínas dobradas incorretamente (*mistura X*, coluna I) obtém-se regiões de afinidade (preparação 1) que são dirigidas contra proteínas dobradas incorretamente em geral. Referidas regiões de afinidade podem ser aplicadas para todas as doenças de dobramento incorreto, mas podem causar efeitos colaterais, porque não são todas específicas para 20 doença. É possível isolar regiões de afinidade específicas para doença aplicando uma uma composição de regiões de afinidade em uma coluna com uma ou com um conjunto de proteínas dobradas incorretamente específicas para doença (*mistura A*, coluna II). Regiões de afinidade (preparação 2) obtidas desta maneira conter regiões de afinidade específicas para doença, 25 mas também regiões de afinidade que interagem com proteínas dobradas incorretamente em geral. Estas últimas, similares às regiões de afinidade obtidas da coluna I, ainda podem causar efeitos colaterais quando aplicadas para a doença específica, devido à presença de regiões de afinidade que podem ligar-se a qualquer proteína dobrada incorretamente que esteja

presente na ocasião. Assim, mais preferivelmente, prepara-se regiões de afinidade (preparação 3) aplicando-se uma composição compreendendo regiões de afinidade em uma coluna de proteínas dobradas incorretamente (coluna I) e subsequentemente em uma coluna com um ou um conjunto de 5 proteínas dobradas incorretamente específicas para doença (coluna III, similar ou idêntica à coluna II). De forma ainda mais preferível, regiões de afinidade altamente específicas para proteínas dobradas incorretamente que contribuem para a patologia de uma doença (preparação 4) são obtidas quando se aplica 10 uma composição compreendendo regiões de afinidade subsequentemente em uma coluna com uma ou um conjunto de proteínas dobradas incorretamente específicas para doença (coluna II) seguido de uma coluna (coluna IV) 15 compreendendo qualquer conjunto de proteínas dobrada incorretamente, porém excluindo aquelas proteínas dobradas incorretamente que contribuem para a patologia da doença-alvo e que estão imobilizadas na coluna II, usadas para esgotar a mistura de regiões de afinidade coletadas com coluna II daquelas que geralmente interagem com proteínas dobrada incorretamente.

Referências

- Bouma,B. *et al.* "Glicação induz a formação de estrutura β cruzada de amilóide na albumina". *J. Biol. Chem.* 278, 41810-41819 (2003)
- 20 - Citterio,S. *et al.* Células dendríticas como adjuvantes naturais. *Methods* 19, 142-147 (1999)
- Gebbink,M.F., Claessen,D., Bouma,B., Dijkhuizen,L. & Wosten,H.A. 2005, "Revestimento funcional de amilóide α para microorganismos". *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 333- 341
- 25 - Horbach,D.A., van Oort,E., Donders,R.C, Derkx,R.H. & de Groot,P.G. "Anticoagulante de lúpus é o maior fator de risco para trombose venosa e para trombose arterial em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Comparação entre diferentes esnaios para a detecção de anticorpos de anti-fosfolipídeos". *Thromb. Haemost.* 76, 916-924 (1996)

- Kayed,R., E.Head, J.L.Thompson, T.M.McIntire, S.C.Milton, C.W.Cotman, e C.G.Glabe. 2003, "Estrutura comum de oligômeros amilóides solúveis implica em mecanismo comum de patogênese". *Science* 300:486-489
- 5 "Estrutura comum de oligômeros amilóides solúveis implica em mecanismo comum de patogênese". *Science* 300: 486-489
- Kranenburg,O., B.Bouma, L.M.Kroon-Batenburg, A.Reijerkerk, Y.P.Wu, E.E.Voest, e M.F.Gebbink. 2002, "Ativador de plasminogênio de tipo tissular é um receptor de estrutura β cruzada de multi-ligantes". *Curr. Biol.* 12:1833-1839
- 10 - O'Nuallain,B. & Wetzel,R. "Reconhecimento de "Anticorpos conformacionais e epítopo de fibrilos de amilóide". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1485-1490 (2002)
- Hackeng, T. M., Rosing, J., Spronk, H. M., e Vermeer, C. (2001) *Protein Sci.* 10, 864-870
- 15 - Hackeng, T. M., Mounier, C. M., Bon, C, Dawson, P. E., Griffin, J. H., e Kent, S. B. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 7845-7850
- Rappaport, J., Ishihama, Y., e Mann, M. (2003) *Anal.Chem.* 75, 663-670
- Sallusto, F. e Lanzavecchia, A. (1994) *J.Exp.Med.* 179, 1109-1118
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., e Hoogenboom, H. R. (1994) 20 *Annu.Rev.Immunol.* 12:433-55, 433-455
- Hoogenboom, H. R. e Winter, G. (1992) *J.Mol.Biol.* %20;227, 381-388
- Hoogenboom, H. R. (2002) *Methods Mol.Biol.* 178:1-37, 1-37
- Hoogenboom, H. R. e Chames, P. (2000) *Immunol.Today.* 21, 371-378
- Hoogenboom, H. R. (1997) *Trends Biotechnol.* 15, 62-70
- 25 - Hoogenboom, H. R. (2005) *Nat.Biotechnol.* 23, 1105-1116
- de Kruif, J., Terstappen, L., Boel, E., e Logtenberg, T. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 3938-3942
- de Kruif, J., Boel, E., e Logtenberg, T. (1995) *J.Mol.Biol.* 248, 97-105
- Bloemendal, H. J., de Boer, H. C, Koop, E. A., van Dongen, A. J.,

- Goldschmeding, R., Landman, W. J., Logtenberg, T., Gebbink, M. F., e
Voest, E. E. (2004) *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 799-808
- Huls, G., Heijnen, I. A., Cuomo, E., van der, L. J., Boel, E., Van De Winkel,
J. G., e Logtenberg, T. (1999) *Cancer Res.* 59, 5778-5784
- 5 - Huls, G. A., Heijnen, I. A., Cuomo, M. E., Koningsberger, J. C, Wiegman,
L., Boel, E., van der Vuurst de Vries AR, Loysen, S. A., Helfrich, W., Berge
Henegouwen, G. P., van Meijer, M., de Kruif, J., e Logtenberg, T. (1999)
Nat.Biotechnol. 17, 276-281
- Boel, E., Verlaan, S., Poppelier, M. J., Westerdaal, N. A., van Strijp, J. A., e
10 Logtenberg, T. (2000) *J.Immunol.Methods.* 239, 153-166
- Morrison, S. L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A.,and Oi, V.T. (1984)*Proc.
Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 81, 6851-6855

REIVINDICAÇÕES

1. Método para selecionar pelo menos uma molécula de IgIV, de uma coleção de moléculas de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente e/ou com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 contactar uma coleção de moléculas de IgIV com uma proteína dobrada incorretamente , uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína 10 compreendendo uma estrutura β cruzada, e coletar pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade interagindo com referido epítopo.

15 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido epítopo é pelo menos parte de uma estrutura β cruzada de uma proteína.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que referido epítopo é exposto em referida proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

20 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que referida proteína dobrada incorretamente , estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada é ligada a um suporte sólido.

25 5. Coleção de moléculas de IgIV, enriquecidas com moléculas de IgIV, caracterizada pelo fato de que compreende uma região de afinidade que é capaz de interagir com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente , uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

6. Coleção de moléculas de IgIV de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é selecionada por meio de um

método como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4.

7. Composição, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos 5, de preferência, pelo menos 8, mais preferivelmente pelo menos 10 moléculas isoladas, sintéticas e/ou recombinantes, que compreende uma 5 região de afinidade que é capaz de interagir com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente, uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende uma parte funcional, derivado e/ou análogo de 10 pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade capaz de interagir com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente, uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7 ou 8, 15 caracterizada pelo fato de que pelo menos uma de referidas moléculas compreende adicionalmente uma molécula de ligação de estrutura β cruzada.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 9, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma de referidas moléculas compreende adicionalmente uma molécula efetora.

20 11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é uma protease ou uma parte de ligação de estrutura β cruzada da mesma.

25 12. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é um composto imunopotencializador, de preferência, uma citocina.

13. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é um fator de ativação de complemento.

14. Composição de acordo com a reivindicação 10,

caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é um sinal de eliminação, de preferência, pelo menos parte de um domínio Fc.

5 15. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é um composto supressor de inflamação, de preferência, um fator inibidor de complemento.

16. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é um fator potencializador de ligação de estrutura β cruzada.

10 17. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que referida molécula efetora é um composto opsonizador.

18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 17, caracterizada pelo fato de que referida molécula isolada, sintética e/ou recombinante é um composto opsonizador.

15 19. Método para produzir uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizado pelo fato de que compreende definir a seqüência de aminoácidos de uma região de afinidade de pelo menos uma molécula de IgIV capaz de interagir com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente, uma estrutura β cruzada e/ou com um 20 epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, e produzir moléculas isoladas, sintéticas e/ou recombinantes compreendendo referida seqüência de aminoácidos.

20 25 20. Método para selecionar uma molécula, de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, ou de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, a molécula compreendendo uma região de afinidade que, ao interagir com um epítopo de uma proteína dobrada incorretamente ou uma estrutura β cruzada e/ou ao interagir com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, é capaz de induzir opsonização de referida estrutura β

cruzada e/ou proteína com uma célula fagocítica, caracterizado pelo fato de que compreende:

- contactar uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, ou a composição como definido em qualquer uma das

5 reivindicações de 7 a 18, com uma proteína dobrada incorretamente, uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada;

- contactar qualquer complexo compreendendo uma proteína dobrada incorretamente, uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína

10 compreendendo uma estrutura β cruzada, ligada a uma molécula de IgIV e/ou a uma molécula isolada, sintética e/ou recombinantes, com uma célula fagocítica; e

- coletar uma molécula de IgIV e/ou molécula isolada, sintética e/ou recombinante que é capaz de induzir ou acentuar fagocitose, por

15 uma célula fagocítica, de referida proteína dobrada incorretamente, estrutura β cruzada e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada.

21. Coleção de moléculas de IgIV de acordo com a reivindicação 5 ou 6, e/ou a composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizada pelo fato de que é para uso como um medicamento.

22. Uso de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para prevenção e/ou tratamento pelo menos parcial de uma doença relacionada e/ou associada com proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada, um distúrbio da coagulação do sangue, sépsis e/ou uma infecção microbiana/por patógeno/bacteriana/por parasita/viral.

23. Uso de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo

fato de que referida infecção microbiana/por patógeno/bacteriana/por parasita/viral compreende uma infecção oportunista relacionada com HIV.

24. Método para incrementar degradação de proteína extracelular e/ou eliminação de proteína em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma coleção de moléculas de IgIV como definido na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, a referido indivíduo.

25. Método para inibir, pelo menos em parte, efeitos mediados por proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade efetiva de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18 a um indivíduo.

26. Método para prevenção e/ou tratamento pelo menos parcial de uma doença, um distúrbio e/ou uma infecção, sendo um distúrbio da coagulação do sangue, sépsis e/ou uma infecção microbiana/por patógeno/bacteriana/por parasita/viral relacionada e/ou associada com proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma coleção de moléculas de IgIV como definido na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18 a referido indivíduo.

27. Método para prevenção e ou tratamento pelo menos parcial de uma infecção oportunista relacionada com HIV em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, a referido indivíduo.

28. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

- uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou

- uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, e

5 - um carreador, diluente e/ou excipiente vantajoso.

29. Composição de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um composto de ligação de estrutura β cruzada.

10 30. Composição de acordo com a reivindicação 28 ou 29, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um composto de potencialização de ligação de estrutura β cruzada.

31. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 30, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um composto de ativação de complemento.

15 32. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 28 a 30, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um composto imunopotencializador, um composto supressor de inflamação, e/ou um composto inibidor de complemento.

20 33. Uso de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizado pelo fato de que é para inibir agregação de plaquetas sanguíneas induzida por proteína.

25 34. Uso de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizado pelo fato de que é para ligação competitiva de ativador de plasminogênio de tipo tissular (tPA) com uma proteína dobrada incorretamente, a uma estrutura β cruzada e/ou a uma molécula compreendendo uma estrutura β cruzada.

35. Método para remover, pelo menos parcialmente, proteínas

dobrada incorretamente s, estruturas β cruzadas e/ou proteínas compreendendo uma estrutura β cruzada de uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende contactar uma amostra com uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, e 5 remover de referida amostra um complexo de uma proteína dobrada incorretamente , e/ou uma estrutura β cruzada, e/ou proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, ligado a uma molécula de IgIV e/ou uma molécula isolada, sintética e/ou recombinante.

10 36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que referida amostra é uma amostra de fluido.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que referido fluido compreende um fluido corporal.

15 38. Método de acordo com a reivindicação 35 ou 36, caracterizado pelo fato de que referido fluido compreende um farmacêutico ou qualquer um de seus constituintes.

39. Método de acordo com a reivindicação 35 ou 36, caracterizado pelo fato de que referido fluido compreende uma substância alimentícia.

20 40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 35 a 39, caracterizado pelo fato de que referida coleção de moléculas de IgIV e/ou composição é ligada a um suporte sólido.

41. Kit de diagnóstico, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 - pelo menos uma região de afinidade de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou pelo menos uma região de afinidade de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente , com uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína

compreendendo uma estrutura β cruzada, e

- um modo de visualização de uma interação de referida proteína dobrada incorretamente e/ou referida estrutura β cruzada e/ou referida proteína com referida região de afinidade.

5 42. Kit de diagnóstico de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada compreende uma proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada relacionada com doença.

10 43. Método para determinar se uma proteína dobrada incorretamente, e/ou uma proteína e/ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada está presente em uma solução aquosa compreendendo uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende:

15 - contactar referida solução aquosa com uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, e

- detectar se proteína dobrada incorretamente dobrada, e/ou uma proteína e/ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada está presente.

20 44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que referida solução aquosa compreende um detergente, um produto alimentício, um suplemento alimentício, um meio de cultura de células, uma solução de proteína comercialmente disponível usada para fins de pesquisa, sangue, um produto do sangue, fluido cerebroespinhal, fluido sinovial, fluido linfático, um produto cosmético, uma célula, uma composição 25 farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína, ou uma combinação de qualquer um destes.

45. Método para remover uma proteína dobrada incorretamente, uma estrutura β cruzada e/ou uma proteína que compreende uma estrutura β cruzada de uma composição farmacêutica ou qualquer um de

seus constituintes compreendendo uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende:

- contactar referida composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína com uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou com uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18;

5 - permitir ligação de referida proteína dobrada incorretamente, e/ou proteína e/ou peptídeo compreendendo uma estrutura β cruzada a referida coleção de moléculas de IgIV e/ou composição; e

10 - separar peptídeo e/ou proteína ligada compreendendo uma estrutura β cruzada de referida composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes compreendendo uma proteína.

46. Método para reduzir e/ou prevenir efeitos colaterais indesejados de uma composição farmacêutica e/ou incrementar a atividade específica por grama de proteína, caracterizado pelo fato de que compreende remover uma proteína não-dobrada, um peptídeo não-dobrado, uma proteína dobrada incorretamente, uma proteína desnaturada, uma proteína agregada, um peptídeo agregado, uma proteína multimerizada e/ou um peptídeo multimerizado, e/ou uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, de referida composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes, usando um método como definido na reivindicação 45.

47. Composição farmacêutica ou qualquer um de seus constituintes, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína, obtêniavel por meio de um método como definido na reivindicação 45 ou 46.

25 48. Uso de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizado pelo fato de que é para diminuir o acúmulo de proteína e/ou proteínas dobradas incorretamente compreendendo uma estrutura β cruzada.

49. Uso de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que referida proteína dobrada incorretamente e/ou estrutura β cruzada está envolvida em uma doença conformacional.

50. Uso de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que referida doença é uma doença do tipo amiloidose, aterosclerose, diabetes, sangramento, trombose, câncer, sépsis e outras doenças inflamatórias, artrite reumatóide, encefalopatias espongiformes transmissíveis, esclerose múltipla, doenças autoimunes, doença associada com perda de memória ou mal de Parkinson e outras doenças neuronais 10 (epilepsia), encefalopatia, e/ou artrite, e/ou artrite reumatóide.

51. Uso de uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, caracterizado pelo fato de que é para determinar a presença de proteína ou proteínas dobradas incorretamente 15 depositadas acumuladas com uma estrutura β cruzada, de preferência, envolvida em uma doença conformacional.

52. Dispositivo de separação para realizar um método como definido em qualquer uma das reivindicações de 35 a 40, ou de 45 a 46, caracterizado pelo fato de que referido dispositivo compreende um sistema 20 para transportar fluidos (circulantes), em que referido sistema é dotado com meios para conectar-se a um fluido em fluxo, de preferência, na circulação de um indivíduo, para entrada de fluido em referido sistema e retorno de fluido do referido sistema, de preferência, na circulação de um indivíduo, em que referido sistema compreende adicionalmente uma fase sólida, em que referida 25 fase sólida compreende uma coleção de moléculas de IgIV como definido na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 19.

53. Dispositivo de separação de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que é um aparelho de diálise.

54. Método para interferir na coagulação do sangue, caracterizado pelo fato de que compreende fornecer no sangue uma coleção de moléculas de IgIV como definido na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18.

5 55. Método para determinar a quantidade de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas em uma composição, de preferência, em um medicamento e/ou vacina, caracterizado pelo fato de que compreende:

- contactar referida composição com uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou com uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, e
- relacionar a quantidade de proteínas dobradas incorretamente e/ou estruturas β cruzadas ligadas com a quantidade de estruturas β cruzadas presentes em referida composição.

10 15 56. Método para determinar uma diferença no teor de estrutura β cruzada de uma proteína em uma amostra de referência, em comparação com o teor de estrutura β cruzada de referida proteína em uma amostra de teste, em que referida amostra de teste foi submetida a um tratamento que, espera-se, exerce um efeito sobre o teor de estrutura β cruzada de referida proteína, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

- determinar em um exemplo de referência o teor de estrutura β cruzada de uma proteína usando-se uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6 e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18;
- submeter referida proteína a um tratamento que, espera-se, exerce um efeito sobre o teor de estrutura β cruzada de referida proteína, obtendo-se desta forma uma amostra de teste;
- determinar na amostra de teste obtida o teor de estrutura β cruzada de referida proteína usando-se uma coleção de moléculas de IgIV

como definido na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definido em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18; e

5 - determinar se o teor de estrutura β cruzada de referida proteína em referida amostra de referência é significativamente diferente do teor de estrutura β cruzada de referida proteína em referida amostra de teste.

57. Método para determinar a identidade de uma proteína dobrada incorretamente, de uma estrutura β cruzada ou de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada em uma amostra compreendendo uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende:

10 - contactar referida amostra com uma coleção de moléculas de IgIV como definida na reivindicação 5 ou 6, e/ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 7 a 18, resultando em proteínas dobradas incorretamente ligadas, estruturas β cruzadas e/ou proteína(s) ligada(s) compreendendo uma estrutura β cruzada, e

15 - identificar uma proteína dobrada incorretamente ligada, estrutura β cruzada ligada e/ou proteína(s) ligada(s) compreendendo uma estrutura β cruzada.

20 58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que referida amostra compreende uma solução aquosa, de preferência, um fluido corporal.

25 59. Método de acordo com a reivindicação 57 ou 58, caracterizado pelo fato de que se usa fluidos corporais originados de indivíduos saudáveis, e fluidos corporais de indivíduos que sofrem de, ou suspeitos de sofrer de, uma doença relacionada e/ou associada com a presença de uma estrutura β cruzada.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 57 a 59, caracterizado pelo fato de que se usa uma amostra de um indivíduo que sofre de, ou que se encontra em risco de sofrer de, amiloidose AL e/ou artrite.

61. Composto, caracterizado pelo fato de que é capaz de ligar-se especificamente a um composto descrito na tabela 9, e/ou capaz de diminuir a quantidade e/ou atividade de um composto descrito na Tabela 9, como um medicamento.

5 62. Uso de um composto capaz de ligar-se especificamente a um composto descrito na Tabela 9, e/ou capaz de diminuir a quantidade e/ou atividade de um composto descrito na tabela 9, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento contra uma doença, um distúrbio da coagulação do sangue, sépsis e/ou uma infecção microbiana/por 10 patógeno/bacteriana/por parasita/viral relacionada e/ou associada com proteína dobrada incorretamente .

63. Uso de acordo com a reivindicação 51 ou 62, caracterizado pelo fato de que referida doença compreende amiloidose AL e/ou artrite.

64. Método para tratar um indivíduo que sofre de, ou em risco 15 de sofrer de, uma doença, um distúrbio e/ou uma infecção, sendo um distúrbio da coagulação do sangue, sépsis e/ou uma infecção microbiana/por patógeno/bacteriana/por parasita/viral, relacionada e/ou associada com proteína dobrada incorretamente , caracterizado pelo fato de que compreende administrar a referido indivíduo um composto capaz de ligar-se 20 especificamente a um composto descrito na Tabela 9, e/ou capaz de diminuir a quantidade e/ou atividade de um composto descrito na Tabela 9.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que referida doença compreende amiloidose AL e/ou artrite.

66. Composição de acordo com a reivindicação 10, 25 caracterizado pelo fato de que referida molécula efetora é um inibidor de dobramento incorreto.

Figura 1

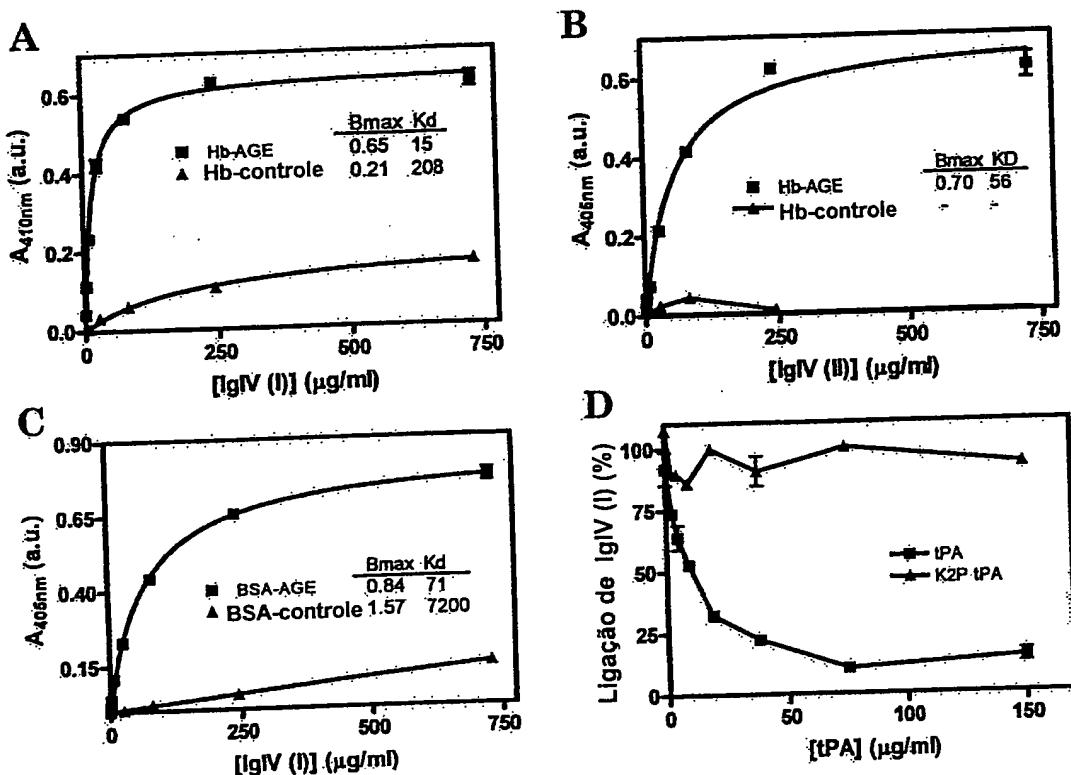


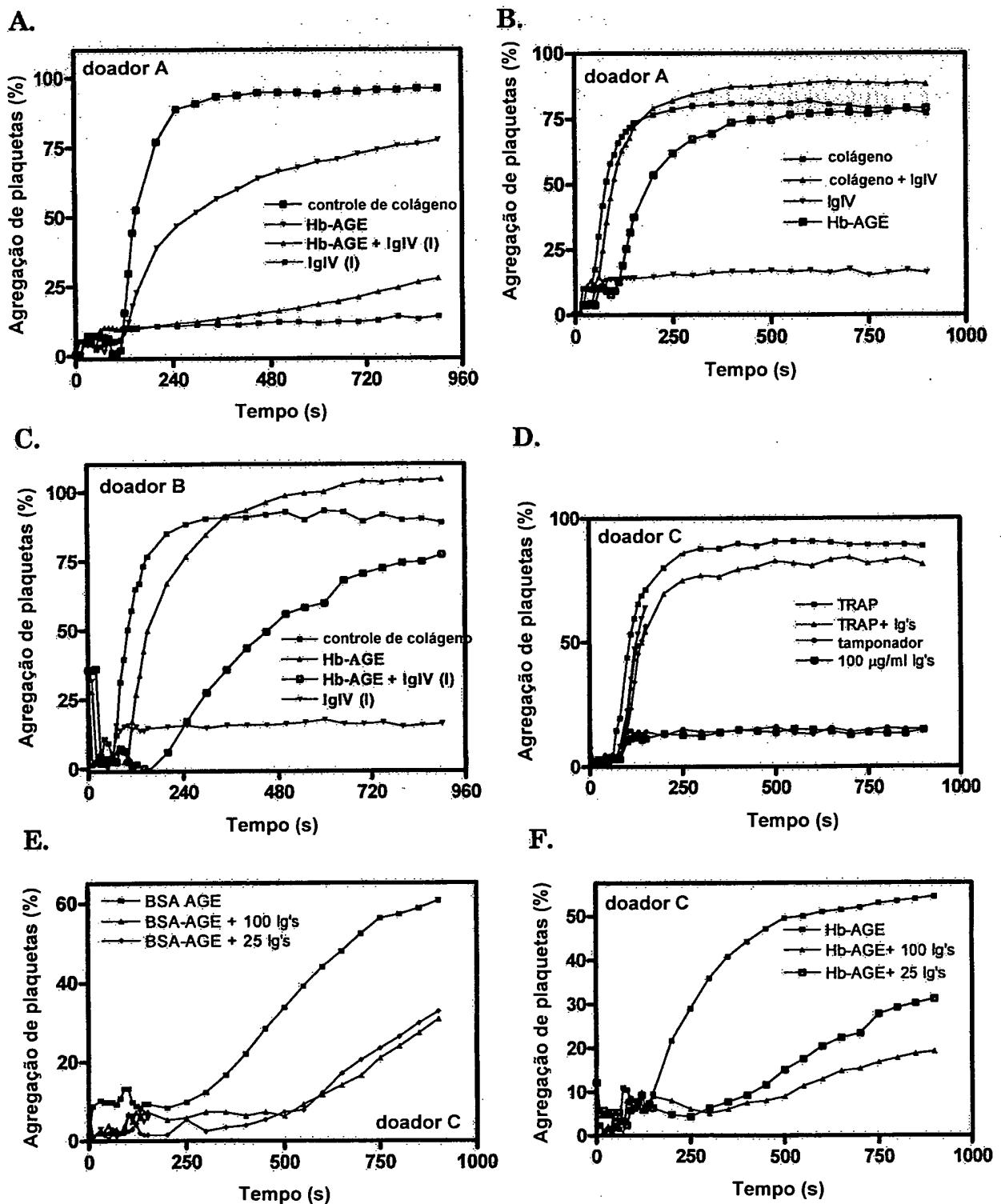
Figura 2

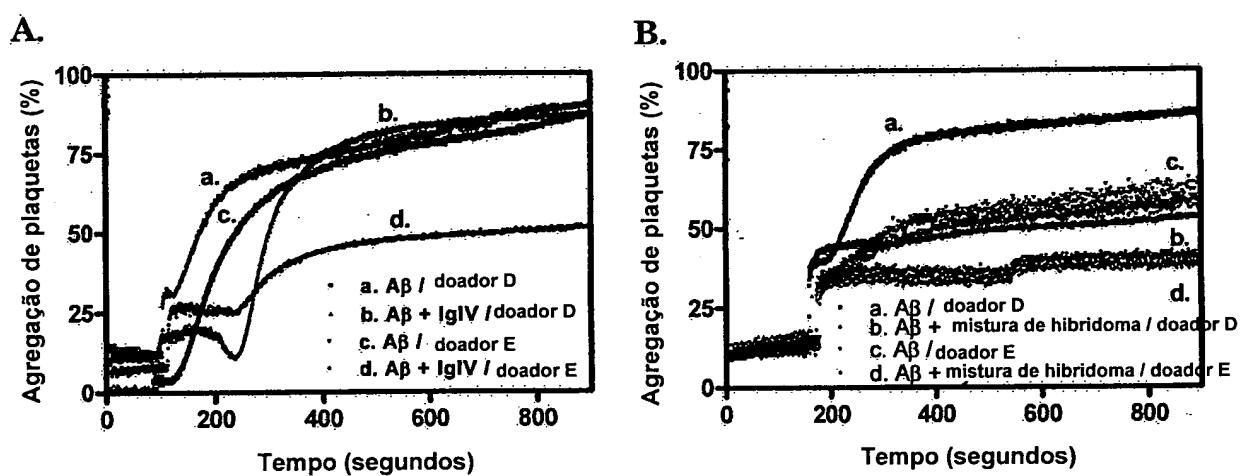
Figura 3

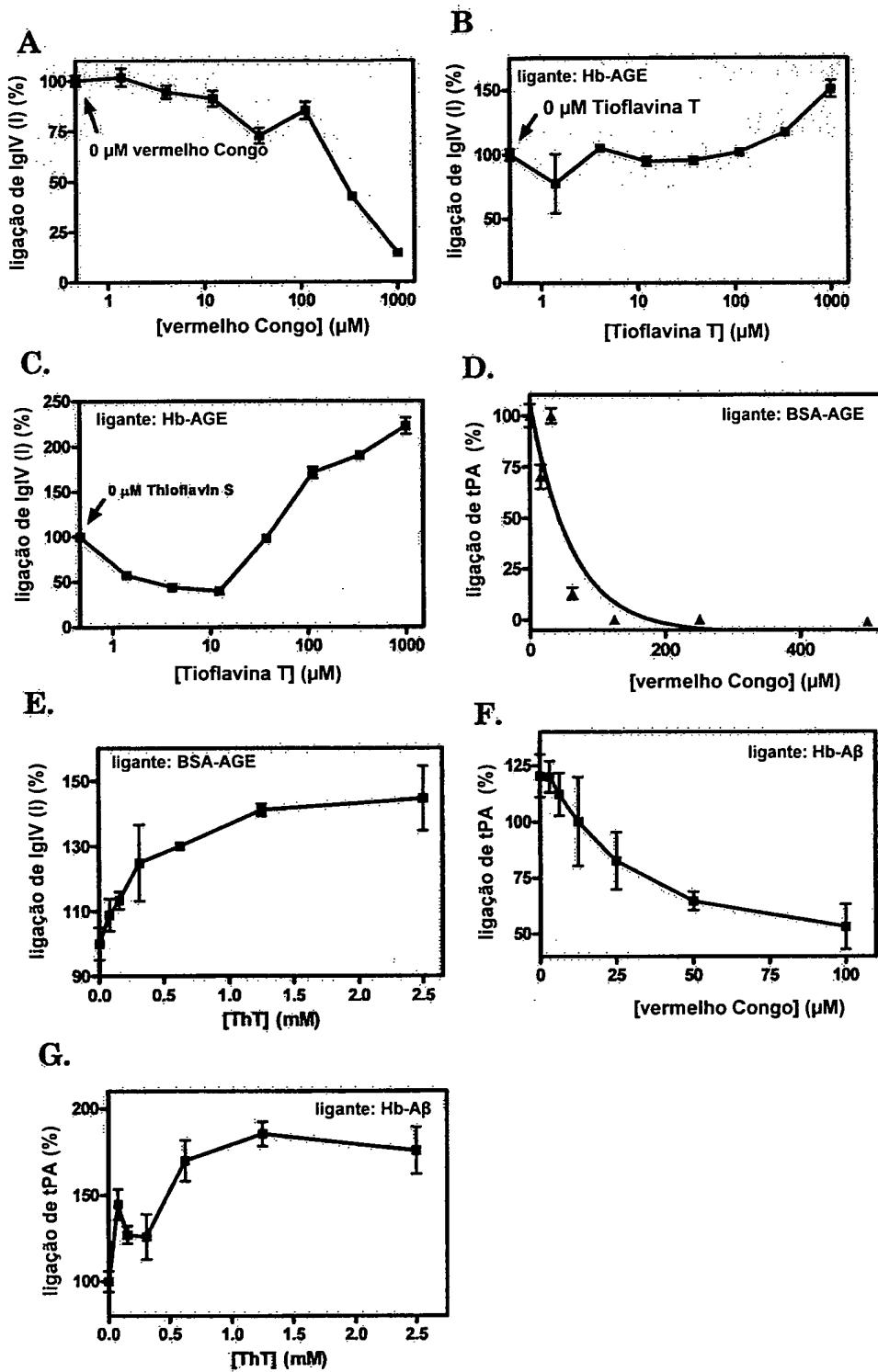
Figura 4

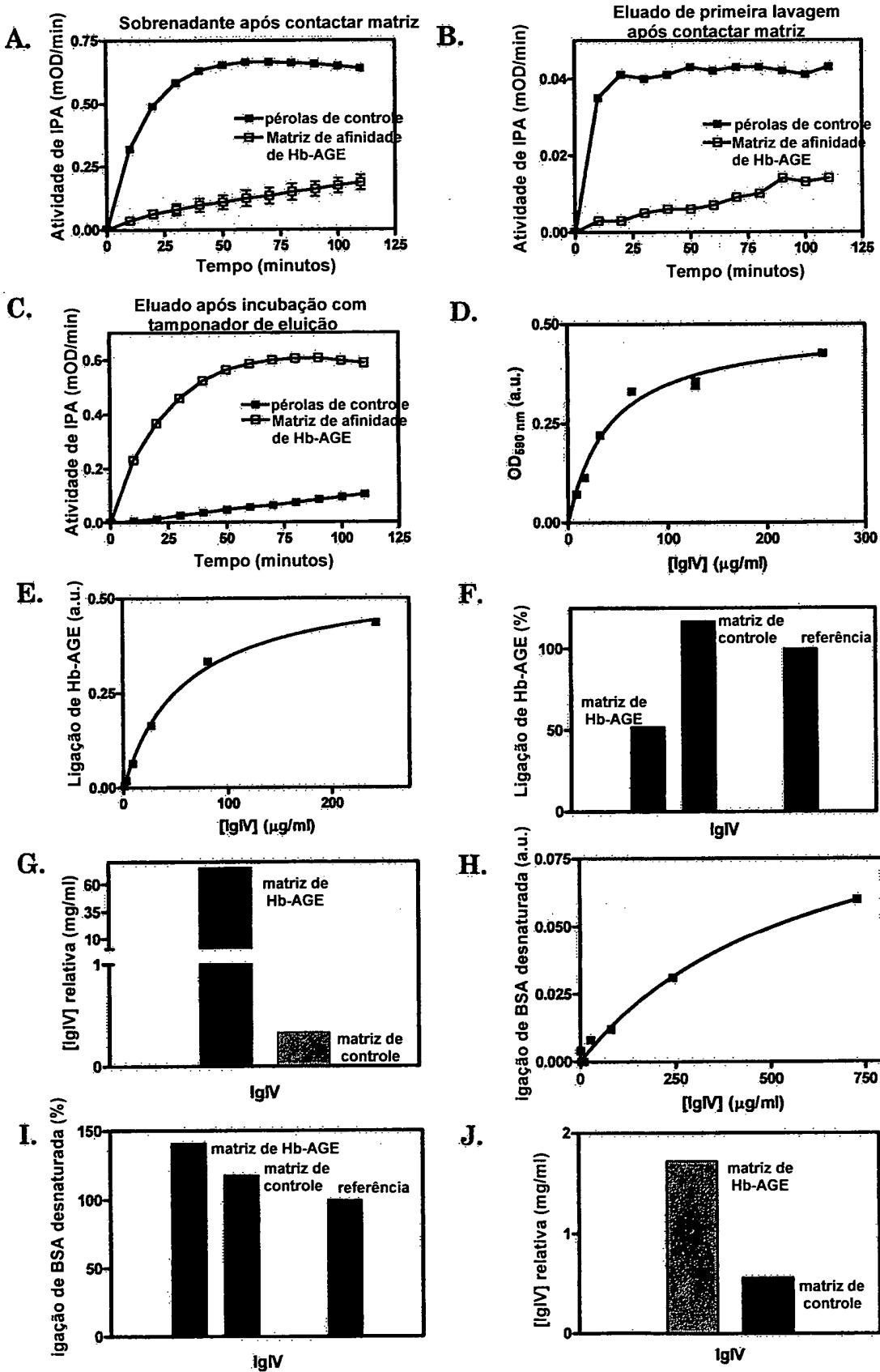
Figura 5

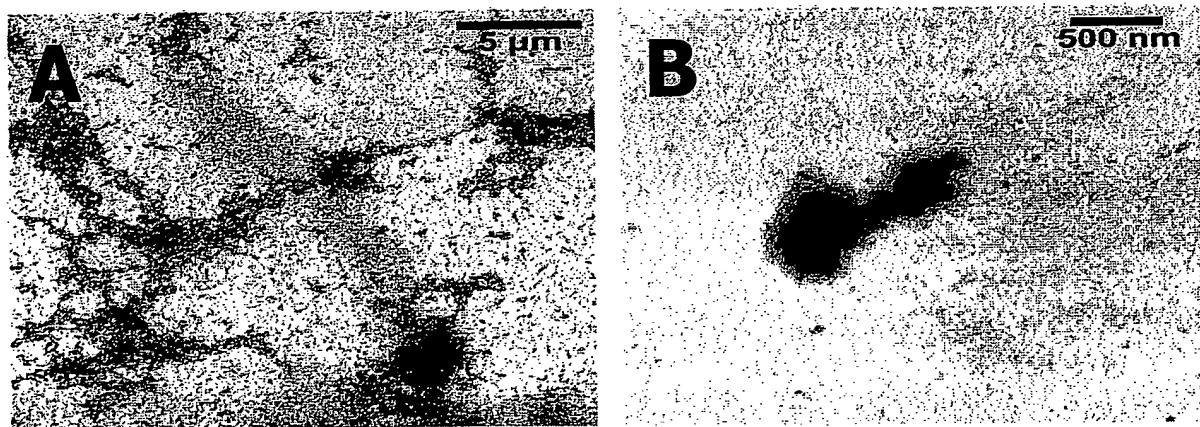
Figura 6

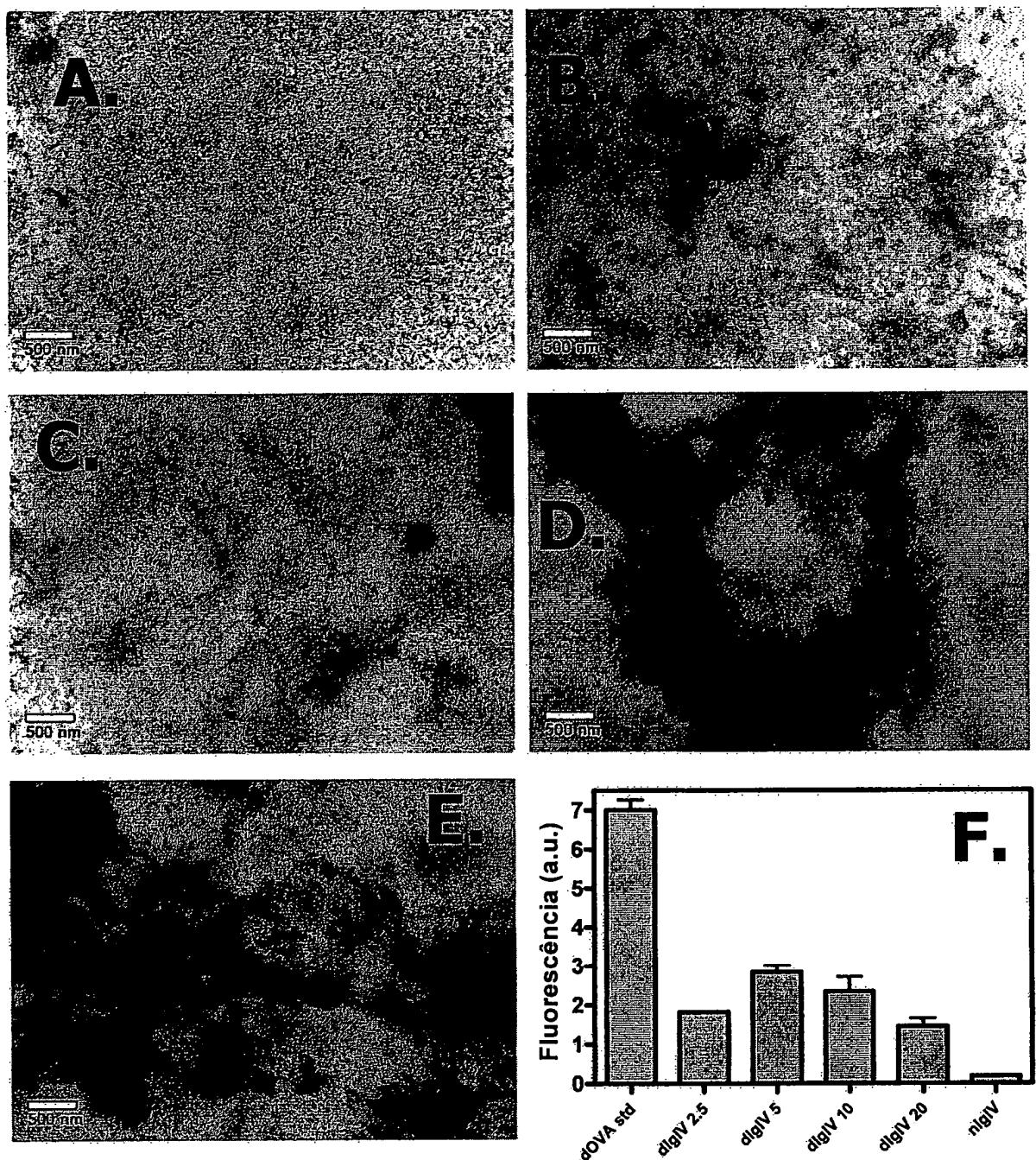
Figura 7

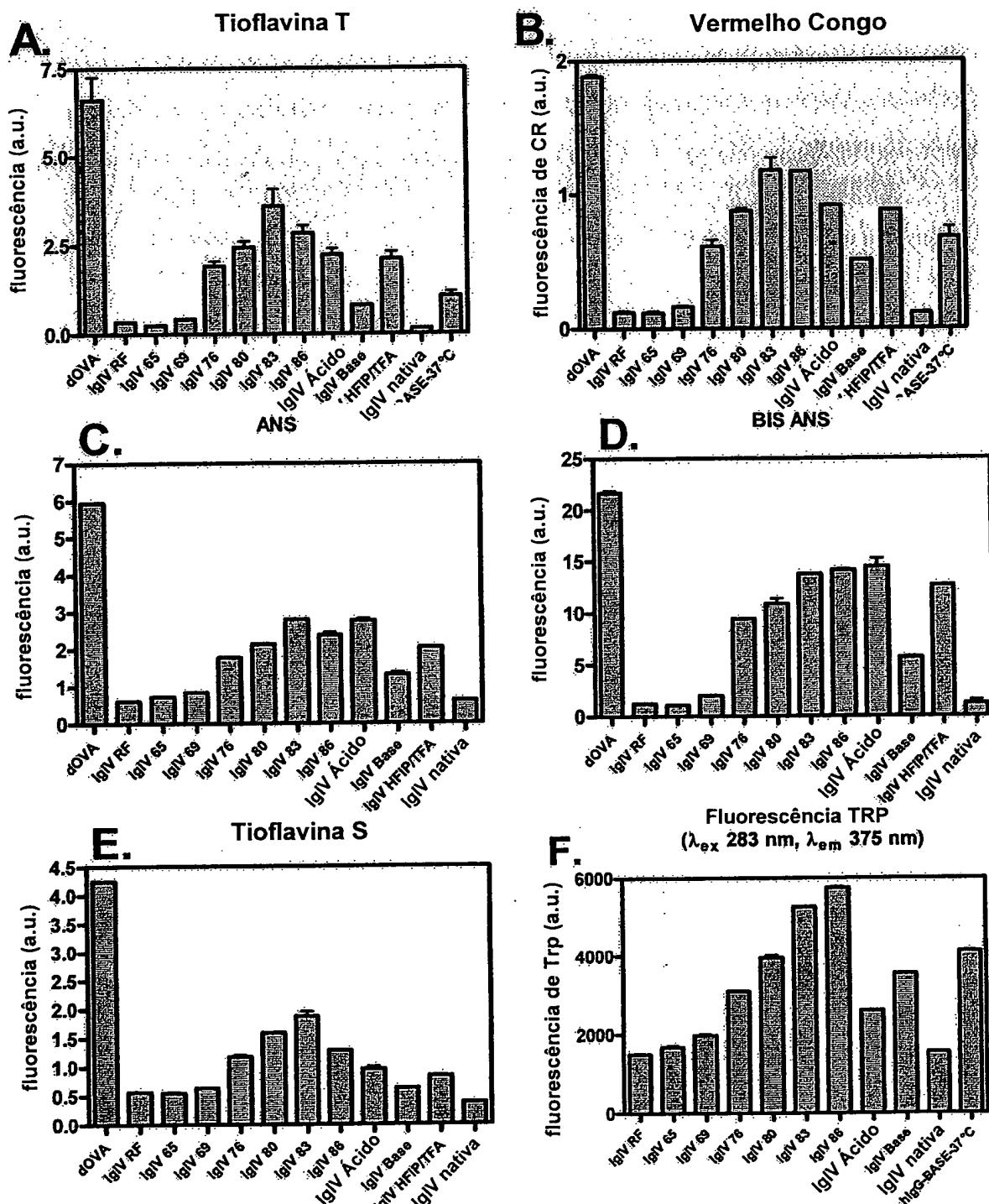
Figura 8

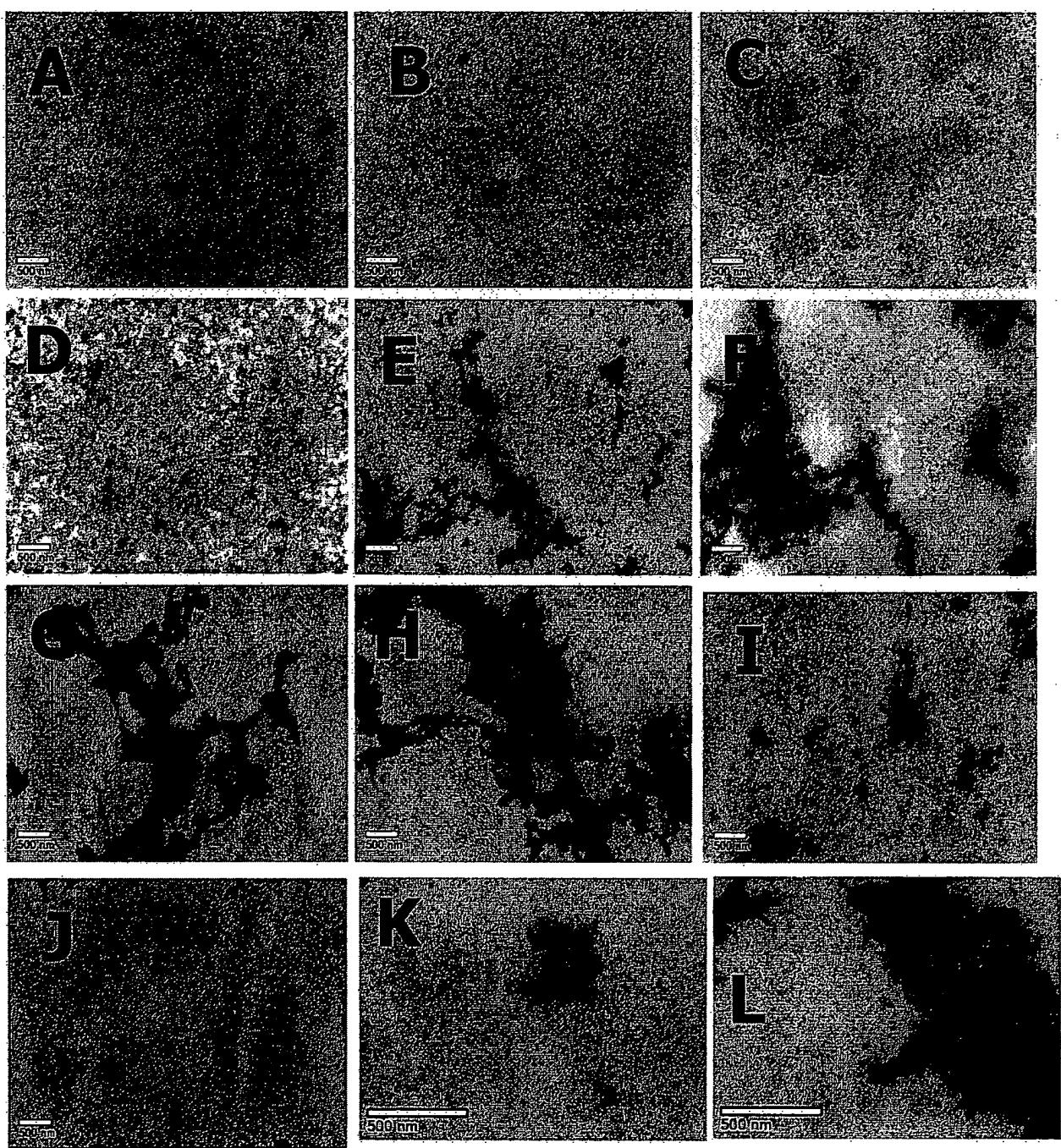
Figura 9

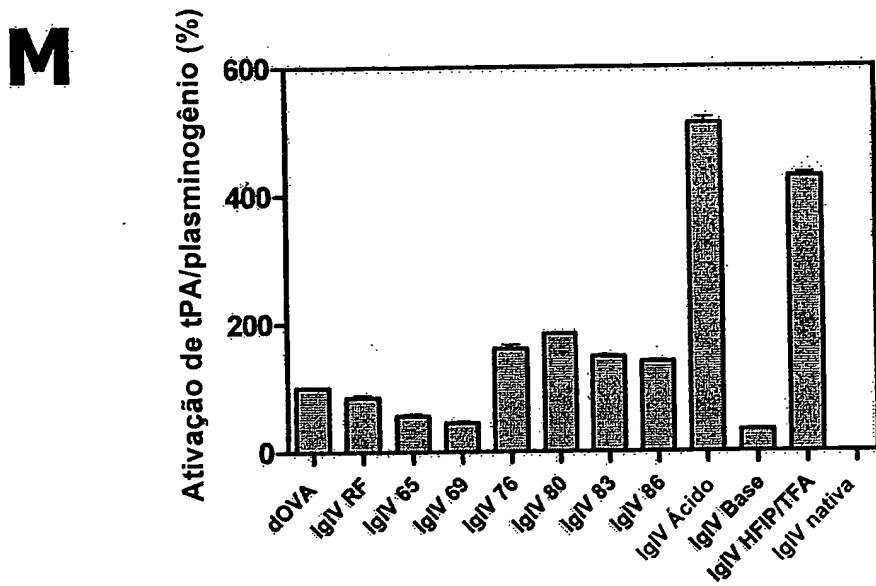
Figura 9 (Cont.)

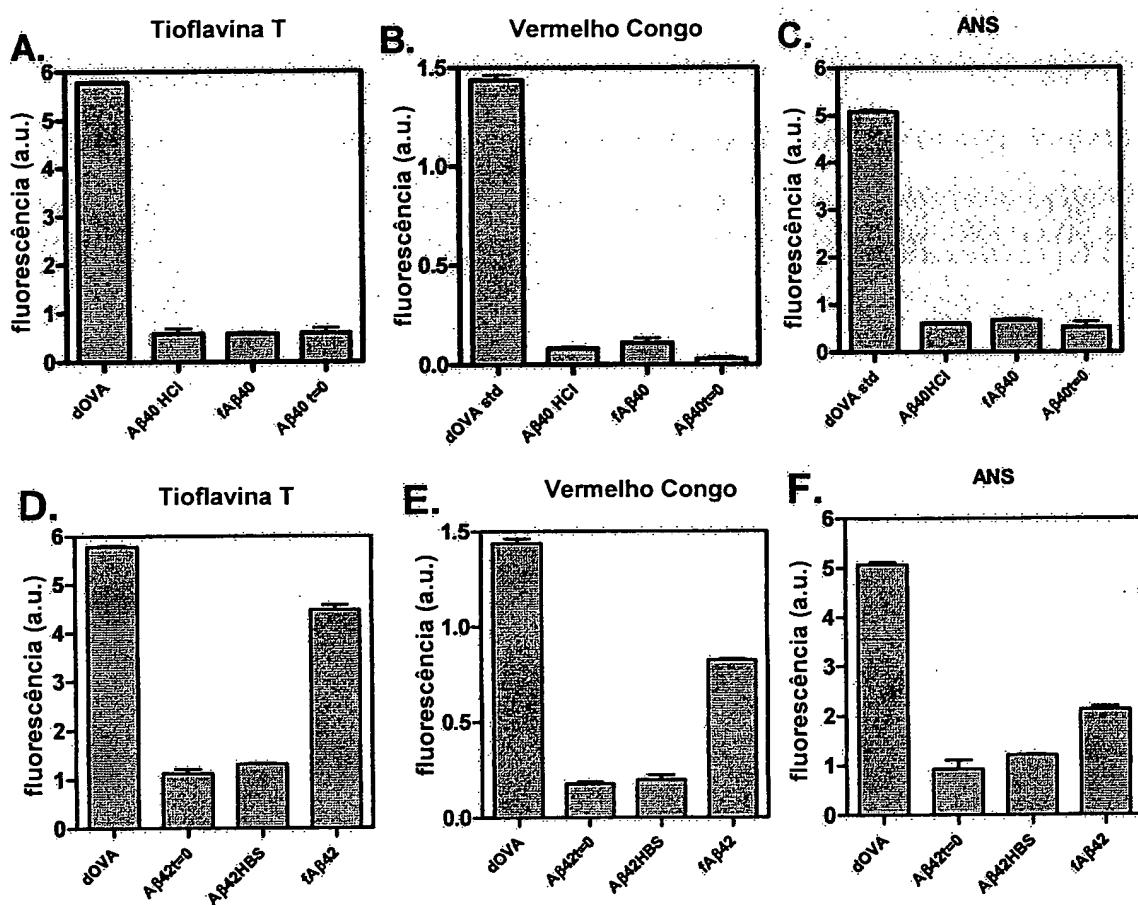
Figura 10

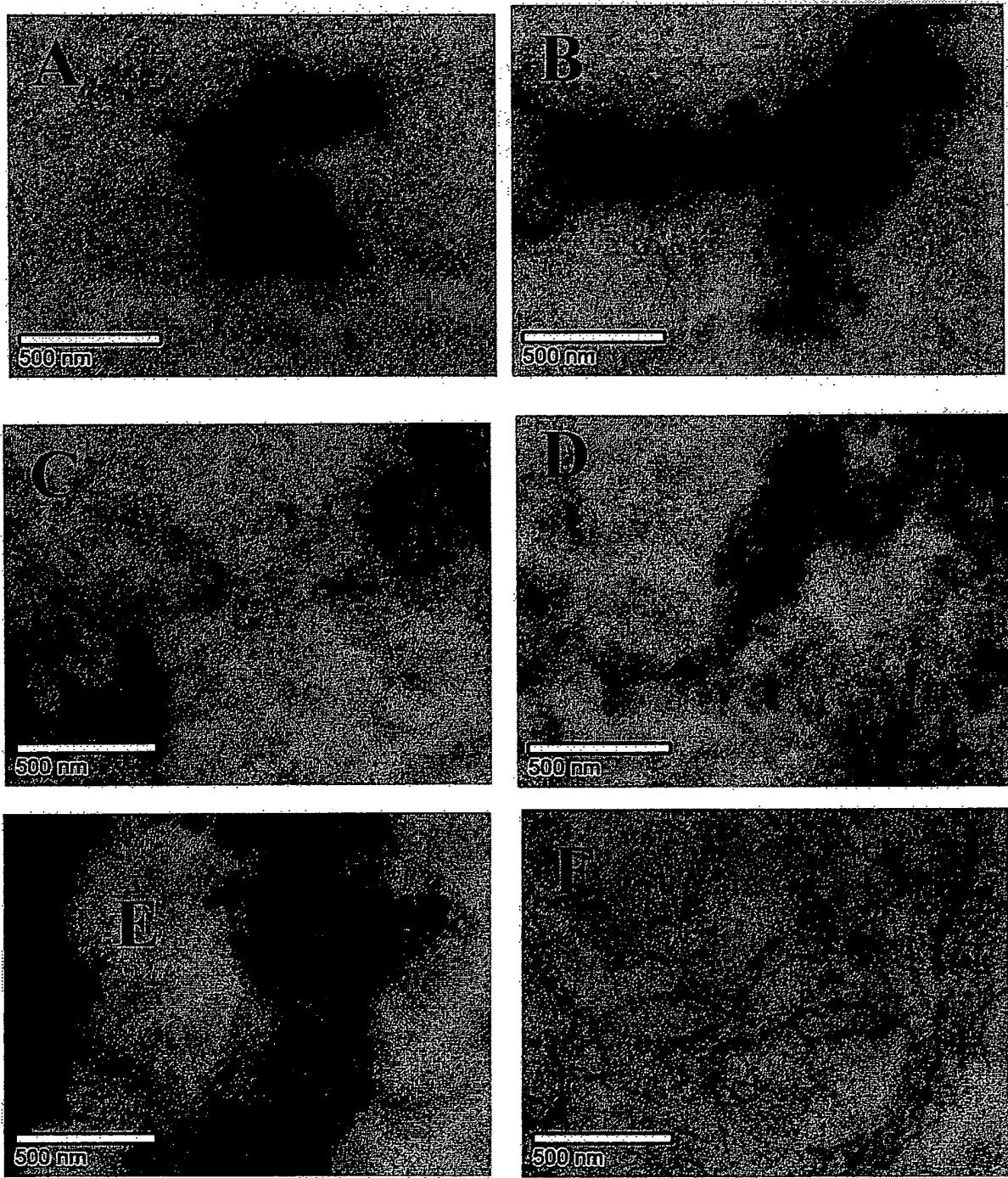
Figura 11

Figura 12

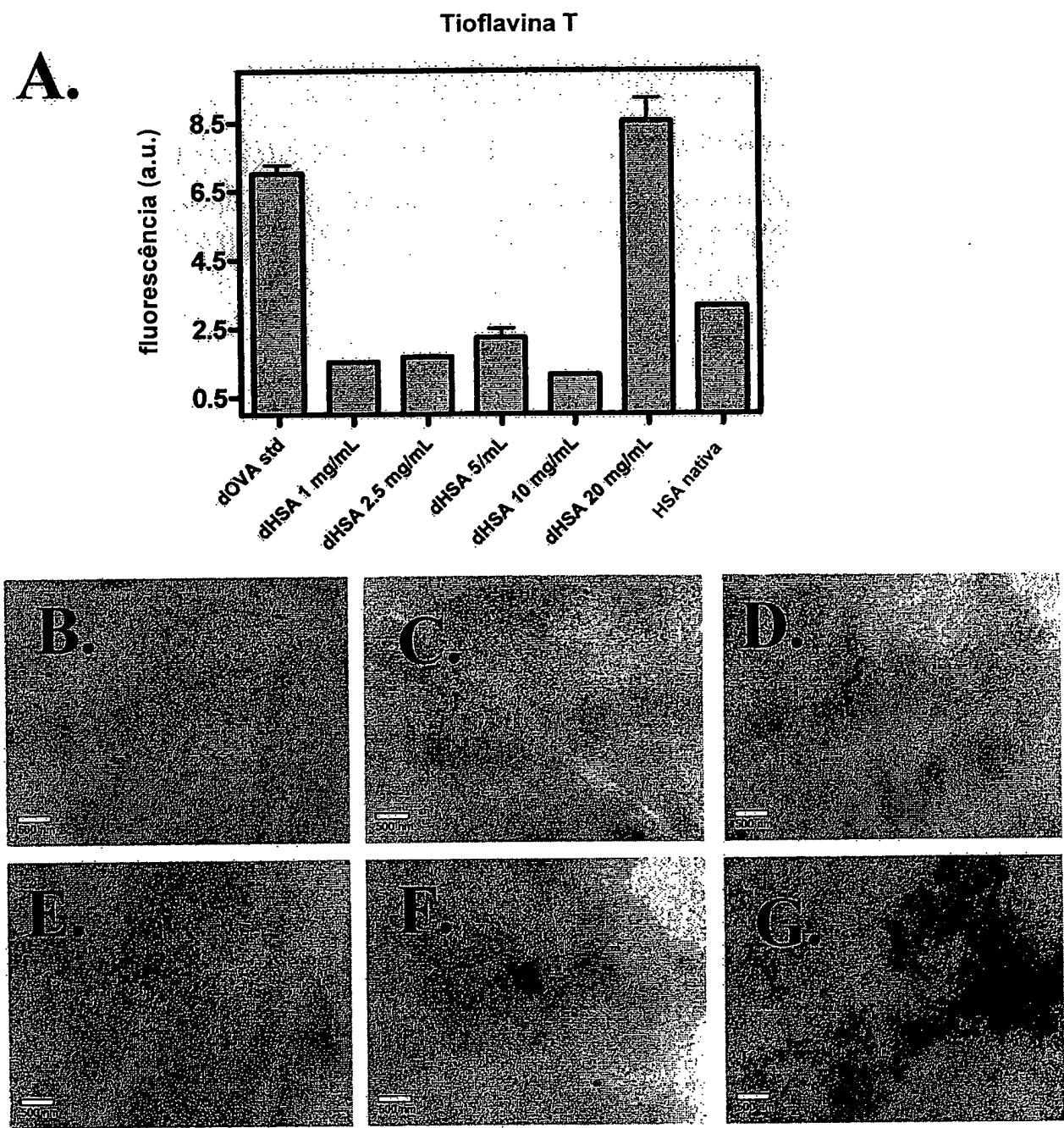


Figura 13

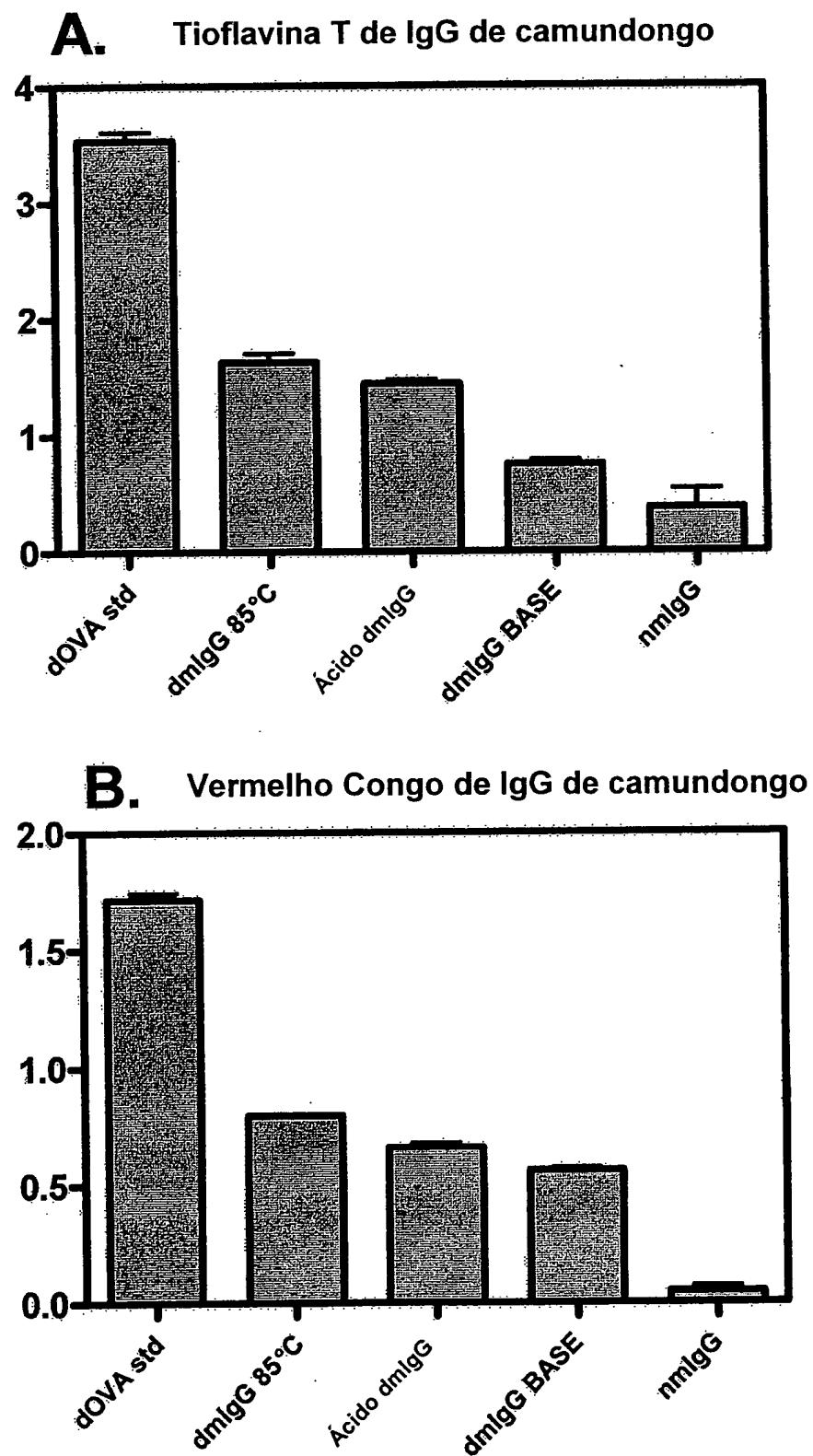


Figura 14

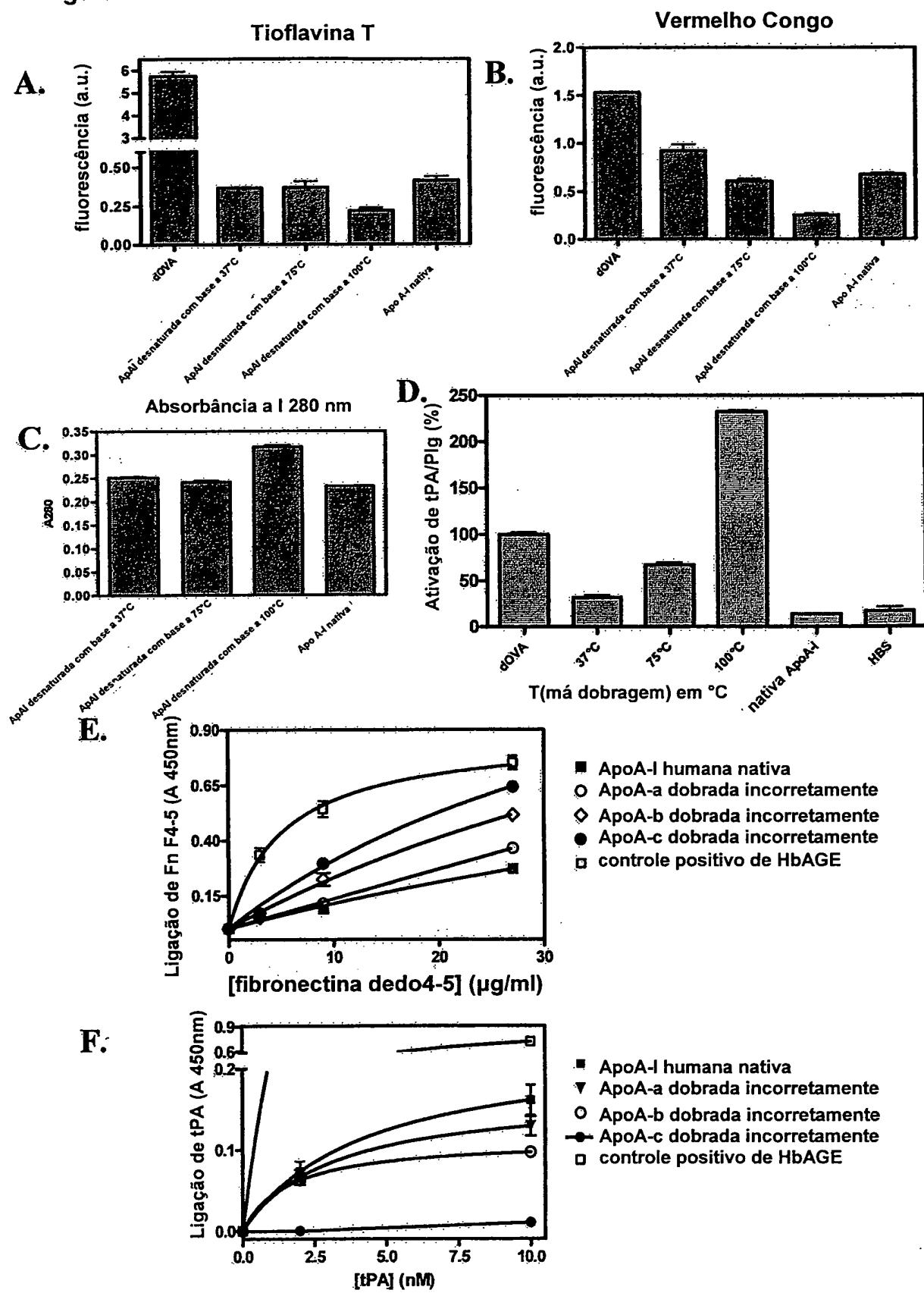


Figura 15

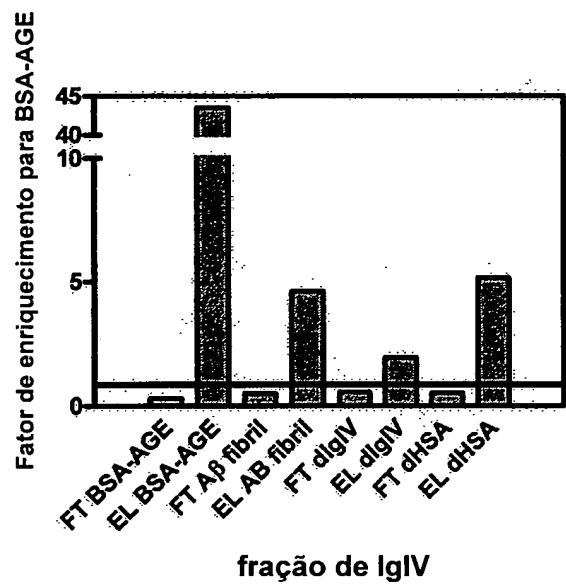


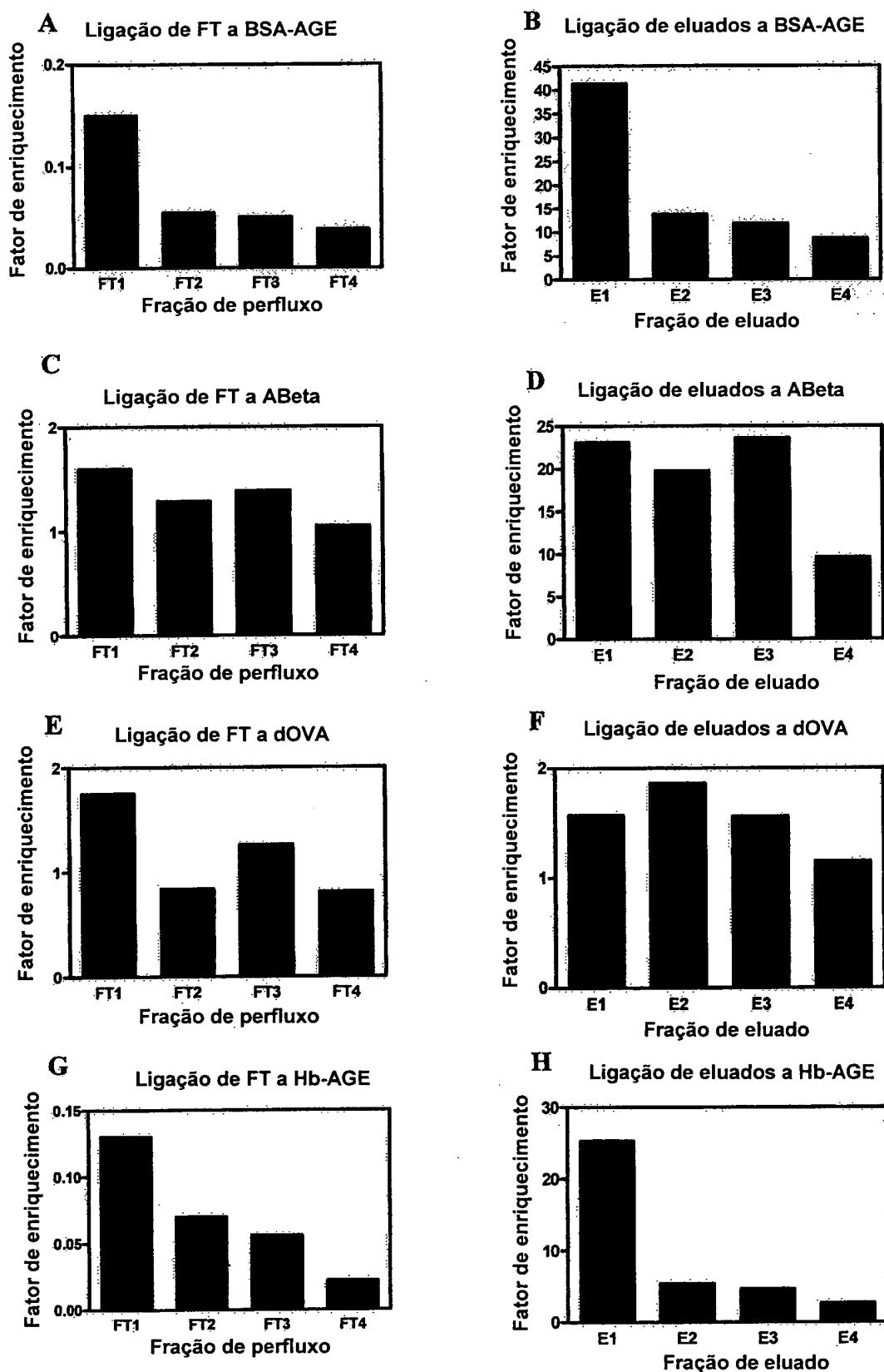
Figura 16

Figura 17

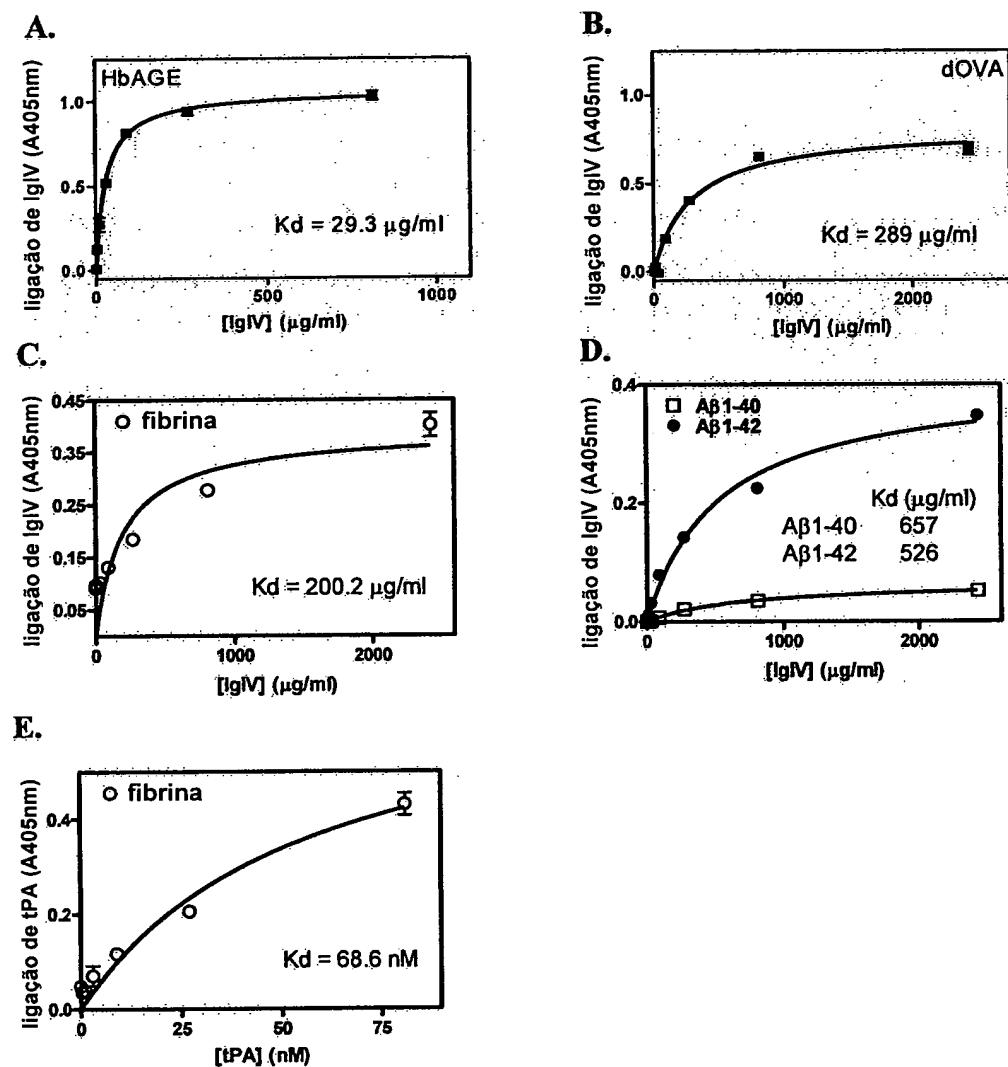


Figura 18

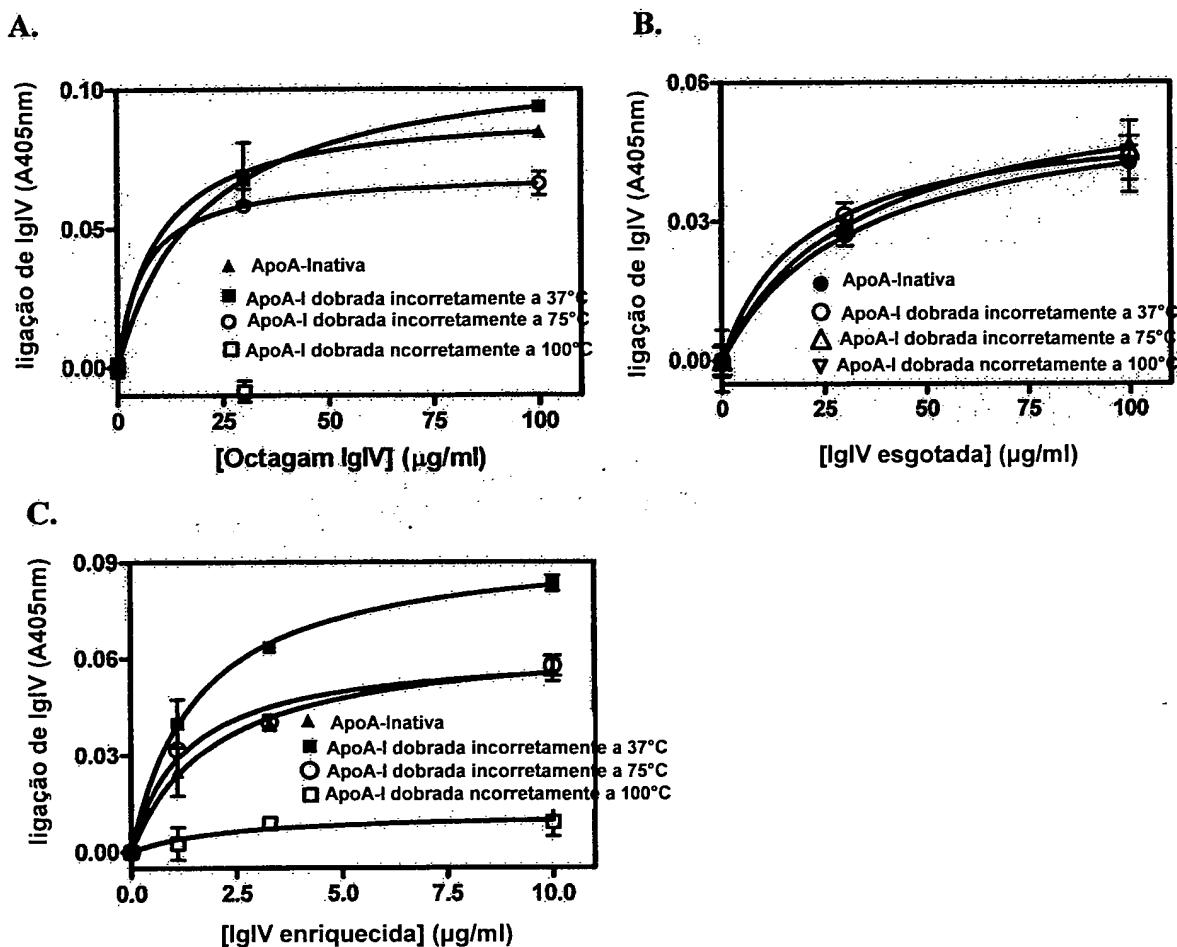


Figura 19

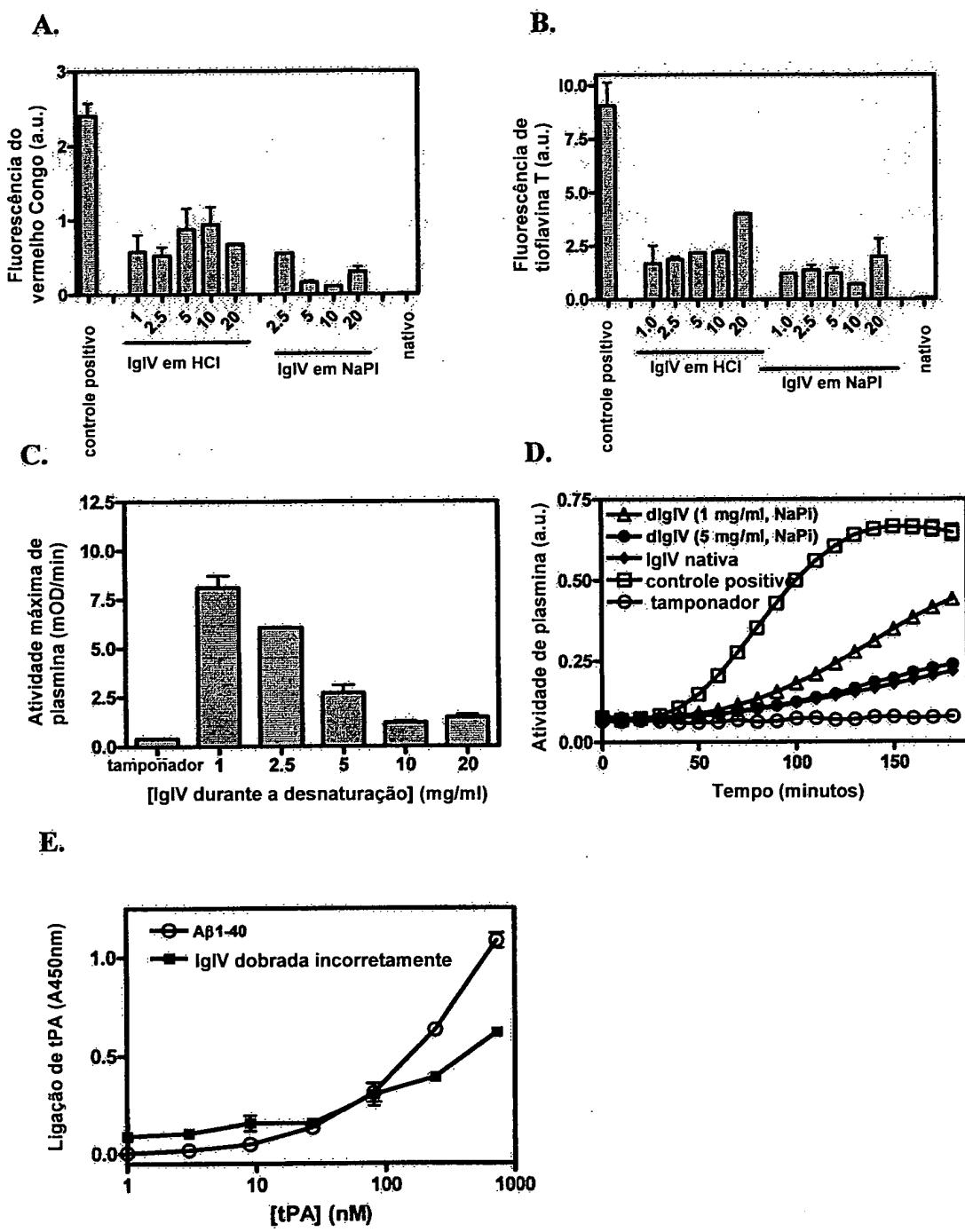


Figura 20

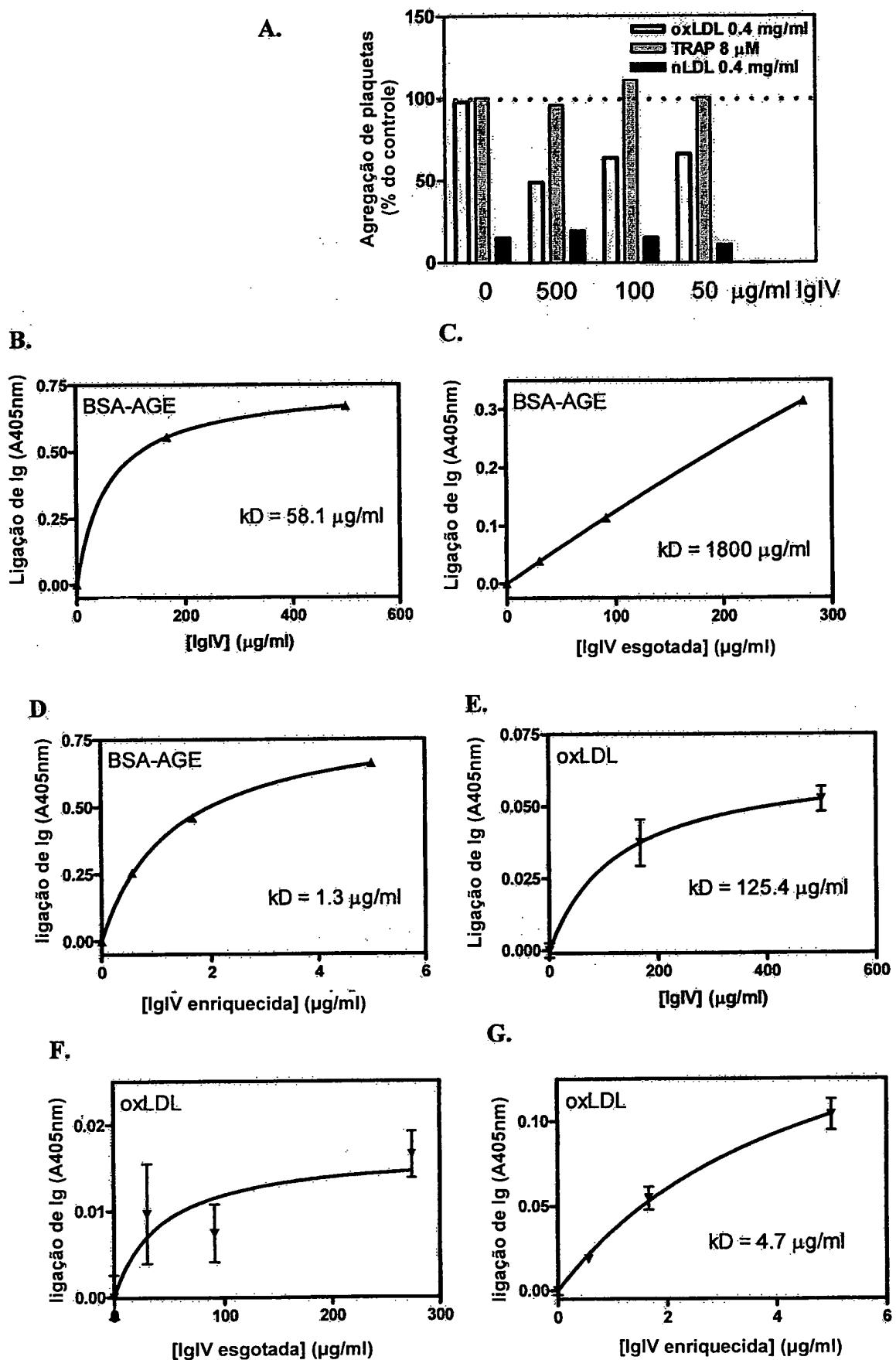


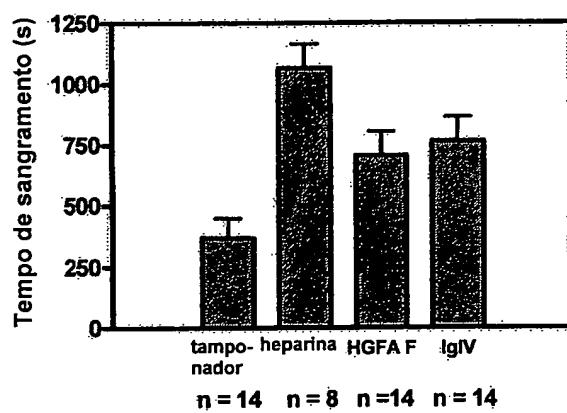
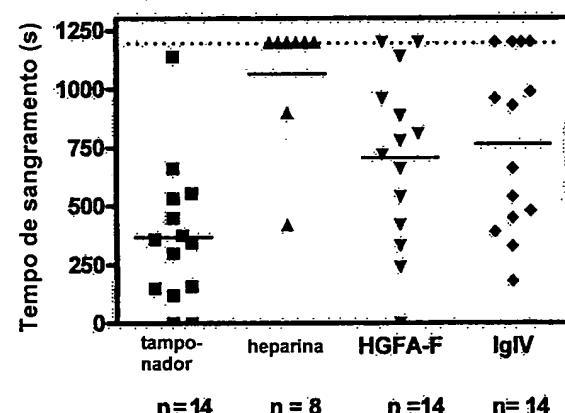
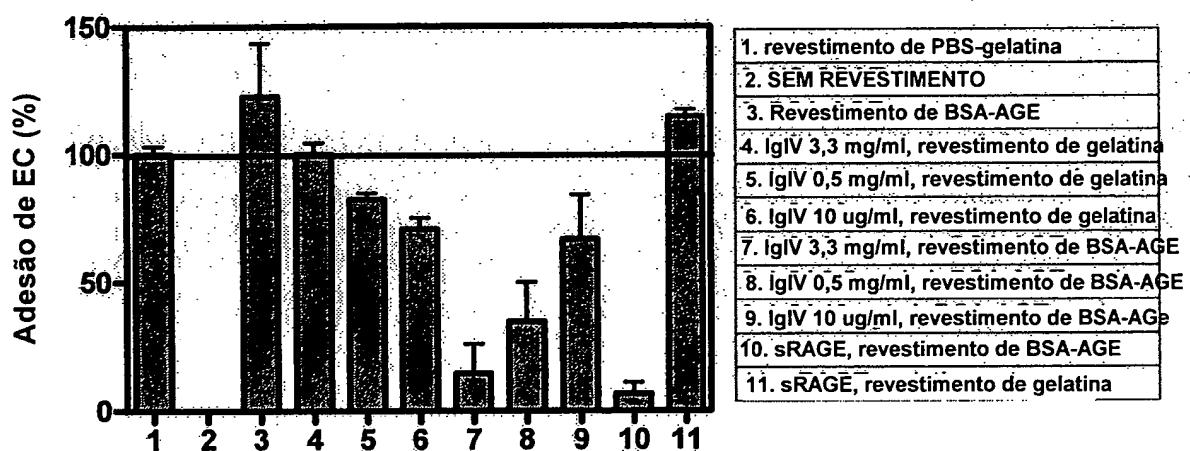
Figura 21**A.****B.**

Figura 22

A.



B.

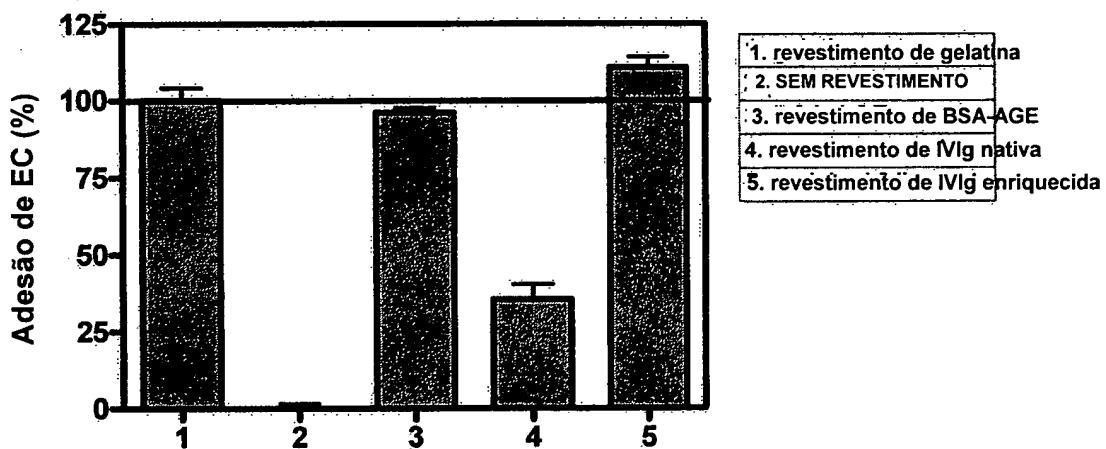


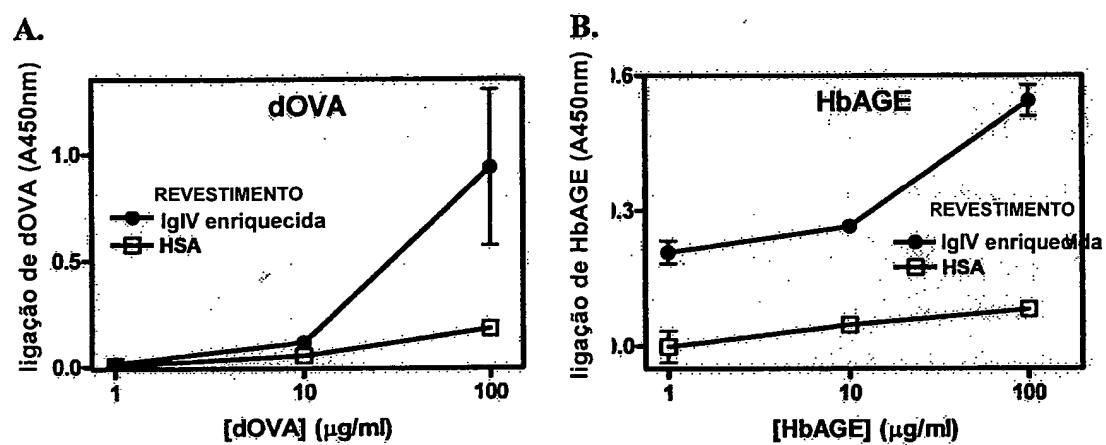
Figura 23

Figura 24

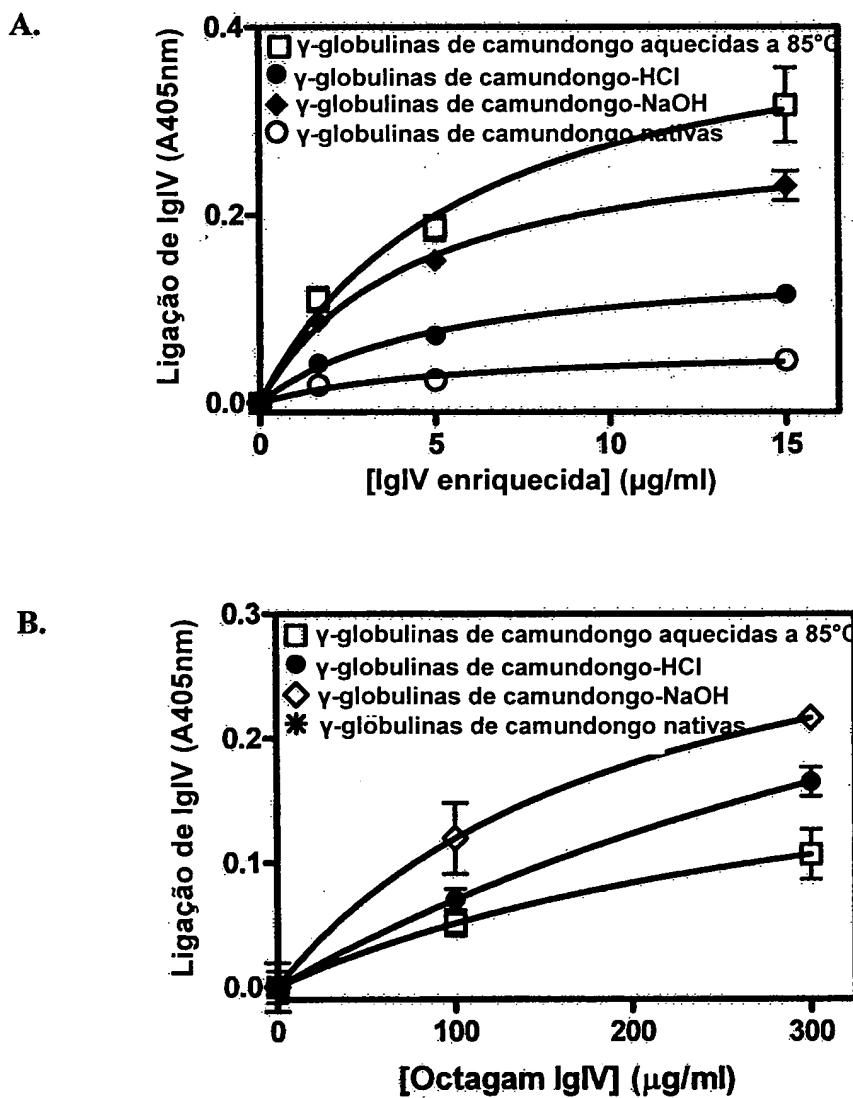


Figura 25

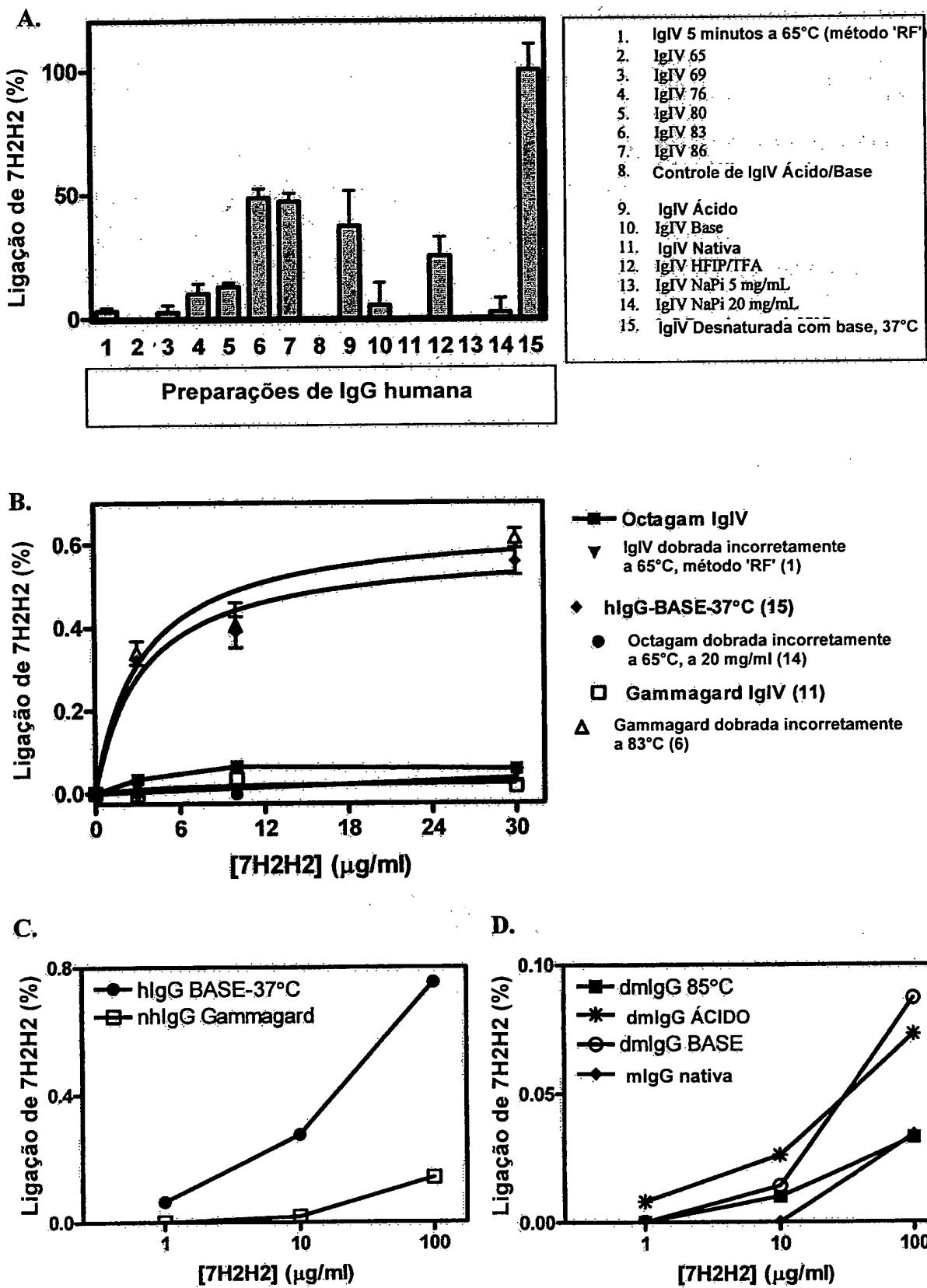
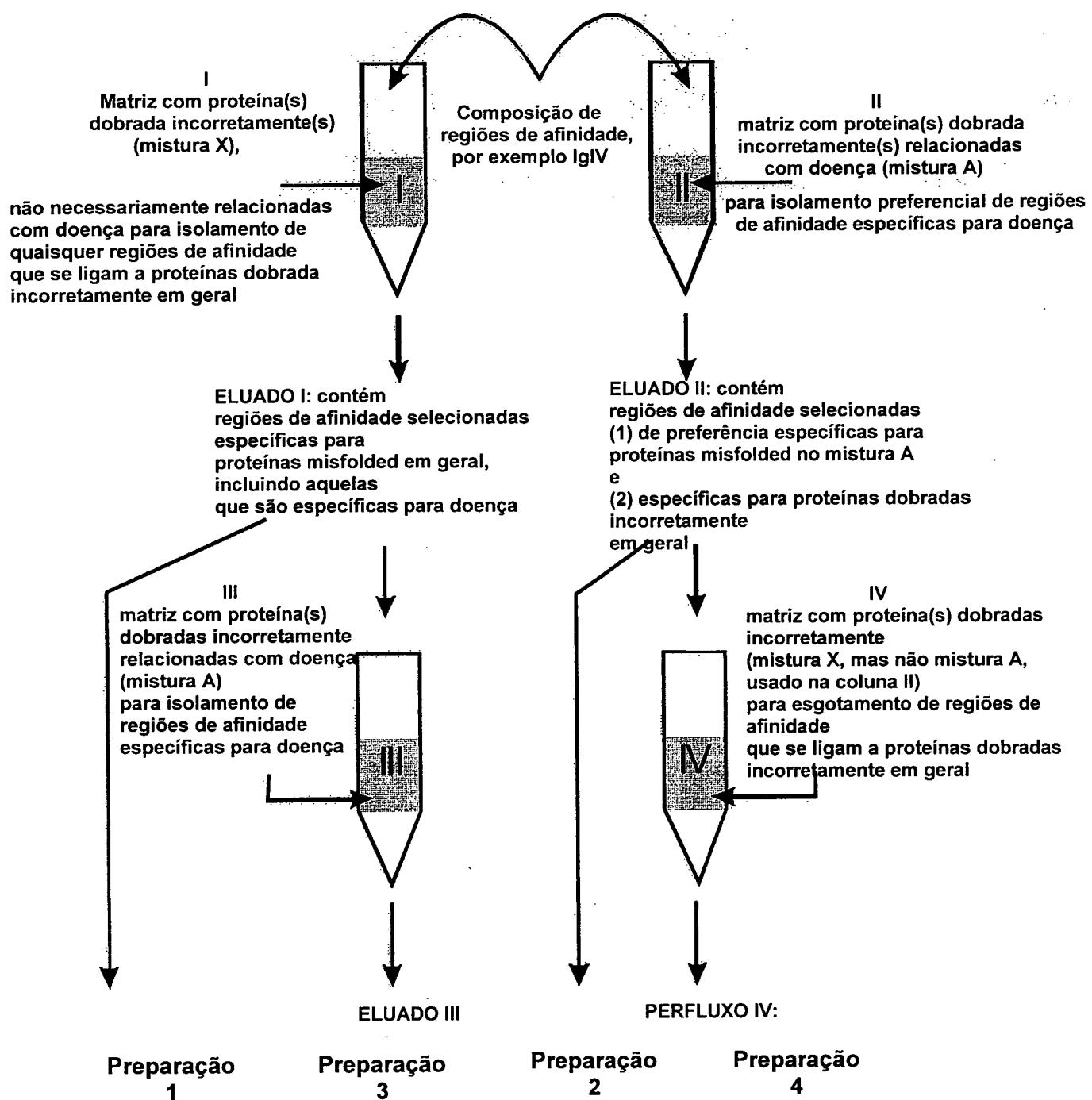


Figura 26

ESQUEMA RESUMINDO A SELEÇÃO DE REGIÕES DE AFINIDADE PARA:

1. Doenças de mau dobramento em geral

2,3,4. Doenças de mau dobramento envolvendo proteínas relacionadas com doença específica



mistura A: Mistura de um tipo ou de múltiplos tipos de proteínas dobradas incorretamente em uma doença ou conjunto de doenças particulares

mistura X: Mistura de qualquer tipo de proteína dobrada incorretamente ou, de preferência, conjunto de tipos de proteínas dobradas incorretamente não necessariamente envolvidas em uma doença particular; representando o Misfoldome.

mistura Y: Mistura de qualquer tipo de proteína dobrada incorretamente ou, de preferência, conjunto de tipos de proteínas dobradas incorretamente, excluindo aquelas no mistura A.

RESUMO

“MÉTODOS PARA SELECIONAR PELO MENOS UMA MOLÉCULA, PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO, PARA INCREMENTAR DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNA EXTRACELULAR E/OU ELIMINAÇÃO 5 DE PROTEÍNA EM UM INDIVÍDUO, PARA INIBIR, PELO MENOS EM PARTE, EFEITOS MEDIADOS POR PROTEÍNA MAL-DOBRADA E/OU ESTRUTURA B CRUZADA, PARA PREVENÇÃO PELO MENOS PARCIAL E/OU TRATAMENTO DE UMA DOENÇA, DE UM DISTÚRBIO E/OU DE UMA INFECÇÃO, PARA REMOVER, PELO 10 MENOS PARCIALMENTE, PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS, ESTRUTURAS B CRUZADAS E/OU PROTEÍNAS, PARA DETERMINAR SE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, E/OU UMA PROTEÍNA E/OU PEPTÍDEO COMPREENDENDO UMA ESTRUTURA B CRUZADA ESTÁ PRESENTE EM UMA SOLUÇÃO AQUOSA, PARA REDUZIR 15 E/OU PREVENIR EFEITOS SECUNDÁRIOS INDESEJADOS DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E/OU INCREMENTAR A ATIVIDADE ESPECÍFICA POR GRAMA DE PROTEÍNA, PARA INTERFERIR NA COAGULAÇÃO DO SANGUE, PARA DETERMINAR A QUANTIDADE DE PROTEÍNAS MAL-DOBRADAS E/OU 20 ESTRUTURAS B CRUZADAS EM UMA COMPOSIÇÃO, PARA DETERMINAR UMA DIFERENÇA NO TEOR DE ESTRUTURA B CRUZADA, PARA DETERMINAR A IDENTIDADE DE UMA PROTEÍNA MAL-DOBRADA, DE UMA ESTRUTURA B CRUZADA OU DE UMA PROTEÍNA, E PARA TRATAR UM SUJEITO QUE SOFRE DE, 25 OU EM RISCO DE SOFRER DE, UMA DOENÇA, UM DISTÚRBIO E/OU UMA INFECÇÃO, COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IGIV, COMPOSIÇÃO, USO DE UMA COLEÇÃO DE MOLÉCULAS DE IGIV E/OU DE UMA COMPOSIÇÃO, KIT DIAGNÓSTICO, DISPOSITIVO DE SEPARAÇÃO, COMPOSTO, E, USO DE UM COMPOSTO”

A presente invenção proporciona um Método para selecionar pelo menos uma molécula de IgIV, de uma coleção de moléculas de IgIV compreendendo uma região de afinidade que é capaz de interagir com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com um epítopo de uma estrutura β cruzada e/ou com um epítopo de uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, em que referido método compreende contactar uma coleção de moléculas de IgIV com uma proteína dobrada incorretamente e/ou com uma estrutura β cruzada e/ou com uma proteína compreendendo uma estrutura β cruzada, e coletar pelo menos uma molécula de IgIV compreendendo uma região de afinidade interagindo com referido epítopo e/ou proteína dobrada incorretamente .