

(11) *Número de Publicação:* **PT 792373 E**

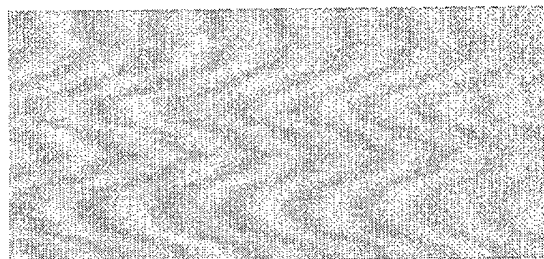
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12Q001/48 A G01N033/546 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.11.08	(73) <i>Titular(es):</i> PHARMACIA & UPJOHN COMPANY 301 HENRIETTA STREET KALAMAZOO, MI 49001 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1994.11.16 US 340283	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.09.03	(72) <i>Inventor(es):</i> AKE P. ELHAMMER US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.03.22	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* TESTE DE PROXIMIDADE POR CINTILAÇÃO PARA A ACTIVIDADE DE N-ACETILGALACTOSAMINILTRANSFERASE

(57) *Resumo:*





DESCRIÇÃO

"Teste de proximidade por cintilação, para a actividade de N-acetilgalactosaminiltransferase"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se ao campo dos testes de proximidade por cintilação, concebidos para testar a presença de UDP-GalNAc:polipéptido, N-acetilgalactosaminiltransferase, também conhecida como GalNAc-transferase.

DESCRIÇÃO INFORMATIVA

Elhammer, Å.P., Poorman, R.A., Brown, E., Maggiora, L.L. Hoogerheide, J.G. e Kezdy, F.J. (1993) *J. Biol. Chem* **268**, 10029-10038. Elucidação dos requisitos do aceitador da enzima e construção de péptidos aceptadores.

Homa, F.L., Hollander, T. Lehman, D.J., Thomsen, D. e Elhammer, Å.P. (1993) *J. Biol. Chem* **268**, 12609-12616. Descreve a clonagem da GalNAc-transferase, a enzima utilizada no teste.

Homa, F.L., Baker, C.A., Thomsen, D.R. e Elhammer, Å.P. (1993) *Prot. Expr. Purif.* **no prelo**. Descreve a conversão da molécula clonada, de comprimento total, numa enzima solúvel, e a expressão e purificação da molécula (solúvel).

J.H. Bertoglio-Matte, **US 4,568,649**, concedida em 4 de Fev. de 1986, "Immediate Ligand Detection Assay". Descreve um teste baseado em SPA, para a detecção da presença de quantidades diminutas de um reagente orgânico, numa amostra de teste.

O'Connel, B.C., Hagen F.K. e Tabak, L.A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 25010-25018. Discute a especificidade do aceitador de GalNAc-transferase utilizando péptidos sintéticos.

Wang, Y., Agrawal, N., Eckhardt, A.E., Stevens, R.D. e



Hill, R.L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22979-22983. Discute a especificidade do aceitador da GalNAc-transferase utilizando péptidos sintéticos.

Young, J.D., Tsuchiya, D. Sandlin, D.E. e Holroyde, M.J. (1979) *Biochem.* **18**, 4444-4448. O artigo original que discute a especificidade do aceitador de GalNAc-transferase utilizando péptidos sintéticos.

Hagopian, A. e Eylar, E.H. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 422-433. Informação sobre antecedentes da utilização de aceptadores sintéticos (neste caso uma mucina modificada), para testar a actividade da GalNAc-transferase.

Hagopian, A. Westall, F.C., Whitehead, J.S. e Eylar, E.H. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 2519-2523. Informação sobre antecedentes da utilização de aceptadores sintéticos (neste caso uma mucina modificada) para testar a actividade da GalNAc-transferase.

Sadler, J.E. (1984) in *Biology of Carbohydrates* (Ginsburg, V., & Robbins, P.W., Eds.) 2, 199-213, John Wiley & Sons, Nova Iorque. Revisão compreensiva da glicosilação ligada a O.

Schachter, H. e Brockhausen, I. (1992) in *Glycoconjugates* (Allen, H.J. & Kisailu, E.C., Eds.) pp. 263-232, Marcel Dekker, Inc. Nova Iorque. Revisão compreensiva da glicosilação ligada a O.

ANTECEDENTES

Foram descritos oligossacáridos ligados por ligação glicosídica a O, do tipo mucina, numa variedade de moléculas de proteína (Sadler, 1984). Estas estruturas constituem componentes essenciais numa variedade, igualmente vasta, de funções biológicas (e.g., Paulson, 1989, Jentoft, 1990 e suas referências). A reacção inicial na biossíntese de oligossacáridos ligados a O consiste na transferência da

N-acetilgalactosamina do açúcar nucleotídico, UDP-N-acetilgalactosamina, para um resíduo serina ou treonina no polipéptido aceitador. Esta reacção, que pode ocorrer após a tradução, é catalisada por uma enzima GalNAc-transferase (GalNacT), designada por UDP-GalNAc:polipéptido, N-acetilgalactosaminiltransferase. Esta é uma enzima ligada à membrana intracelular, que se pensa estar localizada na via secretora.

A(s) localização(ões) exacta(s) das GalNAc-transferases em sistemas *in vivo* não é conhecida com precisão. Foi referido que a adição inicial de N-acetilgalactosamina à proteína aceitadora pode ocorrer precocemente (mesmo simultaneamente com a tradução) no retículo endoplasmático rugoso (RE). Outros autores sugeriram que esta reacção é um acontecimento após a tradução, que ocorre em compartimentos do RE tardios e/ou na região cis do complexo de Golgi (e.g. Hanover et al. (1982) *J. Biol. Chem* **257**:10172-10177; Roth (1984) *J. Cell Biol.* **98**:399-406; Elhammer e Kornfeld (1984) *J. Cell Biol.* **98**:327-331; Tooze et al. (1988) *J. Cell Biol.* **106**:1475-1487; Deschuyteneer et al. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:2452-2459; Ulmer e Palade (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**:663-667; Wertz et al. (1989) *J. Virol.* **63**:4767-4776; Piller et al. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**:123-135; Piller et al. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:9264-9271.

Também foram apresentadas evidências de um modelo em que a transferência de N-acetilgalactosamina para Ser/Thr pode ocorrer em vários compartimentos na via secretora, incluindo compartimentos mais tardios que o complexo de Golgi (Schachter e Brockhausen (1992) *in Glycoconjugates*, Allen e Kisailus, eds. pp. 263-332, Marcel Dekker Inc., Nova Iorque). A elongação e terminação de oligossacáridos ligados a O é realizada por adição sequencial de monossacáridos individuais por transferases específicas (Roseman (1970) *Chem. Phys. Lipids* **5**:270-280); os dados actuais sugerem que estas reacções se localizam essencialmente no aparelho de Golgi (Schachter e Brockhausen, *supra*).

A síntese mediada por enzimas, de oligossacáridos ligados por ligação glicosídica a O oferece vantagens significativas, em relação às vias de síntese orgânica clássicas, produzindo níveis de hidratos de carbono muito elevados (e.g., oligossacáridos e/ou polissacáridos), sob condições suaves, em soluções aquosas e sem produzir quantidades consideráveis de produtos secundários indesejáveis. No entanto, um pré-requisito absoluto para este tipo de síntese é a disponibilidade de glicosiltransferases clonadas.

As enzimas endógenas podem ser isoladas a partir da maioria das fontes eucarióticas; no entanto, estas proteínas apenas são encontradas em concentrações baixas, e **portanto** isto constitui geralmente um processo difícil, demorado, rendendo quantidades de enzimas purificadas que são insuficientes para um trabalho de síntese *in vitro*. Outra complicação é a de as enzimas endógenas estarem invariavelmente ligadas à membrana, o que complica a purificação e a utilidade da enzima *in vitro*. Uma enzima clonada, por outro lado, pode ser normalmente expressa na forma de enzima solúvel, com uma facilidade comparável.

Tendo em conta o valor considerável dos hidratos de carbono, há uma grande necessidade de testes rápidos e fáceis para a GalNAc-transferase.

Os testes à actividade de GalNAc-transferase envolvem tipicamente a incubação da preparação que contém a actividade com UDP-GalNAc marcado radioactivamente e, ou uma proteína aceitadora intacta (e.g. a proteína mielina básica), ou um fragmento(s) de uma proteína desglicosilada (e.g. várias apomucinas) ou um péptido sintético (e.g. Hagopian et al., 1971; Hagopian e Eylar, 1968; Young et al., 1979; Wang et al., 1992; Elhammer et al., 1993, EP-A-0 387 875). Os requisitos do aceitador (sequência) da enzima foram recentemente elucidados numa extensão considerável e a síntese de péptidos aceptadores eficientes pode ser realizada de forma relativamente rápida (O'Connel et al., 1992; Wang et al., 1993; Elhammer et al., 1993). Após a transferência do açúcar radioactivo para o



aceitador polipeptídico, o produto é isolado e a quantidade de transferência enzimática é quantificada medindo a quantidade de radioactividade incorporada no aceitador. Assim, em princípio, os testes à actividade de GalNAC-transferase são comparativamente directos.

Um problema técnico considerável associado com estes testes é, no entanto, o isolamento do produto reaccional glicosilado. Para os aceitadores peptídicos, os métodos utilizados até agora incluem cromatografia em colunas de permuta iónica, de exclusão por tamanhos ou de fase inversa e, para os aceitadores proteicos, vários processos de precipitação (e.g. TCA). No primeiro caso, é necessário preparar, equilibrar e desenvolver várias colunas cromatográficas para cada experiência e, no último caso, é necessário realizar processos exaustivos de lavagem, de modo a reduzir a radioactividade do ruído de fundo. Deste modo, os testes típicos à GalNAC-transferase (utilizando qualquer dos aceitadores) são não só laboriosos, como demorados.

Descreve-se aqui uma nova abordagem para a quantificação dos produtos reaccionais em testes à GalNAC-transferase que utiliza menos passos, demora menos tempo e é muito mais adequado do que outros testes actualmente disponíveis, para pesquisar a presença de GalNAC-transferase.

SUMÁRIO DO INVENTO

O invento compreende um teste de proximidade por cintilação (SPA) para detectar actividade de GalNAC-transferase. As formas de concretização do teste incluem: contas de teste de proximidade por cintilação (SPA), para a quantificação da radioactividade incorporada; um receptor adequado que interage com um ligando adequado, produzido como resultado de uma reacção com a enzima, GalNAC-transferase; um receptor adequado que é uma conta de SPA revestida com lectina e o ligando é um péptido aceitador que não é conjugado; uma lectina seleccionada do grupo constituído por *Salvia sclarea*, *Helix pomatia* ou *Vicia villosa*; um



receptor adequado que é uma conta de SPA revestida com anticorpo e o ligando é um péptido aceitador que não é conjugado; um anticorpo que reconhece o antígeno Tn; um receptor adequado que é uma conta de SPA revestida com anticorpo e o ligando é um péptido aceitador modificado, fundido com uma sequência peptídica antigénica; uma sequência peptídica antigénica que, ou é uma porção de MYC (e.g. AEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSC) ou FLAG (DYKDDDK); um receptor adequado que é uma conta de SPA revestida com avidina ou estreptavidina e o ligando é um péptido aceitador conjugado com biotina; um péptido aceitador conjugado com biotina, tendo uma sequência peptídica de pelo menos 3 aminoácidos, em que um dos três aminoácidos é um péptido aceitador que é Ser ou Thr; um péptido aceitador conjugado com biotina e a sequência peptídica pode ser descrita como tendo os aminoácidos R_{-1} a R_{11} , como apresentado

$R_{-1} - R_0 - R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5$ (ou PO) - $R_6 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} - R_{11}$

R_5 (ou PO) é o aminoácido aceitador e é Ser ou Thr;

R_4 e R_6 são independentes e são Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp;

e $R_{-1} - R_3$ e $R_7 - R_{11}$ são independentes e são, não aminoácidos ou qualquer um dos aminoácidos seguintes, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp; um péptido aceitador conjugado com biotina e a sequência peptídica pode ser descrita como tendo os aminoácidos R_1 a R_9 , como apresentado,

$R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5$ (ou PO) - $R_6 - R_7 - R_8 - R_9$

R_5 (ou PO) é o aminoácido aceitador e é Ser ou Thr;

R_4 e R_6 são independentes e são Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp;



e R_{-1} - R_3 e R_7 - R_9 são independentes e são, não aminoácidos ou qualquer um dos aminoácidos seguintes, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp; a sequência peptídica em que os péptidos são qualquer das sequências apresentadas no MAPA 1; em que os aminoácidos R_1 a R_9 , no péptido aceitador, são qualquer dos aminoácidos seguintes: Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp; em que os aminoácidos R_1 a R_9 são quaisquer dos aminoácidos seguintes; Ser, Thr, Pro, Ala ou Gly; ou em que as sequências peptídicas são quaisquer das seguintes, RTPPP, RSPPP, PASTSAPG ou PASSSAPG

DESCRIÇÃO SUMÁRIA DAS FIGURAS

FIGURA 1. Efeito da concentração de conjugado aceitador na formação do produto de reacção.

FIGURA 2. Efeito da concentração de contas de SPA na recuperação da radioactividade do produto de reacção.

FIGURA 3. Efeito da concentração de UDP-GalNAC na formação do produto de reacção.

FIGURA 4. Efeito do tempo de incubação na formação do produto de reacção.

FIGURA 5. Efeito da concentração de enzima na formação do produto de reacção.

DESCRIÇÃO ADICIONAL DO INVENTO E DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE CONCRETIZAÇÃO PREFERIDAS

Definições e Materiais

SPA designa o teste de proximidade por cintilação. Veja-se a patente US 4,568,649 concedida a 4 de Fev. de 1986 para uma descrição completa de um sistema de SPA. US 4,568,649 é aqui incorporada para referência. A GalNAC-transferase é UDP-GalNAC:polipéptido:N-acetilgalactosaminiltransferase.



$(M+H)^+$ é a massa do ião detectado por EM; isto é, igual à massa da molécula (M) mais a massa de um protão (H) e o protão adiciona também uma carga positiva (+).

K_m é a designada constante de Michaelis-Menten. O valor numérico da constante indica a concentração de substrato a metade da velocidade máxima de reacção ($V_{max}/2$).

DPM ou dpm designa desintegrações por minuto. H, h ou hr designa hora. HPLC designa cromatografia líquida de alta eficiência (ou pressão). TFA é ácido trifluoroacético. A abreviatura "mU" (miliUnidades) é uma medida da actividade enzimática, uma U equivale a 1 nmol de GalNAc transferido por minuto.

Os resíduos de aminoácido aqui referidos são enumerados a seguir, e podem ser designados quer pelas abreviaturas de três letras, quer de uma só letra, como se segue:

Alanina, Ala, A; Arginina, Arg, R; Asparagina, Asn, N; Ácido aspártico, Asp, D; Cisteína, Cys, C; Glutamina, Gln, Q; ácido glutâmico, Glu, E; Glicina, Gly, G; Histidina, His, H; Isoleucina, Ile, I; Leucina, Leu, L; Lisina, Lys, K; Metionina, Met, M; Fenilalanina, Phe, F; Prolina, Pro, P; Serina, Ser, S; Treonina, Thr, T; Triptofano, Trp, W; Tirosina, Tyr, Y; Valina, Val, V; ácido aspártico ou asparagina, Asx, B; ácido glutâmico ou glutamina, Glx, Z; qualquer aminoácido, Xaa, X.

Todos os aminoácidos têm um grupo carboxilo e um grupo amino. O grupo amino do aminoácido também é designado por "terminal-N" do aminoácido. O grupo carboxilo de um aminoácido também é designado por "terminal-C" do aminoácido. O "terminal-N" de um aminoácido pode formar uma ligação peptídica com um grupo carboxilo de outro composto. O grupo carboxilo que se combina com o "terminal-N" de um aminoácido pode ser o grupo carboxilo de outro aminoácido, ou pode ser de outra fonte. Se estão ligados vários aminoácidos a um

polipéptido, então o polipéptido terá um terminal-N "livre" (não conjugado) e um terminal-C "livre".

Sequências peptídicas. PPASTSAPG é Pro-Pro-Ala-Ser-Thr-Ser-Ala-Pro-Gly; PPA_dSS_dSAPG é Pro-Pro-Ala-D-Ser-Thr-D-Ser-Ala-Pro-Gly; PPASSSAPG é Pro-Pro-Ala-Ser-Ser-Ser-Ala-Pro-Gly; RTPPP é Arg-Thr-Pro-Pro-Pro; RSPPP é Arg-Ser-Pro-Pro-Pro.

Para os fins do presente invento, o "aceitador" pode ser qualquer sequência peptídica, livre ou conjugada, independente ou ligada a outro composto, que aceita a enzima UDP-GalNac.

O termo "péptido aceitador" refere-se a uma sequência peptídica, tal como PPASTSAPG ou às sequências descritas em Elhammer, Å.P., Poorman, R.A., Brown, E. Maggiora, L.L. Hoogerheide, J.G. e Kezdy, F.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10029-10038, aqui incorporado para referência, ou a qualquer sequência peptídica que aceita a enzima UDP-GalNac transferase.

O termo "conjugado aceitador" refere-se a um péptido aceitador por si só, no papel de um conjugado aceitador, ou mais vulgarmente, refere-se a um péptido aceitador, como o PPASTSAPG que é conjugado com uma molécula, como a biotina, que tem uma afinidade elevada para um composto ligado a, ou parte, das contas de SPA, tal como a avidina ou estreptavidina. Veja-se, US 4,568,649 para uma descrição mais completa de conjugados aceptadores possíveis. Os termos "conjugado-biotina aceitador" referem-se a um conjugado aceitador em que a biotina foi conjugada com o péptido aceitador. Os termos "conjugado-biotina-alanina aceitador" referem-se a um péptido aceitador conjugado com biotina através de alanina, em que um exemplo é biotina- $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -PPASTSAPG. A alanina actua como um espaçador para colocar o péptido a uma distância adequada da biotina. O espaçador não é essencial, mas parece melhorar a reactividade. Qualquer espaçador adequado deverá ter efeitos semelhantes.

Materiais de partida

A UDP-N-[1-³H]-acetilgalactosamina (8,3 Ci/mmol) e as contas de SPA podem ser adquiridas da Amersham Corp. of Amersham Place, Little Chalfont, Inglaterra. A UDP-N-acetilgalactosamina pode ser adquirida da Sigma Chemical Corp. As colunas C₁₈ Bond Elut de um cc podem ser adquiridas da Varian. As placas de microtítulo White Microfluor com poços de fundo redondo podem ser adquiridas da Dynatech Laboratories. A GalNAc-transferase solúvel recombinante, purificada, pode ser preparada como descrito por Homa et al. (1994) *Prot. Expr. Purif.* no prelo, aqui incorporada para referência.

Todos os outros reagentes são obtidos de fontes convencionais. As fontes proporcionadas nas descrições seguintes representam apenas uma fonte possível entre muitas das que serão conhecidas do perito na arte.

A síntese de péptidos em fase sólida (Barany & Merrifield, 1979) é realizada numa escala de 0,5 mmol, utilizando uma resina Pam OCH₂, disponível da Applied Biosystems Inc., Foster City, Califórnia, num sintetizador de péptidos 430A da Applied Biosystems Inc.

A beta-alanina pode ser obtida da Advanced Chemtech, Louisville, Kentucky. Podem-se obter outros aminoácidos da Applied Biosystems Inc.

A biotina na forma de N-hidroxisuccinimida-biotina está disponível na Pierce Chemical Co.

Utilidade do invento

O presente invento proporciona um método para testar a actividade de GalNAc-transferase. O teste é realizado de forma adequada em placas de microtítulo de 96 poços. O teste é adequado para pesquisar em grandes volumes compostos que afectam a actividade da GalNAc-transferase. O teste pode ser feito e utilizado na forma de um estojo.



Descrição pormenorizada do invento

O presente invento compreende um aceitador ou conjugado aceitador, contas de SPA e a quantificação da radioactividade incorporada. Uma forma de concretização compreende um péptido aceitador biotinilado, contas de SPA revestidas com estreptavidina e a quantificação da radioactividade incorporada, num contador de cintilação em microplacas. O teste é idealmente adequado para experiências que envolvem pesquisas de grandes séries de compostos que afectam a actividade da UDP-GalNAC:polipéptido, N-acetilgalactosaminiltransferase (GalNAC-transferase).

O teste aqui descrito proporciona um meio rápido, simples e reprodutível para medir a actividade de GalNAC-transferase. Podem-se processar com facilidade grandes números de amostras, utilizando a enzima recombinante, e obtêm-se facilmente razões sinal-ruído excelentes. A disponibilidade deste teste deverá facilitar grandemente as pesquisas de inibidores específicos da GalNAC-transferase.

Descrevem-se algumas formas de concretização do presente invento:

Há quatro versões diferentes, mas relacionadas, do presente invento. Estas versões diferentes foram designadas de A a D. Todas as versões utilizam contas de SPA com receptores adequados, que interagem com ligandos produzidos como resultado de uma reacção com a enzima, GalNAC-transferase.

A versão A envolve a utilização de um péptido aceitador que não é conjugado, e o isolamento e quantificação do produto reaccional, em contas de SPA revestidas com lectina. Após a transferência de ^3H -GalNAC, catalisada por GalNAC-transferase, de UDP- ^3H -GalNAC para o aceitador, o produto glicosilado é adsorvido em contas de SPA revestidas com uma lectina específica da GalNAC. Isto irá fazer com que o açúcar radioactivo no produto da reacção fique suficientemente



próximo do cintilador nas contas de SPA, de modo que induz um sinal que pode ser quantificado num dispositivo de detecção de cintilação. Exemplos de lectinas que se ligam especificamente a GalNAc e que podem ser utilizadas para este tipo de teste são: *Salvia Sclarea*, *Helix Pomatia* e *Vicia Villosa*. Uma vez que é provável que as lectinas utilizadas para o isolamento do produto de reacção também tenham alguma afinidade para o açúcar nucleotídico radioactivo neste teste, este tipo de teste será provavelmente aplicável principalmente a testes que utilizam aceptadores com múltiplos locais.

A versão B envolve a utilização de um péptido aceitador não conjugado e o isolamento e quantificação do produto de reacção por contas de SPA revestidas com anticorpo. Após a transferência de ^3H -GalNAc, catalisada por GalNAc-transferase, do UDP- ^3H GalNAc para o aceitador, o produto glicosilado é adsorvido nas contas de SPA revestidas com um anticorpo específico para GalNAc. O GalNAc conjugado por meio de uma ligação O-glicosídica a um segmento peptídico é um antigénio do cancro bem documentado, o designado antigénio Tn, em humanos; estão comercialmente disponíveis anticorpos que reconhecem especificamente esta estrutura. A detecção e quantificação do produto produzido neste tipo de teste segue o mesmo princípio que na versão A.

A versão C envolve a utilização de um péptido aceitador modificado, em que a sequência do aceitador de GalNAc-transferase é fundida com uma sequência peptídica antigénica. Algumas destas sequências (antigénicas) e os seus anticorpos correspondentes estão descritos na literatura e alguns destes, e.g. porções de MYC (e.g. AEEQKLISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSC) e FLAG (DYKDDDK), estão comercialmente disponíveis. Assim, neste tipo de teste, o produto reaccional é adsorvido nas contas de SPA revestidas com um anticorpo que reconhece especificamente a sequência antigénica fundida com o aceitador. A detecção e quantificação do produto produzido neste tipo de teste segue o mesmo princípio que na versão A.

A versão D envolve a utilização de péptidos aceitadores conjugados com biotina e contas de SPA revestidas com avidina ou estreptavidina. A seguir são fornecidos exemplos específicos e pormenores experimentais desta forma de concretização.

Numa forma de concretização de uma versão do tipo D do invento, conjuga-se um péptido aceitador previamente descrito (Elhammer et al (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 10029-10038), PPASTSAPG, com biotina, através de três resíduos β -alanina. Obtém-se um conjugado aceitador que, em testes convencionais, tem um K_m comparável com o do péptido não conjugado e que pode ser adsorvido em avidina ou estreptavidina. Os testes de actividade que utilizam este péptido em combinação com UDP-GalNAc marcado com 3H (substrato dador) e contas de SPA revestidas com avidina resultam em níveis de radioactividade incorporada 10 vezes maiores do que o ruído de fundo.

Uma análise da dependência, em relação ao tempo, da reacção enzimática (utilizando o péptido aceitador biotinilado) origina um K_m de $0,38 \pm 0,12 \mu M$ para o UDP-GalNAc. Utilizando, por exemplo, 4 mg de contas de SPA, uma concentração de aceitador de $17 \mu M$, uma concentração de açúcar nucleotídico de aproximadamente $0,5 \mu M$ e uma concentração de enzima de aproximadamente 7,5 U/ml, o teste demonstra uma formação aproximadamente linear de produto, durante pelo menos 60 minutos.

O teste é muito convenientemente realizado em placas de microtítulo de 96 poços. É especialmente adequado para pesquisar grandes volumes, para compostos que afectam a actividade de GalNAc-transferase.

Síntese do péptido aceitador biotinilado

A síntese de péptidos em fase sólida (Barany & Merrifield, 1979) é realizada numa escala de 0,5 mmol utilizando uma resina Pam OCH_2 , disponível da Applied



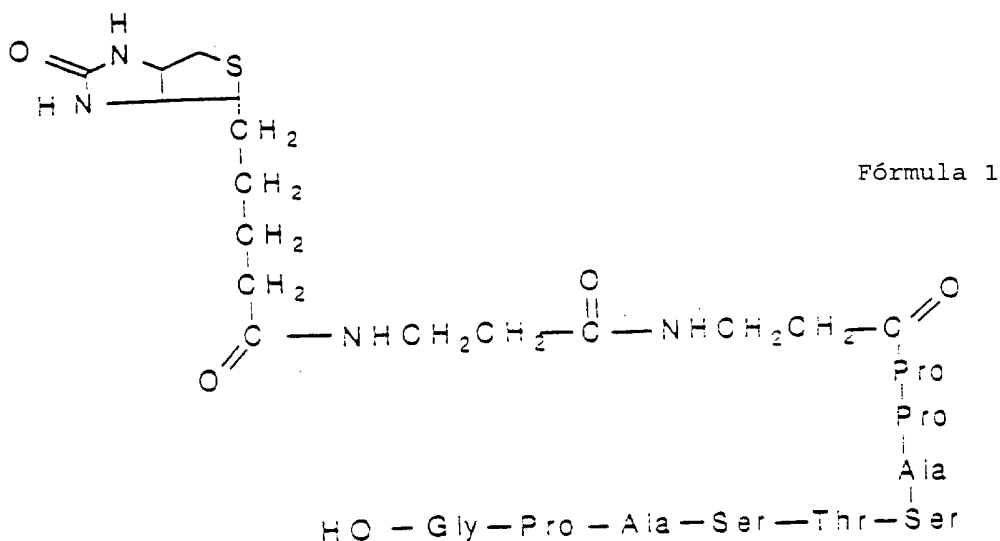
Biosystems Inc., Foster City, California, num sintetizador de péptidos 430A da Applied Biosystems Inc.

O grupo t-butiloxicarbonilo (BOC) é utilizado como grupo protector de N-amino durante a síntese por passos. As cadeias laterais de aminoácidos trifuncionais são protegidas com Ser(Bzl) e Thr(Bzl). Cada resíduo é acoplado duas vezes, em seguida "tapado" ("capped") com anidrido de ácido acético antes do ciclo de síntese seguinte. Realizam-se testes quantitativos à ninidrina em cada ciclo de síntese.

Após remoção do grupo Boc N-terminal do modo usual, a biotina é ligada por tratamento da resina peptídica em DMF com N-hidroxissuccinimida-biotina, disponível de Pierce Chemical Co. O péptido-biotina é clivado da resina por tratamento com HF/anisolo (10:1) durante 1 hora de -20 a -5°C. A resina peptídica é titulada com éter, o péptido bruto é dissolvido em ácido acético a 50% e a resina é removida por filtração. O filtrado é evaporado até à secura sob pressão reduzida e liofilizado a partir de ácido acético glacial.

O péptido bruto, no filtrado liofilizado seco, é purificado por cromatografia preparativa de fase inversa numa coluna Vydac C-18 (250 x 22,5 mm), utilizando um gradiente de água/acetonitrilo, em que cada fase contém 0,1% de TFA. As fracções homogéneas, tal como determinado por HPLC analítico, são reunidas e o acetonitrilo é evaporado sob pressão reduzida; uma solução aquosa das fracções reunidas é liofilizada. O péptido purificado é caracterizado pelo tempo de espectroscopia de massa rápida ("flight") que deverá originar o (M+H)+ previsto.

(Segue Fórmula 1)



A fórmula 1 mostra a sequência peptídica, PPASTSAPG, acoplada a biotina.

Há várias sequências peptídicas que são adequadas para este teste. Algumas sequências estão descritas em Elhammer et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 10029-10038, incorporada para referência. As sequências preferidas têm nove aminoácidos de comprimento, embora também sejam aceitáveis outros comprimentos. A enzima consegue reconhecer um mínimo de 3 aminoácidos. Cinco aminoácidos ou menos, são menos eficientes do que mais de cinco aminoácidos. Oito aminoácidos deverão funcionar bem. Preferem-se nove aminoácidos. A enzima parece reconhecer 4 aminoácidos em cada um dos lados do aminoácido aceitador. Os péptidos que contêm dez, onze, doze ou mais aminoácidos, deverão todos eles funcionar bem.

As sequências no MAPA I são retiradas da publicação de Elhammer, *id*, todas as sequências peptídicas no MAPA I deverão funcionar com o teste aqui descrito. O MAPA I mostra 196 segmentos de péptidos glicosilados. Os péptidos glicosilados são listados como segmentos de eneapéptido (*ennea*, grego: nove) com a Ser ou Thr reactiva na posição central, designada por PO ou por R₅. Deste modo, as cadeias laterais de

aminoácidos em direcção ao terminal NH_2 são designadas como os sublocais R_1 a R_4 e as que estão em direcção ao terminal COOH , como sublocais R_6 a R_9 , como é apresentado a seguir.

(os aminoácidos aceitadores são Ser ou Thr)

(lado do terminal NH_2)



(lado do terminal COOH)

$R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5$ (ou PO) - $R_6 - R_7 - R_8 - R_9$

Um ponto de partida preferido consiste em nove resíduos, com a opção de, dependendo dos resultados da selectividade dos sub-locais, o péptido poder ser alongado, ou truncado. As sequências no MAPA I mostram que além da necessidade óbvia de Ser ou Thr na posição PO (ou R_5), nenhum outro sub-local tem necessidade absoluta de qualquer aminoácido em particular.

Os aminoácidos seguintes são todos adequados para as posições R_{1-4} e R_{6-9} ; Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys, Trp.

Como a enzima não é altamente específica, muitas sequências irão funcionar. Na publicação de Elhammer, *id*, estão também descritas sequências de aminoácidos alternativas. O aminoácido aceitador é rodeado preferencialmente por resíduos de Ser, Thr, Pro, Ala, e Gly, mas em nenhuma ordem específica. Tanto a serina, como a treonina, são aminoácidos aceitadores. Um substrato de glicosilação ideal poderia consistir do resíduo reactivo, rodeado, em ambos os lados por resíduos de Ser, Thr, Pro, Ala e Gly, sem qualquer ordem específica. A capacidade de ligação ao hidrogénio do esqueleto do péptido deverá provavelmente permanecer intacta, mas as cadeias laterais poderão variar dentro de grandes limites, sem efeitos prejudiciais significativos.

Os aminoácidos Gly, Ala, Val e Met podem ocorrer ao acaso. Talvez mais importante seja o facto de o Asp, Asn, Arg,



Tyr, Leu, Phe, Lys, Cys e Trp ocorrerem apenas com frequências muito baixas e poderem diminuir a probabilidade de glicosilação.

Sintetizaram-se os péptidos aceitadores seguintes: RTPPP, RSPPP, PPASTSAPG, PPASSSAPG e PPAAdSTdSAPG. O péptido aceitador preferido é o PPASTSAPG. Note-se que o péptido RTPPP tem uma eficiência catalítica que é de apenas metade da do PPASTSAPG. Podem-se encontrar outras discussões sobre as eficiências do aceitador em Elhammer et al. (1993) *J. Biol. Chem*, 268, 10029-10038.

Contas de SPA revestidas com estreptavidina

Devido à capacidade limitada das contas de SPA revestidas com estreptavidina utilizadas, 115 pmol/mg (o lote médio é de 110-120 pmol/mg), foi necessário utilizar concentrações de aceitador, nos ensaios, muito abaixo da saturação.

A concentração óptima de aceitador para testes que utilizam 4 mg de contas de SPA, a quantidade máxima utilizável em placas de 96 poços, é apresentada na FIGURA 1. A incorporação máxima de radioactividade, a partir do açúcar nucleotídico, no conjugado de péptido aceitador, ocorre quando a concentração do conjugado aceitador é de aproximadamente 17 μ M. Este nível máximo de incorporação de radioactividade indica que é difícil detectar níveis baixos de actividade enzimática utilizando este método de teste. São necessários níveis comparativamente elevados de actividade enzimática para uma detecção positiva. Tipicamente, utilizam-se 300 mU/teste. Note-se que há outros testes mais convencionais que detectam facilmente 1 mU de actividade enzimática; no entanto, há outros testes convencionais que não podem ser utilizados de forma conveniente para fins de pesquisa.

A FIGURA 1 mostra o máximo na curva de incorporação (incorporação de GalNAC radioactivo a partir do açúcar nucleotídico, no péptido aceitador conjugado) que reflecte provavelmente a saturação das contas de SPA. Seria de esperar

um aumento linear na incorporação de radioactividade até à saturação do aceitador, no caso de a saturação das contas de SPA não ter ocorrido.

A FIGURA 2 mostra os resultados quando se adicionam no ensaio diferentes quantidades de contas de SPA. A FIGURA 2 mostra a diminuição da quantidade de contas de SPA nos resultados do teste numa redução linear da radioactividade detectada, i.e. a quantidade de contas de SPA adicionadas é claramente limitante da quantidade de produto radioactivo detectável pelo teste. No entanto, a uma concentração de aceitador de 17 μM e utilizando 4 mg de contas de SPA, o teste mostra uma dependência da concentração limitante de dador, do tipo de Michaelis-Menten típico.

Esta dependência da concentração limitante de dador, do tipo Michaelis-Menten típico é apresentada na FIGURA 3. Na FIGURA 3, as condições do teste são as mesmas que se descrevem na FIGURA 1. Os dados da tabela abaixo (TABELA 1), retirados da FIGURA 3, indicam que o K_m para UDP-GalNac é calculado como sendo $K_m \sim 0,8 \mu\text{M}$.

A FIGURA 4 mostra a dependência, em relação ao tempo, mais uma vez, um comportamento do tipo Michaelis-Menten integrado, típico, é indicado pela forma grandemente linear da curva de produto versus tempo, para a maior parte da duração da reacção. Utilizando a forma integrada da equação de Michaelis-Menten e um método de ajustamento pelos mínimos quadrados, não linear, calculou-se $K_m = 0,38 \pm 0,12 \mu\text{M}$ para UDP-GalNac nas condições experimentais utilizadas. A concordância entre os dados experimentais e a curva teórica baseada nos melhores parâmetros de ajustamento da equação de Michaelis-Menten, indica que a reacção não é complicada por inibição do substrato, ou decomposição da enzima. A ligeira curvatura da reacção durante os primeiros 60 minutos mostra que a quantidade de enzima utilizada neste teste é muito provavelmente um limite superior, em que ainda se obtém uma linearidade entre a velocidade do teste e a concentração de

enzima.

A FIGURA 4 mostra os resultados de outro aspecto deste teste, a quantidade de enzima utilizada neste teste. A adição de quantidades crescentes de enzima resulta num aumento linear na formação de produto, até aproximadamente 600 mU. Os nossos testes típicos utilizam aproximadamente 300 mU de enzima.

Os testes convencionais para a avaliação do péptido aceitador biotinilado foram realizados de modo a fazer as comparações com o teste SPA. Estes testes foram realizados como descrito por Homa et al. (1994). Pode-se utilizar uma coluna Bond Elut de um cc para isolar o produto de reacção. Veja-se Homa, F.L., Baker, C.A., Thomsen, D.R. e Elhammer, Å.P. (1994) *Prot. Expr. Purif. no prelo*, aqui incorporado para referência. O teste baseado em SPA é realizado em placas de microtítulo de 96 poços.

O perito na arte conseguirá pôr em prática o invento sem mais instruções. Os exemplos seguintes são fornecidos para fins ilustrativos e não limitam o invento.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1. Reacção típica. As misturas reaccionais irão variar dependendo da experiência específica. Vejam-se as figuras e tabelas para as concentrações específicas dos vários componentes. Um mistura reaccional típica contém os seguintes componentes num volume final de 40 µl: 2 µmol de imidazolo, pH 7,2, 0,4 µmol de MnCl₂, 19,2 pmol (135 000 cpm) de UDP-[³H]-GalNAc, 0,7 nmol de péptido aceitador (biotina-βAβAβA-PPASTSAPG) e aproximadamente 300 mU de enzima.

A reacção é incubada a 37°C durante 30 minutos, em seguida a reacção é neutralizada pela adição de 10 µl de EDTA 0,5 M. Adicionam-se cem microlitros de uma suspensão a 40 mg/ml de contas de SPA com estreptavidina em PBS, contendo 20% de glicerol, a cada mistura reaccional (poço na placa de

microtítulo) e a placa é incubada à temperatura ambiente num agitador orbital, durante 2 horas, antes de se contar a radioactividade incorporada num contador de cintilação em microplacas.

Os testes que contêm este péptido, em concentrações até à saturação (e utilizando colunas de fase inversa para o isolamento do produto de reacção) demonstram que o K_m para este aceitador é semelhante ao K_m previamente determinado para o péptido não biotinilado, 1,7 mM vs 6,5 mM (Elhammer et al., 1993). Assim, a adição de biotina ao terminal-NH₂ de PPASTSAPG não afecta de forma adversa a eficácia deste aceitador. De facto, o K_m ligeiramente inferior (vs péptido não biotinilado) indica que a biotinilação pode melhorar a eficácia do aceitador.

EXEMPLO 2. FIGURA 1. Efeito da concentração de conjugado aceitador na formação de produto de reacção. Os testes foram realizados numa placa de microtítulo de 96 poços e continham 2 μ mol de imidazolo, pH 7,2, 0,4 μ mol de MnCl₂, 19,2 pmol de UDP-³H-GalNac, aproximadamente 300 mU de enzima e 0 a 30 μ mol de péptido aceitador, num volume total de 40 μ l. Após a incubação durante 1 hora a 37°C, a reacção foi parada por adição de 10 μ l de EDTA 0,5 M. Adicionaram-se cem μ l de uma suspensão a 40 mg/ml de contas de SPA com estreptavidina e, após incubação durante duas horas à temperatura ambiente, a radioactividade nos poços foi contada num contador de cintilações Top Count. Veja-se FIGURA 1 para os resultados. A linha diagonal a cheio, na FIGURA 1, à esquerda da linha vertical, é um ajuste linear pelos mínimos quadrados aos dados obtidos quando a concentração de péptido aceitador era 13 μ M e inferior. A linha horizontal a cheio foi obtida calculando o DPM médio, quando a concentração de péptido aceitador era 17 μ M ou superior.

EXEMPLO 3. FIGURA 2 Efeito da concentração de contas de SPA na recuperação da radioactividade do produto de reacção. As condições teste eram as descritas para o EXEMPLO 2. A

concentração de conjugado aceitador era de 17 μM e a quantidade de contas de SPA adicionadas ao teste variou de 0 a 100 μl (4 mg). A linha a cheio é um ajuste linear aos dados, pelos mínimos quadrados.

EXEMPLO 4. FIGURA 3 Efeito da concentração de UDP-GalNac na formação do produto de reacção. As condições teste são as mesmas que as descritas para o EXEMPLO 2. A concentração de conjugado aceitador era 17 μM . A quantidade de UDP- ^3H -GalNac varia de 0 a 28,8 pmol. A curva a cheio é um ajuste não linear pelos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten, em que $V_{\text{max}} = 37,8 \pm 4,6 \times 10^3 \text{ DPM/h}$ e $K_m = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$

EXEMPLO 5. FIGURA 4. Efeito do tempo de incubação na formação do produto de reacção. As condições de teste são as mesmas que as descritas no EXEMPLO 2; a concentração de conjugado aceitador era 17 μM . O tempo de incubação variou de 0-8 horas. A curva a cheio representa um ajustamento não linear pelos mínimos quadrados, a uma forma integrada da equação de Michaelis-Menten, em que se verificou que o K_m para GalNac era de $0,38 \pm 0,12 \mu\text{M}$.

EXEMPLO 6. FIGURA 5. Efeito da concentração de enzima na formação do produto de reacção. As condições de teste eram as mesmas que se descreveram no EXEMPLO 2. A concentração de conjugado aceitador era de 17 μM . A concentração de enzima nos testes variou de 0-1500 mU. Veja-se FIGURA 5. A linha a cheio representa um ajustamento linear aos dados, pelos mínimos quadrados.

Segue-se o MAPA 1. O MAPA 1 mostra várias substituições de aminoácidos para sequências peptídicas possíveis para o péptido aceitador. O mapa mostra as posições correspondentes às posições R_{1-4} - (PO ou R_5) - R_{6-9} . A posição R_5 (ou PO) é sempre Ser ou Thr.

MAPA I

PPTP-S-PSTP	TTSI-T-SDPK	PSFN-T-PSTR	GPVV-T-AQYE
TPSP-S-TPPT	ESPS-T-SEAL	-S-T-GS-	AVTG-S-EPGL
TPPP-T-SGPT	VAVP-T-TSA-	LVST-S-EPLS	DVNC-S-GPTP
VTPR-T-PPPS	TTTS-S-SVSK	-S-T-TAVQ	SLGP-S-KETH
CPVP-S-TPPT	QTPT-S-GEPL	LPGV-T-GTSA	PLAG-T-SDLS
APAR-S-PSPS	VPGG-S-ATPQ	PEAT-T-ESII	-Q-T-LATG
SPSP-S-TQPW	MHTT-T-LAEP	TTSS-S-VSKS	KSYI-S-SQTN
SGEP-T-STPT	GGTI-T-TNSP	TMHT-T-TLAE	-L-S-TTEV
PATW-T-VPPP	PGLP-S-TGVS	GEQG-S-ATPG	DPGM-S-GWPD
APPP-S-LPSP	PVTI-T-NPAT	VTGT-S-AVTG	ISSQ-T-NDTH
NSAP-T-SSST	KPSA-T-SPGV	KMYT-T-SITS	HQIS-S-KLPT
MHTT-T-SSSV	ASAS-T-TMHT	ATPG-S-TTGR	THGL-S-ATIA
TPHA-T-SHPA	GGSA-T-PQQP	STGV-S-GLPG	VSEI-S-VRTV
SSVP-T-AQPQ	PSLP-S-PSRL	GLPS-T-GVSG	SDLS-T-ITSA
PAPA-T-EPTV	ATAA-T-AATA	AQPL-T-ENPR	QVLL-S-NPTS
-SKP-T-CPPP	TPSP-S-CCHP	LAKA-T-TAPA	ALSE-S-TTQL
PGMA-S-ASTT	-T-ETPV	MLPF-T-PNSE	QGSA-T-PGNV
TVEP-T-PAPA	GVTG-T-SAVT	VPQE-T-PHAT	AHEV-S-EISV
AMHT-T-TSSS	TAPA-T-TRNT	TSDL-S-TITS	AWPL-S-LEPD
STIT-S-AATP	FTPN-S-ESPS	VTMA-T-GSLG	SEPL-S-SKMY
QTLA-T-GSPP	NPAT-S-SAVA	LPGP-S-DTPI	VSLE-T-SKGT
HTTT-S-SSVS	SEST-T-QLPG	ETPV-T-GEQG	NATV-T-AGKP
PPTP-S-PSCC	PVLP-T-QSAH	LPGS-T-	IIIP-T-INTI
ESII-T-STPE	WSTR-S-PNST	SSPL-S-TERM	-R-S-AGAG
ELAP-T-APPE	AQAS-S-VPTA	MYTT-S-ITSD	FVHV-S-ESFP
TSAA-T-PTFT	PHAT-S-HPAV	GTSA-T-VSLE	-RS-S-VPGG
HTS-T-PETP	LPSP-S-RLPG	IATG-S-PPLA	DSQQ-T-AR-
PLVS-T-SEPL	GPVP-T-PPDN	-LS-T-TEVA	AGAG-T-AGVD
-LA-T-PLPP	-PGG-S-SEPK	-STG-S-	AGFI-S-TEDP
PSPS-T-QPWE	-ST-T-AVQT	EQPL-T-ENPR	REYT-S-ARS-
VQTP-T-SGEP	AKAT-T-APAT	ISVR-T-VYPP	EPLS-S-KMYT
PGAL-S-ESTT	-MW-S-TRSP	LSTY-S-SLAT	VQKE-T-GVPE
LSTI-T-SAAT	TPTF-T-TEQD	TYAA-T-PRAH	EALS-T-YSSI
SESP-S-TSEA	VAMH-T-TTSS	SGVA-S-DPPV	NLPN-T-MTML
PNSE-S-PSTS	KAQA-S-SVPT	GLPG-S-T-	IKNT-T-AVVQ
GTIT-T-NSPE	STYS-S-LATV	PDAA-S-AAPL	-RFS-S-AGIP
SAST-T-MHTT	TAVQ-T-PTSG	ATEP-T-VDSV	KADS-T-GDQT
AVPT-T-SA-	STTV-S-LPHS	VSNA-T-VTAG	SKLP-T-QAGF
SPST-S-EALS	DSVV-T-PEAT	PHQI-S-SKLP	AGVD-S-QQTA
GIPA-T-PGTS	PGST-T-GR-	PNTM-T-MLPF	LFPG-S-SGVA
TSAV-T-GSEP	LSES-T-TQLP	-V-T-LSPK	YQEV-S-IKMS
DSSS-S-KAPP	TPGS-T-TGR-	SKMY-T-TSIT	-RF-S-SAGI
TNPA-T-SSAV	APAT-T-RNTG	EVRP-T-SAVA	REDP-S-GTMY
MASA-S-TTMH	GLSA-T-IATS	-LST-T-EVAM	EEEG-S-GGGQ
PSAT-S-PGVM	LPPS-T-SINE	DNTV-T-SKPL	YYNQ-S-EAGS
SSIA-T-VPVT	MATG-S-LGPS	SEAL-S-TYSS	RFQD-S-SSSK
ARSP-S-PSTQ	GFIS-T-EDPS	SIKM-S-SVPQ	PENF-S-FPDD
PATS-S-AVAS	-R-S-SVPG	-MWS-T-RSPN	GFNM-S-LLEN
EPLV-S-TSEP	TTMH-T-TTIA	GPVV-T-AQYE	NVYR-S-HLFF

84 912
EP 0 792 373/PT

23

Lisboa,

16. JUN. 2000

Por PHARMACIA & UPJOHN COMPANY

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Teste de proximidade por cintilação (SPA) para a detecção de actividade da enzima GalNAc-transferase, que compreende a utilização de um açúcar nucleotídico radioactivo e um péptido aceitador de GalNAc-transferase.

2. Teste de acordo com a reivindicação 1, que compreende a utilização de contas do teste de proximidade por cintilação (SPA) para a quantificação da radioactividade incorporada.

3. Teste de acordo com a reivindicação 2, que compreende a utilização de um receptor que interage com o péptido aceitador.

4. Teste de acordo com a reivindicação 3, em que o receptor é uma conta de SPA revestida com lectina e o péptido aceitador não é conjugado.

5. Teste de acordo com a reivindicação 4, em que a lectina é seleccionada de entre *Salvia sclarea*, *Helix pomatia* e *Vivia villosa*.

6. Teste de acordo com a reivindicação 3, em que o receptor é uma conta de SPA revestida com anticorpo e o péptido aceitador não é conjugado.

7. Teste de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo reconhece o antigénio Tn.

8. Teste de acordo com a reivindicação 3, em que o receptor é uma conta de SPA revestida com anticorpo e o péptido aceitador está fundido com uma sequência peptídica antigénica.

9. Teste de acordo com a reivindicação 8, em que a sequência peptídica de antigénio ou é uma porção de MYC (e.g. AEEQKLISEEDLLRKRRERQLKHKLEQLRNSC) ou FLAG (DYKKDDDK).



10. Teste de acordo com a reivindicação 3, em que o receptor é uma conta de SPA revestida com avidina ou estreptavidina e o péptido aceitador está conjugado com biotina.

11. Teste de acordo com a reivindicação 10, em que o péptido aceitador conjugado com biotina tem uma sequência peptídica de pelo menos 3 aminoácidos, dos quais um é Ser ou Thr.

12. Teste de acordo com a reivindicação 11, em que a sequência peptídica tem a fórmula

$$R_{-1} - R_0 - R_1 - R_2 - R_3 - R_4 - R_5 - R_6 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} - R_{11}$$

em que R_5 é Ser ou Thr;

R_4 e R_6 são independentes e são Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp; e

$R_{-1} - R_3$ e $R_7 - R_{11}$ são independentes e cada um está ausente, ou é qualquer um de entre, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, Cys ou Trp;

13. Teste de acordo com a reivindicação 12, em que R_{-1} , R_0 , R_{10} e R_{11} estão ausentes.

14. Teste de acordo com a reivindicação 13, em que $R_1 - R_3$ e $R_7 - R_9$ estão todos presentes.

15. Teste de acordo com a reivindicação 15, em que $R_1 - R_3$ e $R_7 - R_9$ são qualquer um de entre Ser, Thr, Pro, Ala ou Gly.

16. Teste de acordo com a reivindicação 13, em que a sequência peptídica é qualquer das sequências apresentadas no MAPA I.

17. Teste de acordo com a reivindicação 11, em que a sequência peptídica é RTPPP, RSPPP, PPASTSAPG ou PPASSSAPG.

18. Teste de acordo com a reivindicação 17, em que a sequência peptídica é PPASTSAPG.

19. Teste de acordo com a reivindicação 17, em que a sequência peptídica é PPASSSAPG.

Lisboa, 16. JUN. 2000

Por PHARMACIA & UPJOHN COMPANY

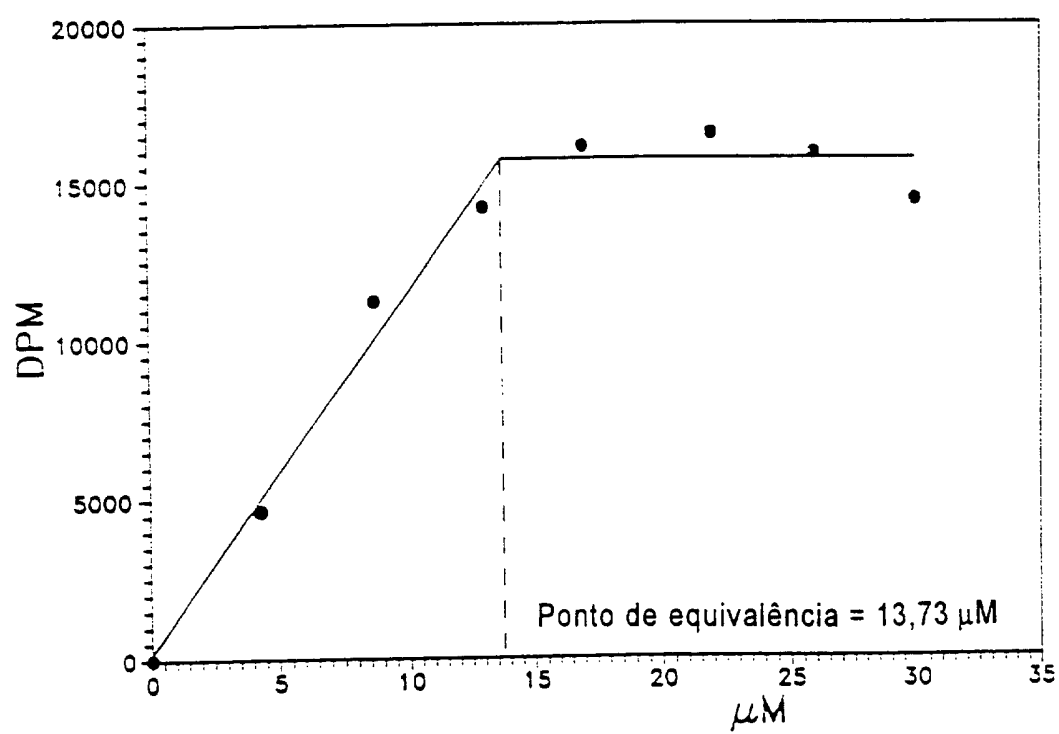
- O AGENTE OFICIAL -

○ ADJUNTO



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

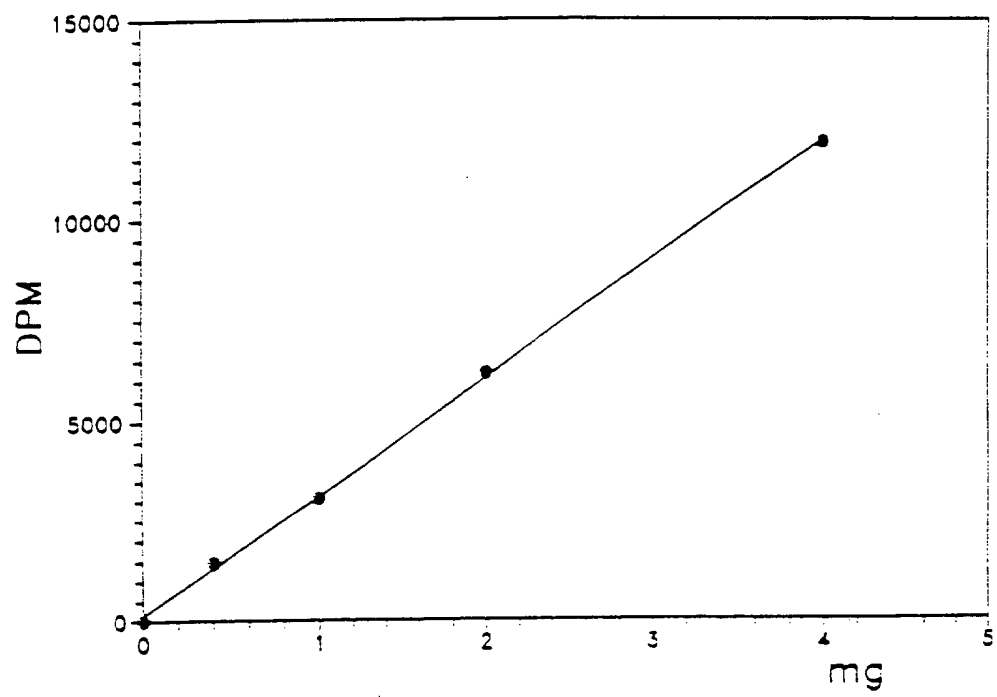
FIGURA 1



Handwritten signature

2/5

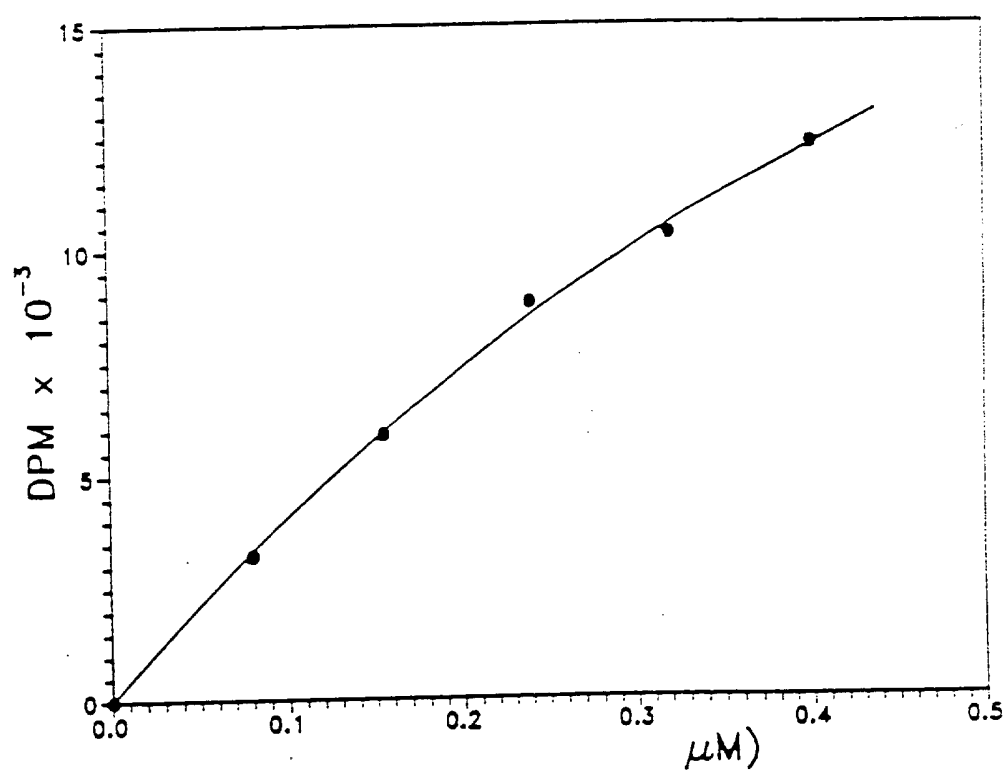
FIGURA 2



Handwritten signature

3/5

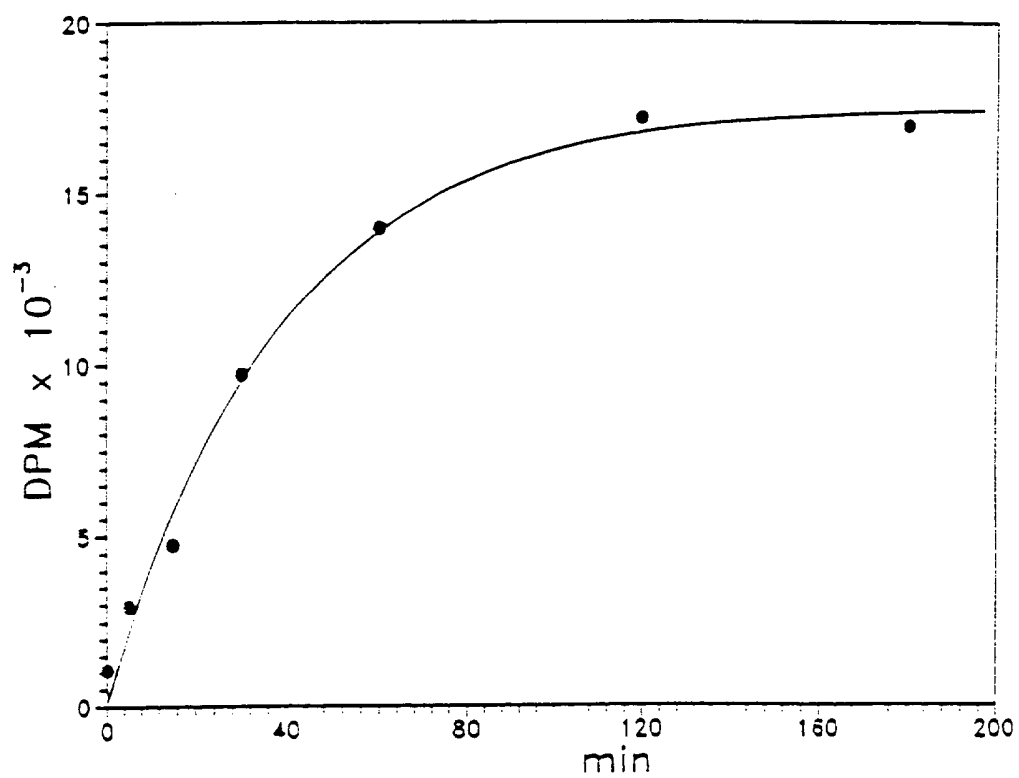
FIGURA 3



[Handwritten signature]

4/5

FIGURA 4



[Handwritten signature]

5/5

FIGURA 5

