

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98 398

REQUERENTE: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION,
norte-americana, com sede em 10666 North
Torrey Pines Road, La Jolla, California
92307, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de composições farma-
cêuticas, à base de homólogo de D₃₀, e de
detecção da quantidade de homólogo de D₃₀ em
amostras"

INVENTORES: Dario C. Altieri, Edward F. Plow e Thomas
S. Edgington

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

Estados Unidos da América, em 19 de Julho de 1990 sob
o n.º. 07/556 643



PATENTE N^o. 98 398

"Processo de preparação de composições farmacêuticas, à base de homólogo de D₃₀, e de detecção da quantidade de homólogo de D₃₀ em amostras"

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de uma composição farmacêutica, que compreende a dispersão de pelo menos 0,1 por cento em peso de um homólogo de D₃₀ substancialmente puro e farmacêuticamente aceitável, capaz de se ligar ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1 e de inibir a ligação de D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1, num excipiente farmacêuticamente aceitável. Estão também contemplados os processos de detecção em amostras da quantidade de homólogo de D₃₀ presente.

MEMÓRIA DESCRITIVACampo técnico

O presente invento contempla a utilização de um homólogo de D₃₀ para inibir a ligação do fibrinogénio ao receptor Mac-1 e a utilização de receptores Mac-1 e anticorpos contra complexos contendo homólogo de D₃₀ em sistemas de diagnóstico e processos de ensaio.

Antecedentes

As integrinas são um grupo funcionalmente e estruturalmente relacionado de receptores que interactivam com uma vasta variedade de ligandos incluindo glicoproteínas da matriz extra-celular, complemento, e outras células. As integrinas participam na adesão matriz-célula e célula-célula em muitos processos fisiologicamente importantes, incluindo o desenvolvimento embrionário, a hemostasia, a trombose, os mecanismos de defesa imunitários ou não imunitários na cicatrização de ferimentos e a transformação oncogénica. Ver Hynes, Cell., 48:549-554 (1987). A maioria das integrinas que participam na adesão celular dinâmica, ligam-se a um tripéptido, arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), presente no seu ligando, provocando a adesão celular. Ver Ruoslahti et al., Science, 238: 491-497 (1987).

O Mac-1 (CD11b/CD18) é um receptor integrina, predominantemente encontrado em macrófagos e granulócitos. Como todos os receptores integrina, o Mac-1 é uma glicoproteína transmembranar, heterodimérica, composta por sub-unidades alfa e beta não covalentemente associadas.

As cadeias alfa (α) e beta (β) do Mac-1 têm massas moleculares de 170.000 e 95.000 daltons, respectivamente, e a cadeia α do Mac-1 foi completamente sequenciada. Ver Corbi et al., J. Biol. Chem., 263:12403-12411 (1988). Para uma revisão sobre os receptores integrina, ver Hynes, Cell, 48:549-554 (1987).

O Mac-1 media a adesão neutrófilo/monócito ao endotélio vascular e a fagocitose de partículas de complemento opsonizado.

Os anticorpos para o receptor Mac-1 alteram a função neutrófila in vivo, incluindo a inibição da migração de neutrófilos para locais inflamatórios. Ver Price et al., J. Immunol., 139:4174-4177 (1987). O Mac-1 actua também como um receptor para o fibrinogénio numa reacção ligada à deposição de fibrina sobre a superfície do monócito. Ver Altieri et al., J. Cell Biol., 107:1893-1900 (1988); Wright et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7734-7738 (1988); Trezzini et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 156:477-484 (1988) e Gustafson et al., J. Cell Biol., 109:377-387 (1989).

O fibrinogénio é uma molécula complexa de aproximadamente 340.000 daltons e consiste em três pares de sub-unidades polipeptídicas, chamadas cadeias α , β e gama. Estas cadeias individuais mantêm-se unidas através de várias ligações dissulfureto. A digestão proteolítica do fibrinogénio pela plasmina produz fragmentos A, B, C, D e E, todos possuindo uma massa molecular inferior a 85.000 daltons. Ver Pizzo et al., J. Biol. Chem., 247:636-645 (1972).

A digestão proteolítica adicional do fibrinogénio pela plasmina produz um fragmento D₃₀ com uma massa molecular de cerca de 30.000 daltons contendo porções das cadeias α , β e gama do fibrinogénio. Ver Furlan et al., Biochim. Biophys. Acta., 400:95-111 (1975).

A deposição do fibrinogénio sobre a superfície de leucócitos ocorre numa variedade de respostas inflamatórias tais como hipersensibilidade tipo retardado, rejeição de transplantes incompatíveis e a fisiopatologia da obstrução vascular e aterogénese. Ver Geczy et al., J. Immunol., 130:2743-2749 (1983); Hooper et al., J. Immunol., 126:1052-1058 (1981); Colvin et al., J. Immunol., 114:377-387 (1975); Hattler et al., Cell Immunology, 9:289-295 (1973); Gerrity, R.G., Am. J. Pathol., 103:181-190 (1981) e Am. J. Pathol., 103:191-200 (1981); e Shelley et al., Nature, 270:343-344 (1977).

Recentemente, postulou-se que a interacção do fibrinogénio

com o receptor Mac-1 de leucócitos é uma reacção de adesão celular dinâmica envolvendo o reconhecimento do tripéptido RGD dentro do fibrinogénio pelo receptor Mac-1 similar à interacção do fibrinogénio com os receptores integrina nas plaquetas e nas células endoteliais. Ver Altieri et al., J. Clinic Invest., 78:968-976 (1986); Pytela et al., Science, 231:1559-1562 (1986) e Ruoslahti et al., Science, 238:491-497 (1987) e Cell, 44:517-518 (1986).

Breve descrição do invento

Verificou-se agora que o receptor Mac-1 liga o fibrinogénio num local dentro do fragmento D₃₀ do fibrinogénio e que o receptor Mac-1 não liga o fragmento D₃₀ por meio do tripéptido, RGD.

O presente invento contempla composições contendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um homólogo de D₃₀ capaz de se ligar ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1 e inibir a ligação do fibrinogénio ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1.

O presente invento contempla a utilização de um homólogo de D₃₀ para inibir a ligação mediada pelo receptor Mac-1 e a inflamação num paciente, por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um homólogo de D₃₀ ou de uma composição contendo o homólogo de D₃₀.

Está também contemplado pelo presente invento um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) que seja capaz de se ligar ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1 e inibir a ligação de D₃₀ ao local de ligação do Mac-1.

O invento contempla a utilização de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) para inibir a ligação mediada pelo receptor Mac-1 e a inflamação num paciente, por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) ou de uma composição contendo um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀).

Estão também contemplados pelo presente invento os processos

para detectar a presença de um homólogo de D_{30} numa composição líquida, utilizando os receptores Mac-1 ou um anticorpo anti- D_{30} .

O presente invento contempla a detecção de um complexo receptor Mac-1: homólogo de D_{30} , numa composição líquida tal como o sangue ou produtos derivados do sangue.

O presente invento contempla também um processo para detectar células possuindo um receptor Mac-1 in vivo, por administração, a um paciente, de uma composição contendo um homólogo de D_{30} ligado a um meio de indicação in vivo seja capaz de se ligar efectivamente aos receptores Mac-1 do paciente.

Breve descrição dos desenhos

Nos desenhos, que são uma parte desta descrição:

A figura 1, contendo os painéis 1A e 1B, ilustra as sequências de resíduos de aminoácido das cadeias α , β e gama do fibrinogénio humano, descrito por Doolittle et al., Nature, 280:464-469 (1979).

A figura 1A ilustra a sequência de resíduos de aminoácido completa, da cadeia α do fibrinogénio humano. A posição na sequência de resíduos de aminoácido do resíduo mais à esquerda está indicada pelos números na margem esquerda da figura. A extremidade N do fragmento de cadeia A ($A\alpha$) de D_{30} inicia-se com os resíduos de aminoácido Leu¹³⁶, Gln¹³⁷, Lys¹³⁸ e Asn¹³⁹. O fragmento de cadeia $A\alpha$ do D_{30} não contém os resíduos de aminoácido Arg⁹⁵, Gly⁹⁶, e Asp⁹⁷ (RGD) ou os resíduos de aminoácido Arg⁵⁷², Gly⁵⁷³ e Asp⁵⁷⁴ (RGD).

A figura 1B ilustra a comparação das sequências de resíduos de aminoácido da cadeia α com as sequências de resíduos de aminoácido das cadeias β e gama do fibrinogénio humano. Existe uma homologia significativa entre as três cadeias nos 210 primeiros resíduos de aminoácido. Os resíduos de aminoácido sublinhados denotam os resíduos de aminoácido idênticos emparelhados entre as cadeias α , β e gama. A origem do D_{30} no fragmento de cadeia B

(B β) está atribuída aos resíduos de aminoácido Asp¹³⁴ (D), Asn¹³⁵ (N), Glu¹³⁶ (E), e Asn¹³⁷ (N) na área enquadrada. A origem do D₃₀ na cadeia gama está atribuída aos resíduos de aminoácido Met⁸⁹ (M), Leu⁹⁰ (L), Glu⁹¹ (E), e Glu⁹² (E) na área enquadrada.

A figura 2 ilustra a curva de ligação de concentrações crescentes de ¹²⁵I-D₃₀ a células polimorfonucleares estimuladas (neutrófilos). A ligação específica calcula-se na presença de fibrinogénio ou D₃₀ não marcado em excesso molar de 100 vezes e subtrai-se do total para calcular a ligação específica representada na curva por círculos a branco. Cada ponto é a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experiências independentes. Os neutrófilos ligam o ¹²⁵I-D₃₀ numa reacção específica e saturável que se aproxima do estado estacionário para 15-20 g/ml de ¹²⁵I-D₃₀ adicionado.

A figura 3 ilustra os efeitos de concentrações crescentes de fibrinogénio e de fragmentos de fibrinogénio X, D:E, e D na competição pela ligação de ¹²⁵I-fibrinogénio a neutrófilos estimulados. O fibrinogénio, os fragmentos de fibrinogénio X, D:E, D, e RGD estão representados, respectivamente, por círculos a branco (○), círculos a cheio (●), quadrados a branco (□), quadrados a cheio (■) e um triângulo (Δ). Mede-se a competição pelos competidores não marcados adicionados como a percentagem de ¹²⁵I-fibrinogénio ligado comparada com o ¹²⁵I-fibrinogénio ligado no controlo, na ausência de competidores. Calculam-se os dados como se descreveu na figura 1. O fibrinogénio e os fragmentos de fibrinogénio competem na ligação de ¹²⁵I-fibrinogénio aos neutrófilos enquanto que o RGD não compete.

A figura 4 ilustra os efeitos de concentrações crescentes de fragmentos de fibrinogénio D₃₀, representados por círculos a cheio (●) e de fragmento E, representado por círculos a branco (○) na competição para a ligação do ¹²⁵I-fibrinogénio a neutrófilos estimulados. Mede-se a competição como se descreveu na figura 2 e calculam-se os dados como se descreveu na figura 1. As concentrações crescentes de D₃₀ produzem inibição de ligação de ¹²⁵I-fibrinogénio aos neutrófilos estimulados dependente da



dose, enquanto que os fragmentos E não produzem inibição.

Descrição detalhada do Invento

A. Definições

Resíduo de aminoácido: Prefere-se que os resíduos de aminoácido descritos no presente invento estejam na forma isomérica "L". No entanto, pode-se substituir qualquer resíduo de L-aminoácido por resíduos na forma isomérica "D", desde que fique retida pelo polipéptido a propriedade funcional desejada. NH₂ refere-se ao grupo amino livre, presente na extremidade amino de um polipéptido. COOH refere-se ao grupo carboxilo livre, presente na extremidade carboxilo do polipéptido. De acordo com a nomenclatura padrão de polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1969), mostram-se as abreviaturas para os resíduos de aminoácido na tabela de correspondência seguinte:

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

<u>SÍMBOLO</u>		<u>AMINOÁCIDO</u>
<u>1-Letra</u>	<u>3-Letra</u>	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutâmico
W	Try	triptofano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Deve-se notar que todas as sequências de resíduos de aminoácido estão representadas por fórmulas cuja orientação da esquerda para a direita está na direcção convencional, da extremidade amino para a extremidade carboxilo. Além disso, deve-se notar que um travessão no início ou no fim de uma sequência de resíduos de aminoácido indica uma ligação peptídica a uma sequência adicional de um ou mais resíduos de aminoácido, ou a um grupo amino terminal, NH_2 , ou a um grupo carboxilo terminal, COOH .

Polipéptido e Péptido: Polipéptido e péptido são termos utilizados intervareavelmente no presente invento para designar uma série linear de resíduos de aminoácido ligados uns aos outros por ligações peptídicas entre os grupos amino alfa e carboxilo de resíduos adjacentes.

Proteína: Uma proteína são dois ou mais polipéptidos associados conjuntamente de modo a formar uma única entidade. Os polipéptidos podem estar covalentemente ligados mas, alternativamente, podem estar apenas associados uns aos outros.

Receptor: Receptor e proteína receptora são termos utilizados no presente invento para indicar uma molécula de proteína, biologicamente activa que se liga especificamente (não aleatoriamente) a (ou com) outras moléculas, referidas como ligandos, de modo a formar um complexo proteína receptora-ligando. Um receptor representativo é a molécula Mac-1 (CD11b/CD18), presente nos monócitos.

Ligando: Ligando refere-se a uma molécula que contém uma porção estrutural que se liga, por uma interacção específica, com uma proteína receptora particular. Um ligando representativo é o fragmento D_{30} do fibrinogénio.

Anti-corpo: O termo anti-corpo, nas suas várias formas gramaticais, utiliza-se no presente invento para referir moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, i.e., moléculas que contêm um local de combinação ao anticorpo ou paratopo. São moléculas exemplificativas de

anticorpos as moléculas de imunoglobulina intacta, as moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas, e as porções de uma molécula de imunoglobulina, incluindo as porções conhecidas na arte como Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v).

Local de combinação do anticorpo: Um local de combinação do anticorpo é a porção estrutural de uma molécula de anticorpo compreendida por regiões de cadeia pesada e leve, variável e hipervariável que se ligam especificamente (imuno-reagem com) um antígeno. O termo imuno-reagir, nas suas várias formas gramaticais, significa ligar especificamente uma molécula contendo uma determinante antigénica e uma molécula contendo um local de combinação do anticorpo, tal como uma molécula de anticorpo completa ou uma sua porção.

Anticorpo monoclonal: A frase anticorpo monoclonal, nas suas várias formas gramaticais, refere-se a uma população de moléculas de anticorpos que contêm apenas uma espécie de local de combinação do anticorpo capaz de imuno-reagir com um antígeno particular. Um anticorpo monoclonal apresenta portanto, tipicamente, uma única afinidade de ligação para qualquer antígeno com o qual imuno-reage. Um anticorpo monoclonal pode portanto conter uma molécula de anticorpo possuindo uma pluralidade de locais de combinação do anticorpo, sendo cada um imuno-específico para um antígeno diferente, p.ex., um anticorpo monoclonal bi-específico.

B. Homólogos de D₃₀

D₃₀ é um fragmento de fibrinogénio produzido por digestão proteolítica do fibrinogénio. A preparação de D₃₀ foi descrita por Fair et al., J. Biol. Chem., 256:8018-8023 (1981), Furlaw et al., Biochem Biophys. Acta., 400:95-111 (1975) e no exemplo 1C. O D₃₀ contém cadeias β e gama parcialmente degradadas e cadeias α extensivamente degradadas, combinadas por ligações de dissulfureto inter-cadeias, como descrito por Pizzo et al., J. Biol. Chem., 247:636-645 (1972). Todas as referências e documentos citados no presente invento estão nele incorporados como referência.

A extremidade N do fragmento de cadeia A α do D₃₀ começa com

os resíduos de aminoácido Leu¹³⁶, Gln¹³⁷, Lys¹³⁸ e Asn¹³⁹ mostrados na figura 1A e utilizando a sequência de aminoácidos da cadeia alfa descrita por Doolittle et al., Nature, 280:464-469 (1979).

O fragmento de cadeia A α do D₃₀ não contém os resíduos de aminoácido Arg⁹⁵, Gly⁹⁶ e Asp⁹⁷ (RGD) (figura 1A) ou os resíduos de aminoácidos Arg⁵⁷², Gly⁵⁷³ e Asp⁵⁷⁴ (RGD) e possui um Pm. de cerca de 11 a 13 kilodaltons (kDa). As extremidades N da cadeia β do D₃₀ contém os resíduos de aminoácido Asp¹³⁴, Asn¹³⁵, Glu¹³⁶, e Asn¹³⁷ (figura 1B). A extremidade N da cadeia gama do D₃₀ contém os resíduos de aminoácido Met⁸⁹, Leu⁹⁰, Glu⁹¹, e Glu⁹² (figura 1B).

Um homólogo de D₃₀ do presente invento é um polipéptido ou uma proteína capaz de se ligar ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1 e inibir a ligação de D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1. Os homólogos de D₃₀ incluem fibrinogénio, porções de fibrinogénio, D₃₀, porções de D₃₀, polipéptidos homólogos a uma porção de D₃₀ ou fibrinogénio, anticorpos anti-idiotipo possuindo a imagem interna do D₃₀ (um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀)), polipéptidos ou proteínas homólogos ao D₃₀ ou a fibrinogénio contendo derivados de aminoácido não naturais ou cadeias laterais não proteínáceas, derivados químicos tanto de D₃₀ como de fibrinogénio ou seus fragmentos, e conjugados contendo um homólogo de D₃₀.

"Derivado químico" refere-se a uma entidade polipeptídica possuindo um ou mais resíduos derivados quimicamente por reacção de um grupo funcional lateral. Estas moléculas derivadas incluem, por exemplo, as moléculas nas quais se tenham derivado grupos amino para formar hidrocloreto de amina, grupos p-tolueno-sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloro-acetilo ou grupos formilo. Os grupos carboxilo livres podem ser derivados para formarem sais, ésteres de metilo ou de etilo ou outros tipos de ésteres ou hidrazidas. Os grupos hidroxilo livres podem ser derivados para formar derivados O-acilo ou O-alquilo. O Azoto do imidazolo da histidina pode ser derivado para formar N-im-benzil-histidina. Estão também incluídos como

derivados químicos os péptidos que contêm um ou mais derivados de aminoácidos de ocorrência natural dos vinte aminoácidos comuns. Por exemplo: pode-se substituir a prolina por 4-hidroxiprolina; pode-se substituir a lisina por 5-hidroxilisina; pode-se substituir a histidina por 3-metil-histidina; pode-se substituir a serina por homo-serina; e pode-se substituir a lisina por ornitina. Os polipéptidos do presente invento incluem também qualquer péptido possuindo uma ou mais adições e/ou deleções ou resíduos, relativamente à sequência de um polipéptido cuja sequência se mostra no presente invento, desde que se mantenha a actividade de ligação necessária.

O termo "fragmento" refere-se a qualquer identidade polipeptídica possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido mais curta do que a de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácido se mostra no presente invento.

Pode-se preparar um polipéptido do presente invento utilizando a técnica sintética de fase sólida inicialmente descrita por Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963). Podem-se encontrar outras técnicas para a síntese de polipéptidos, por exemplo, em M. Bodanszky et al., Peptide Synthesis, John Wiley & Sons, 2ª Ed., (1976) assim como noutros trabalhos de referência conhecidos pelos peritos na arte. Pode-se encontrar um sumário de técnicas de síntese de polipéptidos em J. Stuart e J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 3d Ed., Neurath, H. et al., Eds., p. 104-237, Academic Press, New York, NY (1976). Os grupos protectores apropriados para se utilizar nestas sínteses serão encontrados nos textos anteriores assim como em J.F.W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, New York, NY (1973).

Em geral, estes processos sintéticos compreendem a adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos, a uma cadeia polipeptídica em crescimento. Normalmente protege-se o grupo amino ou o grupo carboxilo do primeiro resíduo de aminoácido com um grupo protector adequado, selectivamente removível, e utiliza-se para

aminoácidos contendo um grupo lateral reactivo tal como a lisina.

Utilizando uma síntese em fase sólida como exemplo, liga-se o aminoácido protegido ou derivado a um suporte sólido inerte através do seu grupo carboxilo ou amino não protegido. Remove-se então, selectivamente, o grupo protector do grupo amino ou carboxilo e mistura-se o aminoácido seguinte na sequência, possuindo o grupo complementar (amino ou carboxilo) adequadamente protegido, e faz-se reagir sob condições adequadas à formação da ligação amida com o resíduo já ligado ao suporte sólido. Remove-se então o grupo protector do grupo amino ou carboxilo deste resíduo de aminoácido recentemente adicionado, e então adiciona-se o seguinte aminoácido (adequadamente protegido), e assim por diante. Após se ligarem todos os aminoácidos desejados na sequência correcta, removem-se quaisquer grupos protectores do grupo terminal e dos grupos laterais que permaneçam (e suporte sólido), sequencialmente ou concorrentemente para proporcionar o polipéptido final.

O local de ligação de D_{30} do Mac-1 é a porção de glicoproteína de adesão do leucócito humano, Mac-1 (CD11b/CD18) que se liga ao fragmento D_{30} do fibrinogénio. O local de ligação ao D_{30} do Mac-1 pode ser feito de aminoácidos das cadeias α e/ou β do Mac-1.

Um homólogo de D_{30} é capaz de inibir a ligação de D_{30} ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 se o homólogo de D_{30} competir com, ou bloquear, a ligação de D_{30} ao local de ligação de D_{30} do Mac-1. Os processos e procedimentos para determinar a inibição são bem conhecidos na arte e incluem a utilização de ensaios de competição similares aos ensaios de competição de antigénios descritos em Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor, NY (1988). Por exemplo, pode-se utilizar um composto não marcado que se suspeite ser um homólogo de D_{30} para inibir a ligação de D_{30} marcado ou de um homólogo de D_{30} marcado, ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 dos receptores Mac-1 de leucócitos. A quantidade de ligação de D_{30} marcado ao local de ligação de D_{30} na presença ou ausência do composto não marcado será

comparada e se a presença do composto não marcado inibir a quantidade de ligação de D_{30} marcado ao local de ligação de D_{30} , então o composto não marcado é um homólogo de D_{30} . Está descrito no exemplo 2 um processo preferido para a medição da inibição de ligação de D_{30} ao Mac-1.

Um homólogo de D_{30} do presente invento pode ser uma porção de fibrinogénio ou de D_{30} , desde que essa porção particular seja capaz de inibir a ligação de D_{30} ao local de ligação de D_{30} do Mac-1. As proteínas ou polipéptidos que são homólogos a todo ou a uma porção de D_{30} ou homólogos a todo ou a uma porção de fibrinogénio estão também contempladas como homólogos de D_{30} . Estas proteínas homólogas são capazes de inibir a ligação de D_{30} ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 e portanto são verdadeiros homólogos de D_{30} .

Os homólogos de D_{30} contendo aminoácidos não naturais e/ou aminoácidos com grupos laterais não naturais estão também contemplados. Exemplos de aminoácidos não naturais incluem aminoácidos possuindo grupos laterais derivados quimicamente, ou ornitina ou citrulina. Exemplos de aminoácidos com grupos laterais não naturais incluem resíduos de aminoácido necessários para ciclicizar o péptido.

Pode-se acoplar ou conjugar um homólogo de D_{30} do presente invento com outra proteína ou polipéptido para produzir um homólogo de D_{30} conjugado. Um homólogo de D_{30} conjugado possui vantagens sobre um homólogo de D_{30} utilizado sózinho. Por exemplo, o acoplamento do homólogo de D_{30} a uma proteína ou polipéptido que se sabe conter uma segunda função biológica, permite dirigir essa segunda função biológica para a localização num, ou perto de um receptor Mac-1 ou um local de ligação de D_{30} do Mac-1.

Noutras concretizações preferidas, conjuga-se um homólogo de D_{30} com uma molécula transportadora para formar um homólogo de D_{30} conjugado contendo, pelo menos, uma molécula transportadora. Os transportadores típicos incluem sefarose, sefadex, proteínas, polipéptidos e similares.



Pode-se também conjugar ou agregar um homólogo de D_{30} consigo mesmo de maneira a produzir um complexo grande contendo um homólogo de D_{30} . Um complexo grande contendo um homólogo de D_{30} é vantajoso porque possui novas propriedades biológicas tais como uma semi-vida mais longa na circulação ou uma maior actividade.

C. Composições contendo homólogos de D_{30}

Numa concretização preferida, o presente invento contempla uma composição compreendendo um transportador e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um homólogo de D_{30} substancialmente puro e farmacêuticamente aceitável, capaz de se ligar ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 e de inibir a ligação de fibrinogénio ao local de ligação de D_{30} do Mac-1.

Numa quantidade terapeuticamente eficaz de um homólogo de D_{30} é uma quantidade que, quando administrada a um paciente, é capaz de inibir a ligação de fibrinogénio ao local de ligação ao D_{30} do Mac-1. Os ensaios para detectar a inibição da ligação de fibrinogénio ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 incluem, mas não estão limitados aos ensaios de ligação competitiva e outros ensaios de ligação descritos na secção E ou no exemplo 2 desta descrição. Preferivelmente, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um homólogo de D_{30} é uma quantidade que reduz (inibe) a ligação de fibrinogénio ao Mac-1 em pelo menos, 10 por cento, preferivelmente em pelo menos 50 por cento, e mais preferivelmente em pelo menos 99 por cento, quando medida num ensaio in vitro para a ligação de fibrinogénio ao Mac-1. Um ensaio in vitro exemplificativo para quantificar quantidades inibidoras eficazes de homólogo de D_{30} , está descrito no exemplo 2. Nos processos preferidos, é útil uma composição terapêutica para inibir a inflamação mediada pelo receptor Mac-1 num paciente que exhibe a inflamação, como se descreverá no presente invento. Nesta concretização, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade que, quando administrada a um paciente, é suficiente para inibir a inflamação mediada pelo receptor Mac-1.

Os ensaios para detectar a inibição da inflamação mediada



pelo receptor Mac-1 incluem, mas não estão limitados aos ensaios de migração de linfócitos descritos na secção E deste pedido. Meios adicionais para detectar a inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 incluem a inspecção clínica de sintomas que surgem num paciente apresentando a inflamação.

Substancialmente puro, quando utilizado no contexto de um homólogo de D_{30} , refere-se a composições que estão enriquecidas no homólogo de D_{30} , e que, preferivelmente, estão isentas de quantidades detectáveis de células sanguíneas, proteínas, imunoglobulina e albumina, e lipoproteínas, e que, mais preferivelmente, contêm mais de 99 por cento em peso de homólogo de D_{30} por massa total na composição.

Por farmacologicamente aceitável pretende-se significar que um homólogo de D_{30} , quando utilizado numa composição terapêutica, não provoca quaisquer efeitos fisiológicos não desejados devidos à presença de contaminantes. Assim, um homólogo de D_{30} farmacologicamente aceitável está isento de contaminantes farmacologicamente não aceitáveis, tais como pirogénios (lipopolissacáridos) e outros contaminantes tais como compostos químicos venenosos (i.e., azida de sódio) e detergentes, nomeadamente, dodecilsulfato de sódio.

A preparação de composições terapêuticas que contêm polipéptidos ou proteínas como ingredientes activos é bem entendida na arte. Tipicamente, preparam-se estas composições como injectáveis, tanto na forma de soluções como de suspensões líquidas, no entanto, podem-se também preparar formas sólidas adequadas para dissolver ou suspender num líquido antes da injeção. Pode-se também emulsionar a preparação. Mistura-se o ingrediente terapêutico activo com transportadores inorgânicos e/ou orgânicos que sejam farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. Os transportadores são excipientes (veículos) farmacologicamente aceitáveis, compreendendo mais ou menos substâncias inertes quando adicionados à composição terapêutica para conferir a consistência ou forma adequadas à composição. Os transportadores adequados



são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol, ou similares, e suas combinações. Em adição a composição pode conter, se desejado, quantidades pouco importantes de substâncias auxiliares tais como, agentes molhantes ou emulsionantes e agentes tampão de pH, os quais aumentam a eficácia do ingrediente activo.

Uma composição terapêutica útil na prática do presente invento contém, tipicamente, um homólogo de D₃₀ formulado na composição terapêutica na forma de um sal neutralizado farmacêuticamente aceitável. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres da molécula de polipéptido ou anticorpo) e que se formam com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tais como os ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico, e similares. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem ser também derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, de potássio, de amónio, de cálcio ou férrico, e de bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, e similares.

A composição terapêutica contendo o homólogo de D₃₀ é administrada, convencionalmente, por via parentérica, por exemplo, por injeção de uma dose unitária. Desta maneira, pode-se administrar a composição terapêutica por via intravenosa, intramuscular ou noutras regiões, tais como nos fluidos sinoviais. No entanto, a administração de uma composição contendo o homólogo de D₃₀ por via transdérmica também está contemplada. O termo "dose unitária" quando utilizado em relação a uma composição terapêutica utilizada no presente invento, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para humanos, cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de material activo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente, transportador ou excipiente necessário.

Nas concretizações preferidas, uma composição terapêutica do



presente invento contém uma quantidade eficaz de um homólogo de D_{30} e é uma composição estéril. Uma composição estéril está substancialmente isenta de bactérias e fungos. Tipicamente, esteriliza-se uma composição fazendo passar a composição através de um filtro tal como um filtro de 0,2 micra concebido para este propósito.

Noutras concretizações preferidas, optimiza-se uma composição do presente invento para permitir que o homólogo de D_{30} que ela contém, seja distribuído por via transdérmica.

Noutras concretizações preferidas, uma composição do presente invento contém uma quantidade imunologicamente eficaz de homólogo de D_{30} . Uma quantidade imunologicamente eficaz de homólogo de D_{30} é uma quantidade suficiente para produzir anticorpos que se ligam a um homólogo de D_{30} e inibem esse homólogo de D_{30} de se ligar ao local de ligação de D_{30} do Mac-1.

D. Anticorpos anti-(idiotipo D_{30})

O presente invento contempla processos e composições que empregam um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}).

Os anticorpos anti-idiotipo são anticorpos que possuem a imagem interna de uma entidade particular e portanto expressam determinantes antigénicos ou epítomos que são imunoquimicamente similares ou idênticos aos epítomos encontrados num antigénio externo. Por exemplo, um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) é um anticorpo anti-idiotipo que contém a imagem interna da porção de D_{30} que se liga ao local de ligação de D_{30} do receptor Mac-1. Um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) contém um paratopo cuja estrutura é definida pela capacidade para:

(1) se ligar ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 para formar um complexo local de ligação de D_{30} do Mac-1/anticorpo anti-(idiotipo D_{30}), e

(2) imuno-reagir com um anticorpo anti-homólogo de D_{30} .

Um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) liga-se ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 e forma o complexo local de ligação de D_{30} do Mac-1/anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) se competir com um homólogo de D_{30} na ligação ao local de ligação de D_{30} do Mac-1 num ensaio de competição que empregue, por exemplo, um homólogo de D_{30} marcado.

Um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) imuno-reage com um anticorpo anti-homólogo de D_{30} . São bem conhecidos vários imunoensaios para detectar o produto de imuno-reacção ou o complexo formados e incluem doseamentos rádio-imunológicos e imunoensaios de enzima ligada. Ver, por exemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor, NY (1988).

Um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) do presente invento pode-se distinguir dos anticorpos anti-receptor Mac-1 que bloqueiam a ligação de D_{30} ao receptor Mac-1 porque os anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) imuno-reagem com anticorpos anti- D_{30} e os anticorpos anti-receptor Mac-1 não reagem.

As concretizações preferidas incluem fragmentos contendo paratopos de um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) tal como Fab, Fab', $F(ab')_2$, F(v) e similares. São bem conhecidos os processos de preparação de porções de moléculas de imunoglobulina contendo paratopos tais como Fab, Fab', $F(ab')_2$ e F(v), a partir de anticorpos substancialmente intactos. Ver, por exemplo, U.S. 4.342.566, Inbar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2659-62 (1972), e Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, P118-124 (1983).

Prepara-se um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) utilizando processos e procedimentos bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Benjamini et al., Immunogens and Improved Methods of Making Immunogens, International Publication N° WO 88/00472, publicada em 28 de Janeiro, 1988; Standt et al., J. Exp. Med., 157:687-704 (1983); Reagan et al., J. Virol., 48:660-666 (1983), e Ardman et al., J. Exp. Med., 161:669-686 (1985). Resumidamente, para produzir uma composição de anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) deste inven-

to, produz-se primeiro um anticorpo anti-homólogo de D₃₀, inoculando um animal de laboratório com uma quantidade imunologicamente eficaz de um homólogo de D₃₀, tipicamente presente numa vacina para produzir um anticorpo anti-D₃₀.

Os processos de produção de anticorpos anti-homólogo de D₃₀ para utilizar na produção de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) são bem conhecidos. Ver, por exemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor, NY (1988) para uma descrição do processo de produção de anticorpos policlonais, ou preferivelmente, monoclonais, contra uma proteína tal como um homólogo de D₃₀.

Uma vacina útil para a preparação de anticorpos anti-idiotipo do presente invento compreende quantidades imunologicamente eficazes de um homólogo de D₃₀ e de um imunopotenciador adequado para utilização em mamíferos.

Um imunopotenciador é uma entidade molecular que estimula a maturação, a diferenciação e a função dos linfócitos B e/ou T. Os imunopotenciadores são bem conhecidos na arte e incluem polipéptidos que estimulam a célula T tais como os descritos na patente dos E.U. N°. 4 426 324 e nucleósidos de guanina substituídos no C8, descritos por Goodman et. al., J. Immunol., 135:3284-88 (1985) e na patente dos E.U. N°. 4 643 992.

As frases "adequado para utilização em mamíferos" e "farmaceuticamente aceitável", referem-se a entidades moleculares e composições que não produzam uma reacção alérgica ou inconveniente similar, quando administrados a um mamífero.

Uma vacina pode também incluir um adjuvante como parte do excipiente. Adjuvantes como o adjuvante de Freund completo (CFA) e o adjuvante de Freund incompleto (IFA) para se utilizar em mamíferos de laboratório são bem conhecidos na arte. Podem-se também utilizar adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis tais como o alúmen. Uma vacina exemplificativa compreende assim, um ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo cerca de 1 mg

a cerca de 5 mg de homólogo de D_{30} adsorvido sobre de cerca de 0,5 mg a cerca de 2,5 mg de alúmen. Uma vacina preferida compreende 1 ml de PBS contendo 1 mg de homólogo de D_{30} adsorvido sobre 2,5 mg de alúmen.

Os anticorpos anti-homólogo de D_{30} produzidos pela vacinação anterior recolhem-se dos mamíferos e isolam-se os que são imuno-específicos para o homólogo de D_{30} , até à porção desejada, por técnicas bem conhecidas tais como, por exemplo, cromatografia de imunoafinidade.

Podem-se também produzir composições de anticorpos anti-homólogo de D_{30} , monoclonais, utilizando processos bem conhecidos na arte. Ver, por exemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor, NY. Um anticorpo anti-homólogo de D_{30} , monoclonal, contém, dentro dos limites detectáveis, apenas uma espécie de local de combinação de anticorpos capaz de ligar imunologicamente, de modo eficaz, um homólogo de D_{30} e apresenta uma única afinidade de ligação para um homólogo de D_{30} .

O anticorpo anti-homólogo de D_{30} monoclonal ou policlonal produzido anteriormente utiliza-se para preparar um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}), inoculando um mamífero de laboratório com uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-homólogo de D_{30} produzido anteriormente para produzir anticorpos anti-(idiotipo D_{30}). Isolam-se os anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) capazes de ligar um anticorpo anti-homólogo de D_{30} , até à proporção desejada, por técnicas bem conhecidas tais como, por exemplo, cromatografia de imunoafinidade.

Os anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) capazes de ligar um anticorpo anti-homólogo de D_{30} são então testados quanto à sua capacidade para se ligarem ao local de ligação de D_{30} do Mac-1, indicando que estes anticorpos anti-idiotipo possuem a imagem interna de um homólogo de D_{30} . Os anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) que ligam o local de ligação de D_{30} do Mac-1 são seleccionados e são úteis na prática deste invento. Tipicamente, testa-se um anticor-

po anti-(idiotipo D₃₀) quanto à sua capacidade para se ligar ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1, por um ensaio de competição com um homólogo de D₃₀ marcado. Selecciona-se então o anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) que compete neste ensaio de competição.

Podem-se também preparar anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) adequados, na forma monoclonal, tipicamente anticorpos completos, utilizando a tecnologia de hibridomas descrita por Reagan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:3891-95 (1987), cuja descrição se incorpora no presente invento como referência. Resumidamente, para formar o hibridoma, a partir do qual se produz a composição de anticorpos anti-idiotipo monoclonais, funde-se um mieloma ou outra linha celular auto-perpetuante com os linfócitos obtidos do baço de um mamífero hiper-imunizado com um anticorpo anti-D₃₀.

Prefere-se que a linha celular de mieloma seja da mesma espécie que os linfócitos. Tipicamente, o mamífero preferido é um ratinho da estirpe 129 GlX⁺. Os mielomas de ratinhos adequados para uso no presente invento incluem as linhas celulares sensíveis a hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) P3X63-Ag8.653, e Sp2/0-Ag14, que estão disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, MD, sob as designações CRL 1580 e CRL 1581, respectivamente.

Os splenócitos fundem-se tipicamente com células de mieloma utilizando polietilenoglicol (PEG) 1500. OS híbridos fundidos seleccionam-se pela sua sensibilidade ao HAT. Identificam-se os hibridomas que segregam as moléculas de anticorpos anti-idiotipos deste invento utilizando processos serológicos tais como o ensaio de diagnóstico, ensaio de imunossorção de enzima ligado (ELISA), comercialmente disponível, para detectar anticorpos para um anticorpo anti-homólogo de D₃₀. Uma vez que se mostre que o hibridoma segrega um anticorpo anti-idiotípico que liga um anticorpo anti-homólogo de D₃₀, testam-se ainda estes anticorpos quanto à sua capacidade de competição com um homólogo de D₃₀ para a ligação ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1.

Pode-se produzir uma composição de anticorpos anti-idiotí-

pícos monoclonais do presente invento iniciando uma cultura de hibridomas monoclonais compreendendo um meio nutriente contendo um hibridoma que segrega moléculas de anticorpo com a especificidade para o anti-(idiotipo D₃₀) adequado. Mantém-se a cultura sob condições, e durante um período de tempo, suficientes para o hibridoma segregar as moléculas de anticorpo para o meio. Recolhe-se então o meio contendo anticorpos. Podem-se então isolar adicionalmente as moléculas de anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) por técnicas bem conhecidas.

Os meios úteis para a preparação destas composições são bem conhecidos na arte e estão comercialmente disponíveis e incluem meios de cultura sintéticos, ratinhos co-sanguíneos e similares. Um meio sintético ilustrativo é o meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al., Virology, 8:396 (1959)) suplementado com glucose a 4,5 g/l, glutamina 20 Mm, e soro de bovino fetal a 20%. Uma estirpe de ratinhos co-sanguíneos ilustrativa é Balb/c.

E. Processos de Inibição da ligação do receptor Mac-1 a um ligando de Mac-1 e de inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1.

1. Processos terapêuticos utilizando um homólogo de D₃₀.

O presente invento contempla um processo de inibição da ligação do receptor Mac-1 a um ligando do local de ligação de D₃₀ do Mac-1 (ligando de Mac-1) num paciente, por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição contendo um homólogo de D₃₀ disperso num excipiente farmacologicamente aceitável.

Um ligando de Mac-1 é qualquer proteína, vírus, polipéptido, parasita, bactéria, hormona, molécula efectora, molécula da superfície celular, célula imunitária ou sua porção que se liga ao local de ligação de D₃₀ presente no receptor Mac-1 e inibe a ligação de D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1. Os exemplos de ligandos do local de ligação de D₃₀ do Mac-1 incluem fibrinogénio D₃₀, e vários parasitas bacterianos. Ver, por exemplo, Payne et al., J. Exp. Med., 166:329-331 (1987) and Russel et al., J. Exp. Med., 168:279-292 (1988). Na descrição que

se segue, usar-se-á o fibrinogénio como um ligando do local de ligação de D₃₀ do Mac-1 ilustrativo e assim, deve-se entender que o invento contempla todos os ligandos do local de ligação de D₃₀ do Mac-1 e não está limitado ao fibrinogénio.

A inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 num paciente detecta-se ensaiando a função neutrófila do paciente. Estes ensaios podem-se realizar in vivo ou in vitro e incluem ensaios para detectar a aderência celular, a quimiotaxia e a fagocitose e a falta de capacidade para localizar in vivo os locais de inflamação. Ver, por exemplo, Tayler et al., J. Clin. Invest., 67:584 (1984), e Price et al., J. Clin. Immuno., 139:4174-4177 (1987).

A inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 pode-se determinar in vivo determinando a quantidade de ligações de homólogo de D₃₀ aos neutrófilos isolados do paciente. Recolhem-se amostras de sangue em vários tempos após a administração do homólogo D₃₀ e determina-se a quantidade de fibrinogénio marcado adicional ou homólogo de D₃₀ que se pode ligar aos neutrófilos isolados das amostras de sangue. Comparando a quantidade de fibrinogénio marcado adicional ou homólogo de D₃₀ que se liga a estes neutrófilos, com a quantidade de fibrinogénio marcado ou homólogo de D₃₀ ligado por linfócitos de controlo, determina-se o nível da inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo Mac-1. Ver, por exemplo, Price et al., J. Immuno., 139:4174-4177 (1987).

Outros processos de determinação da inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 incluem a detecção da migração de neutrófilos para os locais inflamatórios in vivo. Tipicamente, pode-se criar o local inflamatório colocando subcutaneamente esponjas de polivinilo empacotadas em formação, em vários locais. Ver, por exemplo Price et al., J. Immuno., 139:4174-4177 (1987) e Price et al., J. Clin. Invest., 59:475 (1977). Colocam-se as esponjas sub-cutaneamente fazendo incisões estéreis. Recolhem-se amostras de sangue directamente das esponjas sub-cutâneas e determina-se o número de neutrófilos. Recolhem-se



amostras de sangue em vários tempos antes e depois da administração do homólogo de D₃₀, determina-se o número de neutrófilos e portanto determina-se a quantidade de ligações de fibrinogénio mediadas pelo receptor Mac-1.

Outros processos de detecção de uma variação no padrão da migração de neutrófilos in vivo incluindo vários processos de detecção da localização de neutrófilos utilizando anticorpos marcados que ligam neutrófilos, também serão úteis na prática deste invento. Um perito na arte perceberá que estas técnicas permitem a localização de células marcadas dentro de um paciente vivo. Para exemplos de várias técnicas de formação de imagem in vivo, ver Zalcborg, Am. J. Clin. Oncol., 8:481-484 (1985); Delaloye et al., J. Clin. Invest., 37:301-311 (1986); Haber, Ann. Rev. Med., 37:249-261 (1986); e Wahl et al., J. Nucl. Med., 24:316-325 (1983).

Os pacientes nos quais a inibição da ligação no receptor Mac-1 é um ligando de Mac-1 tal como o fibrinogénio seria clinicamente útil, incluem pacientes com enfarte de miocárdio muito recente (dentro de 40 horas do acontecimento agudo) onde o homólogo de D₃₀ possa evitar a acumulação de neutrófilos em tecidos expostos devido a lesão desses tecidos. Outros pacientes com necessidade de inibição da ligação do receptor Mac-1 a ligandos de Mac-1 incluem pacientes com respostas auto-imunes, reacções inflamatórias gerais ou inflamatórias localizadas e pacientes com nefrite glomerular.

O presente invento contempla também um processo de inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 num paciente, por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição compreendendo o homólogo de D₃₀ substancialmente puro e farmacologicamente aceitável, disperso conjuntamente com um excipiente (transportador) farmacologicamente aceitável.

A inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 detecta-se detectando a inibição da acumulação de neutrófilos no local

de uma inflamação que produz lesão ou ferimentos. Por exemplo, o número de neutrófilos que se acumula no local de uma esponja colocada sob a pele pode-se determinar tanto antes como depois de se administrar um homólogo de D₃₀ ao paciente. Ver, por exemplo, Price et al., J. Immuno., 139:4174-4177 (1987).

A inflamação mediada pelo receptor Mac-1 inclui qualquer das funções biológicas possuídas por um linfócito possuindo um receptor Mac-1 na superfície das suas células. As funções biológicas típicas possuídas por estes linfócitos incluem a adesão das células que possuem o Mac-1 ao endotélio vascular, a fagocitose de partículas opsonizadas do complemento, a quimiotaxia e as interacções específicas com as proteínas da matriz extra-celular. O presente invento contempla também a inibição de outras funções dos linfócitos mediadas pelo Mac-1 que ocorrem após a ligação de um homólogo de D₃₀ ao receptor Mac-1. A inibição deste tipo de respostas metabólicas está contemplada pelo presente invento. Por exemplo, com a activação de neutrófilos, sabe-se que ocorrem acontecimentos metabólicos tais como uma erupção da geração de O₂. Ver Nathan et al., J. Cell Biol., 109:1341-1349 (1989).

Administra-se, um homólogo de D₃₀, tipicamente, como uma composição farmacêuticamente aceitável na forma de uma solução ou suspensão, no entanto, como é bem conhecido, os péptidos e proteínas tais como um homólogo de D₃₀ também se podem formular para administração terapêutica na forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação sustida ou pós. Em qualquer caso, a composição administrada contém pelo menos cerca de 0,10% até cerca de 99% em peso de um homólogo de D₃₀ por peso da composição, preferivelmente 10%-90%, e mais preferivelmente 25-75%.

Administra-se a composição de uma maneira compatível com a formulação da dosagem, e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a administrar depende de sujeito a tratar, da capacidade do sistema hemostático sanguíneo do sujeito para utilizar o ingrediente activo, e do grau da inibição da inflamação mediada pelo receptor MAC-1 ou da inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 que se deseja. As quantidades



precisas de ingrediente activo necessárias para administração dependem da opinião do médico e são específicas para cada indivíduo.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de homólogo de D_{30} pode-se expressar como uma quantidade suficiente para produzir uma concentração final de homólogo de D_{30} no sangue de um paciente. Esta concentração no sangue pode-se determinar por um ensaio in vitro para o D_{30} numa amostra de um líquido corporal (p.ex., sangue), tal como se descreve no presente invento, ou pode-se calcular com base no peso corporal do paciente e volume de sangue, como é bem conhecido.

As gamas de dosagem adequadas de um homólogo de D_{30} , para os processos terapêuticos descritos no presente invento, são da ordem de 0,1 a 20 miligramas, preferivelmente um a dez miligramas de homólogo de D_{30} por quilograma de peso corporal do paciente por dia, e dependendo da via de administração. Apresentado de outro modo, uma dosagem terapeuticamente eficaz é uma quantidade suficiente para produzir uma concentração intravascular de D_{30} no sangue do paciente na gama de 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$, preferivelmente de cerca de 10 a 20 $\mu\text{g/ml}$.

2. Processos terapêuticos utilizando um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}).

O presente invento contempla um processo de inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo Mac-1 num paciente, compreendendo a administração ao referido paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-(idiotipo D_{30}) que se detecta ensaiando a função dos linfócitos ou neutrófilos do paciente. Os ensaios para determinar uma função dos linfócitos ou neutrófilos de um paciente são os ensaios iguais ou semelhantes aos utilizados para determinar a função dos linfócitos descrita anteriormente na secção E1.

A inibição da ligação do fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 pode-se determinar in vivo determinando a quantidade de ligação de anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) a neutrófilos isolados



do paciente. Recolhem-se amostras de sangue em vários tempos após a administração do anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) e determina-se a quantidade de fibrinogénio marcado adicional ou homólogo de D₃₀ que se pode ligar aos neutrófilos isolados das amostras de sangue. Comparando a quantidade de fibrinogénio marcado adicional ou homólogo de D₃₀, que se liga a estes neutrófilos com a quantidade de fibrinogénio marcado ou homólogo de D₃₀ ligado por linfócitos de controlo, determina-se o nível da inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo Mac-1. Ver, por exemplo, Price et al., J. Immunol., 139:4174-4177 (1987).

Outros processos de determinação da inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 incluem a detecção da migração de neutrófilos para locais inflamatórios in vivo. Exemplos destes ensaios estão descritos acima na secção E1.

Outros processos de detecção de uma variação no padrão da migração de neutrófilos in vivo após administração de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) incluindo vários processos de detecção da localização de neutrófilos utilizando anticorpos marcados que ligam neutrófilos também serão úteis na prática deste invento.

O presente invento contempla também um processo de inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 num paciente, por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição contendo um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) disperso num excipiente farmacêuticamente aceitável.

A inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 detecta-se detectando a inibição da acumulação de neutrófilos no local de lesão ou ferimento que produz inflamação.

Em outras concretizações preferidas, está contemplado um processo de inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 num paciente, por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀).

O anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) administrado nestas concretizações é um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) purificado e pode ser um sólido, um líquido ou uma pasta.

Outras concretizações preferidas contemplam um processo de inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 num paciente por administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀).

Administra-se, tipicamente, um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) como uma composição farmacologicamente aceitável na forma de uma solução ou suspensão, no entanto, como é bem conhecido, também se podem formular péptidos e proteínas tais como um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) para administração terapêutica na forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação sustida ou pós. Em qualquer caso, a composição administrada contém de cerca de 0,10% a cerca de 99% de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀), preferivelmente 10%-90% e mais preferivelmente 25-75%.

A preparação de composições terapêuticas que contêm anticorpos como ingredientes activos é bem conhecida na arte. Tipicamente, estas composições preparam-se na forma de soluções ou suspensões líquidas injectáveis, no entanto, podem-se também preparar formas sólidas adequadas para dissolver ou suspender num líquido antes da injeção. Pode-se também emulsionar a preparação. Por vezes mistura-se o ingrediente terapêutico activo com excipientes inorgânicos e/ou orgânicos que sejam farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo (péptido). Os excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou similares e suas combinações. Em adição, se for desejado, a composição pode conter quantidades mínimas de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes e agentes tamponantes do pH que aumentam a eficácia do ingrediente activo.

Uma composição terapêutica útil na prática do presente invento pode conter um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) formulado na composição terapêutica na forma de um sal neutralizado farmacêu-



ticamente aceitável. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres da molécula de polipéptido ou de anticorpo) e que se formam com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com ácidos orgânicos tais como os ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico, e similares. Também se podem derivar sais formados com os grupos carboxilo livres a partir de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, de potássio, de amónio, de cálcio, ou férrico, e de bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, e similares.

Administra-se, convencionalmente, a composição terapêutica contendo um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) por via intravenosa, por injeção de uma dose unitária, por exemplo. No entanto, também está contemplada a administração de uma composição contendo o anticorpo anti-(idiotipo D₃₀), por via transdérmica. O termo "dose unitária" quando utilizado em referência a uma composição terapêutica utilizada no presente invento refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o Homem, cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de material activo, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o excipiente necessário.

Administra-se a composição contendo um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) de uma maneira compatível com a formulação da dosagem, e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a administrar depende do sujeito a tratar, da capacidade do sistema hemostático do sangue do sujeito para utilizar o ingrediente activo, e do grau da inibição da inflamação mediada pelo receptor Mac-1 ou da inibição da ligação de fibrinogénio mediada pelo receptor Mac-1 desejado. As quantidades precisas de ingrediente activo necessárias para administrar dependem da opinião do médico e são específicas para cada indivíduo. No entanto, as gamas de dosagens adequadas são da ordem de um a centenas de nanomoles de homólogo de D₃₀ por quilograma de peso corporal por minuto e dependem da via de administração.



F. Processos de detecção de homólogos de D₃₀ e Complexos
Mac-1:homólogo de D₃₀.

O presente invento contempla qualquer processo que resulte na detecção de um homólogo de D₃₀ produzindo um produto de reacção utilizando um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, ou receptores Mac-1. Os peritos na arte entenderão que existem numerosos procedimentos químicos de diagnóstico clínico bem conhecidos que se podem utilizar para formar e detectar estes produtos de reacção. Assim, embora se descrevam no presente invento processos de ensaios exemplificativos, o invento não é tão limitado.

Podem-se empregar vários protocolos de ensaios heterogéneos e homogéneos, competitivos ou não competitivos, para detectar a presença, e preferivelmente a quantidade, de um homólogo de D₃₀ numa composição líquida.

Pode-se detectar um homólogo de D₃₀ em qualquer amostra, tal como uma amostra sólida, líquida ou de um fluido corporal. Em concretizações preferidas, detecta-se um homólogo de D₃₀ em amostras de fluido corporal, incluindo sangue, plasma, soro, muco, expectoração e similares.

Pode-se também detectar um homólogo de D₃₀ in vitro ou in vivo em vários tecidos e órgãos. Nas concretizações preferidas podem-se ensaiar fatias de tecido ou secções de tecido quanto à presença e localização de um homólogo de D₃₀. Noutras concretizações preferidas podem-se ensaiar órgãos in vivo quanto à presença, e para determinar a localização, de um homólogo de D₃₀.

A detecção da quantidade de homólogo de D₃₀ presente in vitro ou in vivo é útil porque a quantidade de homólogo de D₃₀ presente correlaciona-se com a quantidade de ligações de D₃₀ e de inflamação presentes no animal analisado.

A determinação da quantidade de homólogo de D₃₀ ligado e da quantidade de inflamação presente no animal analisado permite que a administração de um homólogo de D₃₀ a um paciente seja contro-

lada para determinar o estado clínico do paciente.

Nas concretizações preferidas o presente invento contempla um processo de determinação da presença e, preferivelmente, da quantidade, de um homólogo de D_{30} numa composição líquida. Os passos deste processo incluem:

(1) misturar uma primeira amostra de células activadas possuindo receptores Mac-1 com uma quantidade pré-determinada de uma composição líquida contendo um homólogo de D_{30} e uma quantidade pré-determinada de um homólogo de D_{30} marcado para formar uma mistura reaccional;

(2) manter a mistura reaccional formada no passo (1) durante um período de tempo pré-determinado, suficiente para que o homólogo de D_{30} presente na composição líquida se ligue aos receptores Mac-1 e se forme um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} e para permitir que o homólogo de D_{30} marcado se ligue aos receptores Mac-1 e se forme um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado;

(3) testar quanto à presença e/ou quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado, formado no passo (2), detectando-se assim a presença e/ou quantidade de homólogo de D_{30} na composição;

Noutras concretizações preferidas, o passo de ensaio (c) compreende ainda os passos de:

(i) misturar uma segunda amostra de células activadas possuindo receptores Mac-1 com uma quantidade pré-determinada de homólogo de D_{30} marcado para formar uma mistura de ligação;

(ii) manter a mistura de ligação formada no passo (i) durante um período de tempo pré-determinado para permitir que o homólogo de D_{30} marcado se ligue aos receptores Mac-1 e que se forme um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado;

(iii) determinar a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado, formado no passo (ii);

(iv) comparar as quantidades de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado determinadas nos passos (2) e (iii), detectando assim a quantidade de um homólogo de D_{30} na composição líquida.

Mistura-se uma primeira amostra de células activadas possuindo receptores Mac-1 com uma quantidade pré-determinada de uma composição líquida contendo um homólogo de D_{30} e uma quantidade pré-determinada de um homólogo de D_{30} marcado para formar uma mistura reaccional de competição.

As células activadas possuindo receptores Mac-1 na sua superfície celular preparam-se isolando neutrófilos polimorfonucleares, outros linfócitos ou leucócitos e activando-os com péptido quimiotáctico tal como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Para exemplos de protocolos de produção de células activadas possuindo receptores Mac-1 na sua superfície celular ver, Altieri et al., J. Cell Biol., 107:1893-1900 (1988) e Altieri et al., J. Clin. Invest., 78:968-976 (1986).

A célula activada contendo um receptor Mac-1 pode ser um neutrófilo, uma célula polimorfonuclear (PMN), uma célula de cultura de tecido estabelecida ou qualquer outra célula que se saiba conter o receptor Mac-1. As PMN isoladas de um doador humano e activadas como se descreve no exemplo 2 são preferidos.

Uma quantidade pré-determinada de uma composição líquida contendo um homólogo de D_{30} é uma quantidade de composição líquida contendo D_{30} que seja útil e facilmente testada. Mostrou-se que esta quantidade pré-determinada de composição líquida contendo homólogo de D_{30} é útil realizando uma série de ensaios teste com uma quantidade de composição líquida contendo uma concentração conhecida de homólogo de D_{30} , suficiente para permitir que se realize o ensaio. As quantidades preferidas de uma composição líquida estão entre cerca de 1 microlitro (μ l) e

cerca de 1000 μ l. Preferivelmente, a composição líquida contém cerca de 2,5 milimolar de cloreto de cálcio.

A composição líquida contém também um homólogo de D₃₀ marcado. Uma marcação é um átomo ou molécula que esteja directamente ou indirectamente envolvido na produção de um sinal detectável para indicar a presença de um complexo. Pode-se ligar ou incorporar qualquer marcação ou meio de indicação numa composição de proteína expressa, polipéptido, ou anticorpo, ou anticorpo monoclonal, do presente invento, ou utilizar separadamente, e podem-se utilizar estes átomos ou moléculas sózinhos ou em conjugação com reagentes adicionais. As marcações incluem várias marcações úteis in vivo, dentro do corpo de um paciente, tais como ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ⁶⁷Ga, ¹⁸⁶Re, e ¹³²I.

A marcação pode ser um agente de marcação fluorescente que se ligue quimicamente a anticorpos ou antigénios sem os desnaturar, para formar uma fluorescência (coloração) que seja um indicador imunofluorescente útil. Os agentes de marcação fluorescentes adequados são fluorocromos tais como isocianato de fluoresceína (FIC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloreto de 5-dimentilamin-1-naftalenosulfonilo (DANSC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), lissamina, cloreto de sulfonilo rodamina 8200 (RB 200 SC) e similares. Encontra-se uma descrição de técnicas de análise de imunofluorescência em Deluca "Immunofluorescence Analysis"; em Antibody As A Tool, Marchalonis et al., eds., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982), a qual se incorpora aqui como referência.

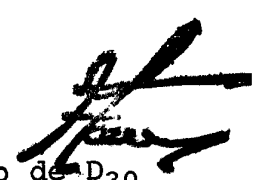
Em concretizações preferidas, a marcação é uma enzima, tal como peroxidase de rábano silvestre, (HRP), glucose-oxidase ou similares. Nestes casos, onde o grupo de indicação principal é uma enzima tal como a HRP ou a glucose-oxidase, são necessários reagentes adicionais para visualizar o facto de se ter formado um complexo receptor-ligando (imuno-reagente). Estes reagentes adicionais para a HRP incluem peróxido de hidrogénio e um precursor de um corante de oxidação, tal como a diaminobenzidina. Um reagente adicional útil com a glucose-oxidase é o

2,2'-azino-di(ácido 3-etil-4,2-benzotiazolino-G-sulfónico)
(ABTS).

Os elementos radioactivos também são úteis como marcações. Uma radiomarcagem ilustrativa é um elemento radioactivo que produz raios gama. Os elementos que emitem, eles próprios, raios gama, tais como ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{131}I , ^{132}I , e ^{51}Cr , representam uma classe de grupos de indicação de elementos radioactivos que produzem emissão de raios gama. O ^{125}I é particularmente preferido. Outro grupo de grupos de indicação útil, são os elementos tais como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N os quais emitem positrões. Os positrões assim emitidos produzem raios gama quando se encontram com electrões presentes no corpo dos animais. Um emissor beta, tal como o índio, também é útil.

A ligação das marcações, i.e., a marcação de polipéptidos e proteínas tais como um homólogo de D_{30} , é bem conhecida na arte. Por exemplo, podem-se marcar as moléculas de anticorpo produzidas por um hibridoma, por incorporação metabólica de aminoácidos contendo o radio-isótopo, fornecidos como um componente no meio de cultura. Ver, por exemplo, Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). As técnicas de conjugação ou acoplamento de proteínas através de grupos funcionais activados são particularmente aplicáveis. ver, por exemplo, Aurameas et al., Scand. J. Immunol., Vol. 8, 7:7-23 (1978), Rodwell et al., Biotech., 3:889-894 (1985), e Patente dos E.U. Nº 4.493.795, que se incorporam no presente invento como referência. Em adição, podem-se realizar reacções de acoplamento dirigidas a locais de modo a que a marcação não interfira substancialmente com a capacidade das moléculas de anticorpo para ligar o seu antigénio específico. Ver, por exemplo, Rodwell et al., Biotech., 3:889-894 (1985).

Mantém-se a mistura reaccional durante um período de tempo pré-determinado, suficiente para que o homólogo de D_{30} e o homólogo de D_{30} marcado, presentes na composição líquida, se liquem aos receptores Mac-1 e formem um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} e um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado.



A quantidade de tempo suficiente para que o homólogo de D₃₀ e o homólogo de D₃₀ marcado se liguem aos receptores Mac-1 depende de vários parâmetros físicos incluindo a temperatura e a concentração dos vários reagentes. Em concretizações preferidas, o período de tempo pré-determinado está entre cerca de 1 minuto e 24 horas. Em concretizações mais preferidas, o período de tempo pré-determinado está entre cerca de 10 minutos e cerca de 1 hora. Nas concretizações mais preferidas, o período de tempo pré-determinado é entre cerca de 15 minutos e cerca de 30 minutos. Tipicamente, este período de tempo é pré-determinado para otimizar o ensaio.

Tipicamente, mantém-se a mistura reaccional sob condições de ensaios biológicos que mantêm a actividade das moléculas de polipeptido e proteína incluindo o homólogo de D₃₀ e o receptor Mac-1 que se pretende testar, e incluem uma gama de temperaturas entre cerca de 4 graus C (4°C) e cerca de 45°C, uma gama de valores de pH entre cerca de 5 e cerca de 9 e uma força iónica variando entre a da água destilada e a de cloreto de sódio cerca de um molar. Os processos de optimização destas condições são bem conhecidos na arte.

Ensaia-se a presença de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado, formado mantendo a mistura reaccional no passo (2).

Os processos directos ou indirectos utilizados para testar quanto à presença, e preferivelmente à quantidade, de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado, formado, dependem da marcação particular utilizada e são bem conhecidos na arte. Por exemplo, pode-se determinar a quantidade de radioactividade no complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado.

Alternativamente, podem-se utilizar processos de ensaio homogéneos tais como os descritos nas patentes dos E.U. Nº 4 536 479; Nº 4 233 401; Nº 4 233 402 e Nº 3 996 345, cujas descrições se incorporam no presente invento como referência, para determinar a quantidade de complexo receptor Mac-1:D₃₀ formado no passo (2).

Noutras concretizações preferidas, o passo de ensaio (3) é um ensaio de competição. Nestas concretizações preferidas mistura-se uma segunda amostra de células activadas possuindo receptores Mac-1 com uma quantidade pré-determinada de homólogo de D₃₀ marcado para formar uma mistura de ligação.

Preferivelmente, a segunda amostra contendo o mesmo número de células activadas com a mesma concentração, mistura-se com o homólogo de D₃₀ marcado neste passo da mesma maneira que se misturaram com o homólogo de D₃₀ marcado e não marcado no passo (1). A utilização do mesmo número de células activadas no passo (1) e neste passo, permite a comparação fácil da quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado, formado em cada um dos passos. Preferivelmente, misturam-se cerca de 4×10^6 células activadas numa concentração de $1,5 \times 10^7$ células activadas por mililitro (ml) com o homólogo de D₃₀ marcado deste passo.

Mantém-se a mistura de ligação formada no passo (i) durante um período de tempo pré-determinado para permitir que o homólogo de D₃₀ marcado se ligue aos receptores Mac-1 e forme um complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado.

Preferivelmente, mantém-se a mistura de ligação formada no passo (i) durante o mesmo período de tempo pré-determinado e sob as mesmas condições de ensaio biológico que a mistura reaccional de competição no passo (2). Mantendo a mistura de ligação e a mistura reaccional de competição durante o mesmo período de tempo pré-determinado e sob as mesmas condições do ensaio biológico permite comparar facilmente as quantidades de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado determinadas no passo (3) e passo (iii).

Determina-se a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado formado no passo (ii).

Preferivelmente, o processo utilizado para determinar a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ marcado formado no passo (ii) é o mesmo processo que se utilizou para de-

terminar a quantidade de receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado no passo (3). Utilizando o mesmo processo de determinação tanto no passo (3) como neste passo, podem-se comparar facilmente as quantidades de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado formado em cada um dos passos.

Comparam-se as quantidades de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado determinadas no passo (3) e no passo (iii), detectando-se assim a presença de um homólogo de D_{30} na composição líquida.

Utiliza-se a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado, determinada no passo (iii) para determinar o valor de controlo de complexo marcado formado na ausência de homólogo de D_{30} . Subtrai-se então este valor de controlo à quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado, formado no passo (iii).

Se a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado determinada no passo (iii) for superior à quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado determinada no passo (3), então a composição líquida contém um homólogo de D_{30} .

Em concretizações preferidas, pré-determinou-se a quantidade de homólogo de D_{30} presente na composição líquida, necessária para produzir uma dada redução na quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado no passo (3). Tipicamente, pré-determina-se a redução no complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} marcado produzida por uma série de composições líquidas contendo várias quantidades conhecidas de um homólogo de D_{30} e usam-se para produzir uma curva padrão.

Noutras concretizações preferidas, o presente invento contempla outro processo de detecção da quantidade de um homólogo de D_{30} numa amostra líquida. Os passos deste processo incluem;

(1) misturar um anticorpo específico de D_{30} com uma quantidade pré-determinada de uma amostra líquida contendo um homólogo

de D₃₀ para formar uma mistura de imuno-reacção;

(2) manter a mistura de imuno-reacção formada no passo (1) durante um período de tempo pré-seleccionado, suficiente para que o homólogo de D₃₀ presente na amostra líquida se ligue ao anti-corpo e forme um complexo de imuno-reacção contendo um homólogo de D₃₀ e um anticorpo específico de D₃₀; e

(3) determinar a quantidade de complexo de imuno-reacção, formado no passo (2), detectando-se a quantidade de um homólogo de D₃₀ dentro da amostra líquida.

Mistura-se um anticorpo específico de D₃₀ (um anticorpo anti-D₃₀) com uma quantidade pré-determinada de uma amostra líquida contendo um homólogo de D₃₀ para formar uma mistura imuno-reaccional.

Um anticorpo específico de D₃₀ é capaz de se ligar imunologicamente com um fragmento D₃₀ de fibrinogénio mas não liga outros fragmentos do fibrinogénio. Tal como a extremidade N da cadeia α até ao aminoácido 130 ou a extremidade N da cadeia β até ao aminoácido 130 ou a extremidade C extrema da cadeia gama. Preferivelmente, o anticorpo específico de D₃₀ liga o local de ligação de D₃₀ do Mac-1 presente no D₃₀ e inibe assim a ligação do homólogo de D₃₀ ao receptor Mac-1 por meio do local de ligação de D₃₀ do Mac-1.

O local de ligação de D₃₀ do Mac-1 é a porção do D₃₀ que se liga pelo receptor Mac-1. Os fragmentos derivados de, ou homólogos de D₃₀, podem conter um local de ligação de D₃₀ do Mac-1.

A produção de anticorpos tanto policlonais como monoclonais, contra polipéptidos e proteínas, é bem conhecida na arte. Por exemplo, ver o exemplo 3 desta descrição e Antibodies: A Laboratory Manual, Harlowe e Lane, Eds., Cold Spring Harbor, NY (1988).

Em concretizações preferidas, o anticorpo específico de D₃₀ é um anticorpo monoclonal produzido por um hibridoma ou por

vários processos de engenharia genética. Ver por exemplo, Huse et al., Science, 246:1275 (1989).

Preferivelmente, a amostra líquida contendo um homólogo de D_{30} é uma amostra de um, fluido biológico tal como sangue, plasma, soro, espectoração, saliva e similares. Preferivelmente, a quantidade da amostra líquida misturada é conhecida.

Preferivelmente, o anticorpo anti- D_{30} é marcado, i.e., está operativamente ligado a um meio de indicação tal como uma enzima, um radionuclido e similares.

Preferivelmente, o anticorpo anti- D_{30} está presente como parte do suporte sólido, i.e., está operativamente ligado a uma matriz sólida, de modo que a mistura imuno-reaccional formada é um sólido e uma fase líquida. Em adição, prefere-se que a quantidade de anticorpo anti- D_{30} presente na mistura imuno-reaccional contenha um excesso de locais de combinação do anticorpo em relação à quantidade de homólogo de D_{30} presente na amostra líquida.

Mantém-se a mistura imuno-reaccional durante um período de tempo pré-determinado suficiente para que o homólogo de D_{30} presente na amostra líquida se ligue ao anticorpo e forme um complexo de imuno-reacção contendo um homólogo de D_{30} e um anticorpo anti- D_{30} .

Tipicamente, mantém-se a mistura imuno-reaccional sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo tal como entre cerca de 10 minutos e cerca de 20 horas, a uma temperatura de cerca de 4°C a cerca de 45°C , sendo este tempo suficiente para que o homólogo de D_{30} presente na amostra líquida imuno-reaça com (se ligue imunologicamente) uma porção dos locais de combinação do anticorpo anti- D_{30} no anticorpo anti- D_{30} para formar um produto de imuno-reacção contendo homólogo de D_{30} .

As condições de ensaio biológico são as condições que mantêm a actividade biológica dos reagentes imunoquímicos deste invento

e o local do homólogo de D_{30} a ensaiar. As condições de ensaio biológico incluem uma temperatura de cerca de 4°C até cerca de 45°C , um valor do reagente na gama de cerca de 5 a cerca de 9 e uma força iónica variando entre a da água destilada e a de cloreto de sódio cerca de 1 molar. Os processos de optimização destas condições são bem conhecidos na arte.

Determina-se a quantidade do complexo de imuno-reacção contendo D_{30} , formado no passo (2), detectando-se assim a presença de um homólogo de D_{30} dentro da amostra líquida.

A determinação da quantidade do produto de imuno-reacção contendo homólogo de D_{30} , directa ou indirectamente, pode-se conseguir utilizando técnicas de ensaio bem conhecidas na arte, e depende, tipicamente, do tipo de meio de indicação utilizado.

Nos processos de ensaio competitivo preferidos, relaciona-se a quantidade de produto determinada no passo (3), com a quantidade de produto de imuno-reacção, similarmente formado e determinado utilizando uma amostra líquida de controlo em vez da amostra líquida, em que a amostra líquida de controlo contém, uma quantidade conhecida de um homólogo de D_{30} .

O presente invento contempla também um processo de detecção da quantidade de um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} numa composição líquida. Este processo compreende os passos de:

(1) misturar um anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D_{30}) capaz de se ligar especificamente a um complexo Mac-1:homólogo de D_{30} , com uma quantidade pré-determinada de uma amostra líquida contendo um anticorpo do complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} para formar uma mistura imuno-reaccional;

(2) manter a mistura imuno-reaccional durante um período de tempo pré-determinado, suficiente para que o complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} presente na amostra líquida se ligue ao anticorpo e forme um complexo de imuno-reacção contendo o complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} e o anticorpo anti-(complexo

Mac-1:homólogo de D₃₀); e

(3) determinar a quantidade do complexo de imuno-reacção formado, detectando-se assim a presença de um complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ dentro da amostra líquida.

A detecção da quantidade de presença de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ numa amostra líquida ou composição, obtida de um animal, é útil porque a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ presente correlaciona-se com a quantidade de receptor Mac-1 ligado ao homólogo de D₃₀ e com a quantidade de inflamação mediada pelo receptor Mac-1 presente nesse animal.

A determinação da quantidade de inflamação presente ou da quantidade de receptor Mac-1 ligado por um homólogo de D₃₀ é importante no controlo do estado clínico de um paciente que esteja a ser tratado com um homólogo de D₃₀ ou outros compostos imuno-moduladores.

Preferivelmente, a amostra líquida é uma quantidade conhecida de um fluido corporal tal como sangue ou um produto derivado do sangue tal como o soro ou o plasma.

Preferivelmente, a quantidade de anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D₃₀) é conhecida e contém uma quantidade em excesso de locais de combinação do anticorpo imuno-específicos para um complexo Mac-1:homólogo de D₃₀. Um anticorpo imuno-específico para um complexo Mac-1:homólogo de D₃₀ imuno-reage com o complexo mas não com o Mac-1 ou com um homólogo de D₃₀ isolados. A produção de anticorpos imuno-específicos para um complexo e não para os componentes individuais de um complexo é conhecida. Por exemplo, ver o exemplo 7. São ainda preferidas as concretizações onde o anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D₃₀) é marcado, i.e., está operativamente ligado a um meio de indicação tal como uma enzima, radionuclido e similares.

Preferivelmente, o anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D₃₀) está presente como parte de um suporte sólido, i.e., está

operativamente ligado a uma matriz sólida, de modo que a mistura imuno-reaccional formada é um sólido e uma fase líquida.

Mantém-se a mistura imuno-reaccional durante um período de tempo pré-determinado suficiente para que o complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ presente na amostra líquida se ligue ao anticorpo e forme um complexo de imuno-reacção contendo o complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ e o anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D₃₀).

Preferivelmente, mantém-se a mistura imuno-reaccional sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo pré-determinado tal como de cerca de 10 minutos a cerca de 20 horas, a uma temperatura de cerca de 4°C a cerca de 45°C, sendo este tempo suficiente para que o complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ presente na composição líquida imuno-reaça com (se ligue imunologicamente com) uma porção dos locais de combinação do anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D₃₀) no anticorpo, para formar um produto de imuno-reacção contendo o complexo Mac-1:homólogo de D₃₀.

As condições de ensaio biológico são as que mantêm a actividade biológica dos reagentes imuno-químicos deste invento e do complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ que se pretende testar. Estas condições incluem uma temperatura de cerca de 4°C até cerca de 45°C, um valor de pH na gama de cerca de 5 a cerca de 9, numa força iónica variando entre a da água destilada e a do cloreto de sódio cerca de 1 molar. Os processos de optimização destas condições são bem conhecidos na arte. Detecta-se a quantidade do complexo de imuno-reacção contendo o complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀, detectando-se assim a presença de um complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ dentro da amostra líquida.

A determinação da quantidade do produto de imuno-reacção contendo complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀ formado, ou directamente ou indirectamente, pode-se realizar por técnicas de ensaio bem conhecidas na arte, e depende, tipicamente do tipo de

meio de indicação utilizado.

G. Detecção de receptores Mac-1 in vivo

Está contemplado um processo de detecção da presença e preferivelmente da quantidade e localização das células possuindo receptores Mac-1 num mamífero. Administra-se parentericamente a um sujeito humano uma quantidade eficaz de uma composição contendo um diluente fisiologicamente tolerável e uma quantidade de homólogo de D₃₀ ligado a um meio de indicação in vivo. A administração parentérica inclui administração intramuscular, administração intravenosa, e administração noutros locais do corpo, tais como no fluido sinovial. A quantidade de composições administrada é suficiente para ligar uma quantidade detectável de receptores Mac-1. Em concretizações preferidas, o homólogo de D₃₀ é um fragmento D₃₀.

Quando utilizados no presente invento, os termos "marcação" e "meio de indicação", nas suas várias formas gramaticais, referem-se a átomos simples e moleculares que estejam directa ou indirectamente envolvidos na produção de um sinal detectável para indicar a presença de um complexo. As marcações ou meios de indicação "in vivo" são aqueles que são úteis dentro do corpo de um sujeito humano. Pode-se ligar ou incorporar qualquer marcação ou meio de indicação numa molécula de proteína expressa, de polipéptido, ou de anticorpo que seja parte de uma composição de anticorpos ou anticorpos monoclonais do presente invento, ou usar separadamente, e podem-se utilizar estes átomos ou moléculas sózinhos ou em conjunção com reagentes adicionais. Estas marcações são, por si próprias, bem conhecidas na química de diagnóstico clínico e constituem uma parte deste invento apenas desde que se utilizem com outros sistemas e/ou processos de proteínas novos.

A ligação de marcações, i.e., a marcação de polipéptidos e proteínas é bem conhecida na arte. Por exemplo, podem-se marcar moléculas de anticorpos produzidas por um hibridoma, por incorporação metabólica de aminoácidos contendo um radio-isótopo fornecidos como um componente no meio de cultura. Ver, por exem-

plo, Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). As técnicas de conjugação ou acoplamento de proteínas através de grupos funcionais activados são particularmente aplicáveis. Ver, por exemplo, Aurameas et al., Scand. J. Immunol., Vol. 8, 7:7-23 (1978), Rodwell et al., Biotech., 3:889-894 (1984) e Patente dos E.U. Nº 4 493 795.

Mantém-se então o sujeito durante um período de tempo pré-determinado, suficiente para que o homólogo de D₃₀ se ligue aos receptores Mac-1 presentes nas células do sujeito humano e forme um complexo receptor Mac-1:homólogo de D₃₀. Preferivelmente, pré-determinou-se este período de tempo para otimizar a formação dos complexos receptores Mac-1:homólogo de D₃₀.

Ensaaiou-se então o sujeito quanto à presença, e preferivelmente, a localização de quaisquer complexos receptores Mac-1:homólogo de D₃₀ formados.

Exemplos

Pretende-se que os exemplos seguintes ilustrem, mas não limitem, o presente invento.

1. Preparação do fragmento D₃₀ de fibrinogénio de plasma

A. Purificação do fibrinogénio de plasma

Isolou-se fibrinogénio a partir de plasma fresco por procedimentos de fraccionamento em etanol frio. A um volume de plasma adicionou-se 0,22 volumes de etanol a 50%, frio, pH 7,0, o que baixou a temperatura para -3°C. Centrifugou-se a mistura e lavou-se o precipitado resultante com 0,5 volumes (volume original, VO) de etanol a 7%, pH 6,5 a -3°C. Recolheu-se o precipitado e dissolveu-se em 0,25 VO de tampão de citrato trissódico 0,55 M, pH 6,5 a 30°C. Arrefeceu-se a solução resultante a zero °C e fez-se precipitar o fibrinogénio pela adição de etanol a 20% frio, até uma concentração final de 8% para formar fibrinogénio purificado.



B. Digestão proteolítica do fibrinogénio purificado

Dissolveu-se cinquenta miligramas (mg) de fibrinogénio purificado em 1 ml de uma solução de TBS contendo Tris HCL 0,01 M, NaCl 0,14 M, pH 7,4 e fez-se digerir proteoliticamente por plasminogénio activado por estreptoquinase (plasmina) de acordo com o procedimento seguinte.

Preparou-se o plasminogénio activado por estreptoquinase misturando plasminogénio (KABI, 20 unidades (U)) a 2 ml com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 e pré-incubando durante 10 minutos a 37°C com 500 U de estreptoquinase (Streptase, Behring). Adicionou-se então esta solução com uma concentração final de 18 microgramas por ml ($\mu\text{g/ml}$) à solução de fibrinogénio purificado em ureia 2 M.

Manteve-se a mistura durante 2 horas a 37°C. Terminou-se a reacção proteolítica na mistura pela adição de Trasilol 50.000 U/ml (Sigma, St. Louis, MO). Dialisou-se extensivamente a solução resultante de fragmentos de fibrinogénio, contra uma solução de TBS, durante 24 horas a 4°C. Mudou-se o tampão de diálise em cada 8 horas. Recuperou-se então a solução dialisada e aplicou-se numa coluna de Sephadex G-100 (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ). A cromatografia em coluna realizou-se para separar os fragmentos resultantes da digestão proteolítica do fibrinogénio. Pré-lavou-se a coluna com um tampão corrente de TBS seguido da aplicação dos fragmentos de fibrinogénio dialisados. Recolheram-se fracções de 3 ml e determinaram-se as massas moleculares dos fragmentos separados por electroforese em gel de poliacrimida-dodecil-sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) com e sem redução por mercaptoetanol a 3%.

Visualizaram-se três fragmentos de diferentes massas moleculares por coloração do gel com azul de Coomassie. Os fragmentos X, D, e E tinham massas moleculares, respectivamente, de aproximadamente 240 000, 85 000, e 50 000 sob condições não redutoras. Reuniram-se separadamente as fracções correspondentes aos três picos separados, dialisaram-se contra água destilada, e



concentraram-se por liofilização.

C. Digestão proteolítica do fragmento D para produzir um homólogo de D₃₀

Fez-se digerir o fragmento D de fibrinogénio com uma massa molecular de 80 000 (80 KDa), purificado e concentrado, com plasmina em ureia 2 M durante 24 horas a 37°C, como se descreveu no exemplo 1B. Terminou-se a digestão e dialisou-se a solução resultante como se descreveu no exemplo 1B. Recuperou-se a solução dialisada e isolaram-se os produtos da digestão por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) numa mono-coluna-Q (Pharmacia) equilibrada em fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0. Eluíram-se os fragmentos com uma solução de fosfato de sódio 0,01 M e cloreto de sódio 1 M, pH 7,0. Analisou-se a pureza das proteínas eluídas nas fracções recolhidas em 15% SDS-PAGE sob condições não redutoras. A coloração do gel com azul de Coomassie revelou um fragmento de 30 kDa com homogeneidade superior a 90%. O produto purificado da digestão proteolítica do fragmento D, possuindo um kDa de 30 chamou-se D₃₀. Reuniram-se as fracções dos picos contendo D₃₀ e concentraram-se por liofilização para produzir um homólogo de D₃₀.

2. Ligação do D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do receptor Mac-1

A. Marcação de um homólogo de D₃₀

Dissolveu-se iodogénio em diclorometano até uma concentração final de 1 µg/ml e secou-se 170 µl de iodogénio dissolvido no fundo de um tubo de vidro. Ressuspendeu-se um homólogo de D₃₀, nesta altura purificado como se descreveu no exemplo 1C, em tampão citrato de sódio 0,055 M, pH 7,4, até uma concentração final de 5 µg/ml e colocou-se 200 µl de solução de D₃₀ dissolvido num tubo revestido de iodogénio com 700 µCi de iodeto de sódio isento de transportador. Manteve-se a mistura em gelo durante 20 minutos com agitação ocasional. Para parar a reacção de iodação, removeu-se a mistura do tubo e filtrou-se em gel, numa coluna de

Sepharose G-25 grosseira (100 x 2,5). Determinaram-se as frações de homólogo de D₃₀ iodado por contagem do ácido tricloroacético precipitável. Radiomarcou-se o homólogo de D₃₀ marcado produzido até uma actividade específica de $4,5 \times 10^5$ contagens por minuto por μg de homólogo de D₃₀.

B. Preparação das células

Recolheu-se sangue após o consentimento informado de voluntários normais não medicados e anticoagulou-se com uma mistura de ácido cítrico 0,14 M, citrato tri-sódico 0,2 M, e dextrose 0,22 M. Centrifugou-se o sangue anticoagulado a 800 x g durante 15 minutos à temperatura ambiente e rejeitou-se o plasma sobrenadante rico em plaquetas. Ressuspendeu-se a pelota de eritrócitos, células mononucleares e polinucleares, e diluiu-se com um volume igual ao volume inicial de sangue com PBS 0,14 M, pH 7,4 arrefecido. Esgotaram-se as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) da suspensão de células diluída por centrifugação em endotoxina baixa Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) a 400 x g durante 10 minutos a 18°C.

Recuperaram-se então as células polinucleares (neutrófilos) na suspensão de células esgotadas com PBMC por sedimentação de dextrano. Ressuspendeu-se a pelota de células resultante, contendo neutrófilos, a uma concentração de $1,5 \times 10^7$ células/ml em RPMI 1640 isento de soro (Irvine Scientific, Irvine, CA) suplementado com Hepes 20 mM (Calbiochem Boehringer, La Jolla, CA) na presença de cloreto de cálcio 2,5 mM e D-fenil-1-propil-1-arginina clorometilo 100 mM (PPack; Calbiochem Boehringer, La Jolla, CA). Manteve-se a suspensão de células ressuspensas em gelo e utilizou-se dentro de duas horas após o isolamento.

C. Ensaio de ligação com homólogo de D₃₀ iodado e células estimuladas

Estimularam-se aliquotas separadas dos neutrófilos possuindo receptores Mac-1 ressuspensos, com 10 μM do péptido quimiotáctico formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, Sigma) imediatamente

antes de se misturarem com concentrações crescentes de homólogo de D_{30} marcado com ^{125}I , como anteriormente se descreveu. A concentração de D_{30} na mistura variou entre 1 $\mu g/ml$ até 20 $\mu g/ml$. Manteve-se a mistura durante 20 minutos à temperatura ambiente tempo após o qual se atingiu o equilíbrio. Centrifugaram-se então as aliquotas das misturas através de uma mistura de óleos de sílício a 12 000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente para separar o D_{30} livre do D_{30} ligado aos neutrófilos. Determinou-se a radio-actividade total associada às células por detecção num contador gama.

Calculou-se a ligação específica associada às células, de D_{30} , subtraindo a radioactividade associada às células que resultou em misturas mantidas na presença de um excesso molar de 100 vezes de D_{30} não marcado ou fibrinogénio, da radioactividade total. Os resultados absolutos ou específicos da reacção de ligação de D_{30} iodado aos neutrófilos mostram-se na figura 2, onde cada ponto representa a média $\pm$ o erro padrão de média (SEM) de três experiências independentes. Os resultados mostram que suspensões de neutrófilos possuindo receptores Mac-1 estimulados ligados a D_{30} iodado numa reacção específica e saturável se aproximam do estado estacionário para 15-20 $\mu g/ml$ de D_{30} iodado adicionado com a associação de aproximadamente $136\,200 \pm 15$ moléculas de D_{30} ligadas a cada célula. Realizaram-se análises similares com aliquotas de uma linha celular cultivada, monocítica, THP-1, com número de acesso no ATCC TIB 202, com resultados quantitativamente idênticos aos obtidos com linfócitos.

Confirmou-se a ligação de D_{30} iodado ao Mac-1 em suspensões estimuladas com fMLP, de neutrófilos, realizando ensaios de inibição com anticorpos monoclonais descritos no presente invento. Incubou-se uma suspensão de neutrófilos a $1,5 \times 10^7$ células/ml, que se preparou como se descreveu no exemplo 1B, com concentrações saturantes de um anticorpo monoclonal dirigidos contra epítomos nas subunidades α e β do receptor Mac-1 durante 30 minutos à temperatura ambiente. Tratou-se então a suspensão de células incubadas com o anticorpo monoclonal, com fMLP 10 μM , como se descreveu no exemplo 1B. Equilibrou-se então a suspensão de

células estimuladas com $^{125}\text{I-D}_{30}$ 5 $\mu\text{g/ml}$, na presença de CaCl_2 2,5 mM e PPACK 100 μM durante um período adicional de 20 minutos à temperatura ambiente. Terminou-se a reacção de ligação como se descreveu anteriormente.

Os anticorpos monoclonais testados quanto à sua capacidade para inibir a ligação de D_{30} ao Mac-1 incluíram os seguintes: OKM1, M 1/70 e 60,1, que são dirigidos contra diferentes epítopos da subunidade α do receptor Mac-1; 60,3 e IB4, que são dirigidos contra a subunidade β do receptor Mac-1. Utilizou-se a anti-classe I MHC W6/32 como o anticorpo de controlo. Encontram-se descrições dos anticorpos OKM1, M 1/70, e 60,1, respectivamente, em Wright et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:5699-5703 (1983), Ho et al., J. Biol. Chem., 258:2766-2769 (1983), e Wallis et al., Blood, 67:1007-1013 (1986). Os anticorpos contra a subunidade beta estão descritos em Price et al., J Immunol., 139:4174-4177 (1987).

Calculou-se a ligação específica de D_{30} aos neutrófilos possuindo receptores Mac-1 estimulados e a inibição da ligação por tratamento com anticorpos monoclonais, como se descreveu anteriormente. O OKM1 e o M 1/70, ambos dirigidos contra a subunidade α do Mac-1, aboliram completamente a ligação do $^{125}\text{I-D}_{30}$ aos neutrófilos na suspensão estimulada com fMLP. Em contraste, os anticorpos monoclonais que reagem com um epítipo diferente na subunidade α , 60,1, ou contra a subunidade β , 60,3 e IB4, não interferiram com a ligação do $^{125}\text{I-D}_{30}$ ao Mac-1.

3. Preparação de anticorpos monoclonais anti- D_{30}

O D_{30} obtém-se e ressuspende-se como se descreveu nos exemplos 1C e 2A, respectivamente. Imunizam-se ratinhos Balb/c ByJ (Scripps Clinic and Research Foundation Vivarium, La Jolla, CA) por via intraperitoneal (i.p.) com 50 μg de imunogénios de D_{30} preparados em adjuvante de Freund completo (CFA) seguida por uma segunda e terceira imunizações utilizando o mesmo imunogénio de D_{30} , cada uma delas separadas cerca de três semanas, em adjuvante de Freund incompleto (IFA). o ratinho recebe uma injeção de

reforço de 50 μ g de imunogénio de D₃₀ preparado, por via intravenosa (i.v.) em solução salina normal 4 dias antes da fusão e uma segunda perfusão de reforço similar, um dia depois.

Sacrificam-se os animais assim tratados e colhem-se os baços de cada ratinho. Prepara-se então uma suspensão de células do baço. Extractam-se então as células do baço da suspensão de células do baço por centrifugação durante cerca de 10 minutos a 1000 r.p.m., a 23°C. Após a remoção do sobrenadante, ressuspende-se a pelota de células em 5 ml de tampão de lise NH₄Cl frio, e incubam-se durante cerca de 10 minutos.

Misturam-se com a suspensão de células lisadas 10 ml de Meio de Eagle Modificado com Dulbecco (DMEM) (GIBCO) e tampão HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperidinoetano-sulfónico], e centrifuga-se esta mistura durante cerca de 10 minutos a 1000 r.p.m. a 23°C.

Decanta-se o sobrenadante, ressuspende-se a pelota em 15 ml de DMEM e HEPES, e centrifuga-se durante cerca de 10 minutos a 1000 r.p.m. a 23°C. Repete-se o procedimento anterior.

Ressuspende-se então a pelota em 5 ml de DMEM e HEPES. Remove-se então uma alíquota da suspensão de células do baço para contagem. As fusões conseguem-se da seguinte maneira, utilizando a linha celular de mieloma de ratinho não segregadoras, P3X63Ag8.653.1, um sub-clone da linha P3X63Ag 8.653 (ATCC 1580). Utilizando uma razão de mieloma para células do baço de cerca de 1 para 10 ou de cerca de 1 para 5, centrifuga-se uma quantidade suficiente de células de mieloma numa pelota, lava-se duas vezes em 15 ml de DMEM e HEPES, e centrifuga-se durante 10 minutos a 1000 r.p.m. a 23°C.

Combinam-se as células do baço e as células de mieloma em tubos de 15 ml de fundo redondo. Centrifuga-se a mistura celular durante 10 minutos a 1000 r.p.m. a 23°C, e remove-se o sobrenadante por aspiração. Depois, misturam-se 200 μ l de polietileno-glicol de peso molecular de 4000, aquoso, a 50 por cento (peso

por volume) (PEG; ATCC Baltimore, MD) a cerca de 37°C, utilizando uma pipeta de 1 ml, com agitação vigorosa para romper a pelota, e misturam-se cuidadosamente as células durante entre 15 e 30 segundos. Centrifuga-se a mistura celular durante 4 minutos a 700 r.p.m..

A cerca de 8 minutos do tempo da adição do PEG, adicionam-se 5 ml de DMEM e tampão HEPES, lentamente, à pelota, sem perturbar as células. Após 1 minuto, dispersa-se a mistura resultante com uma pipeta de 1 ml, e incuba-se durante um período adicional de 4 minutos. Centrifuga-se esta mistura durante 7 minutos a 1000 r.p.m.. Decanta-se o sobrenadante, adiciona-se lentamente à pelota, 5 ml de meio HT (hipoxantina/timina), e mantém-se a mistura em repouso durante 5 minutos. Rompe-se então a pelota em pedaços grandes e coloca-se a suspensão celular final em frascos T75 (2,5 ml por frasco) nos quais se tinha colocado previamente 7,5 ml de meio HT. Incuba-se a suspensão celular resultante a 37°C para que as células fundidas cresçam. Após 245 horas, adicionam-se 10 ml de meio HT aos frascos, seguido de adição de 0,3 ml de aminopterina 0,04 mM, 6 h mais tarde. A 48 h após a fusão, adicionam-se aos frascos 10 ml de meio HAT (hipoxantina/aminopterina/timina).

Três dias após a fusão, plaqueiam-se as células viáveis em placas de cultura de tecidos de 96 alvéolos a cerca de 2×10^4 células viáveis por alvéolo (total de 768 alvéolos) em meio tampão HAT, como descrito em Kennett et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81:77 (1978). Alimentam-se as células sete dias após a fusão com meio HAT e depois a intervalos de aproximadamente 4-5 dias, na medida do necessário, com meio HT. Segue-se o crescimento microscopicamente, e recolhem-se os sobrenadantes da cultura cerca de duas semanas mais tarde e testam-se quanto à presença de anticorpos específicos de D₃₀ por radio-imunoensaio (RIA) na fase sólida.

Resumidamente, mistura-se 50 µl de PBS contendo 5 µg/ml do imunogénio de D₃₀ preparado nos alvéolos de placas de microtitulação. Mantém-se as placas durante a noite (cerca de 16 horas) a

4°C para permitir que o imunogénio de D₃₀ adira às paredes dos alvéolos. Após lavagem dos alvéolos quatro vezes com tampão SPRIA (KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,03 mM, Tween-20 0,05%, Traysol 0,1 KIU/ml, BSA 0,1%, NaN₃ 0,015%), adiciona-se 200 µl de tampão SPRIA contendo 3% de soro de cabra normal (NGS) e 3% de albumina de soro bovino (BSA), a cada alvéolo para bloquear os locais de ligação da proteína em excesso. Mantém-se as placas durante 30 minutos a 20°C, esvaziam-se os alvéolos por agitação, e secam-se para formar em suporte sólido, i.e., uma matriz sólida na qual o imunogénio de D₃₀ está operativamente fixo.

Adiciona-se então a cada alvéolo, 50 µl de sobrenadante da cultura de tecidos de hibridoma para formar uma mistura imuno-reaccional sólido-fase líquida. Mantém-se a mistura durante 2 horas a 37°C para permitir a formação dos produtos de imuno-reacção na fase sólida. Após lavagem dos alvéolos como se descreveu anteriormente, adicionaram-se a cada alvéolo 50 µl de IgG de cabra anti-ratinho, marcada com ¹²⁵I, a 0,25 µg de proteína por ml, para formar uma mistura reaccional de marcação. Realiza-se a radio-iodação de IgG de cabra anti-ratinho, purificada imuno-quimicamente, de forma enzimática, utilizando o procedimento de iodação do iodogénio como se descreveu no exemplo 2A. Mantém-se esta mistura durante 1 hora a 37°C para permitir a formação de produtos da imuno-reacção na fase sólida marcados com ¹²⁵I. Após lavagem dos alvéolos como se descreveu anteriormente, determina-se a quantidade de produto marcado com ¹²⁵I ligado a cada alvéolo por detecção gama.

Seleccionam-se os hibridomas das culturas de hibridomas que segregam anticorpos anti-D₃₀ para seu meio de cultura, e caracterizam-se ainda como se descreve no presente invento.

4. Produção e purificação de moléculas de anticorpo de D₃₀

Faz-se a cultura de hibridoma anti-D₃₀ numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37°C em DMEM contendo L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 µg por ml, soro de bovino fetal 10%, soro de cavalo 10%, todos da Grand Island Biological Co., Lawrence, MA, meio

NCTC 10% da Microbiological Associates, Rockville, MD, hipoxantina 1 mM e timidina 0,3 mM, ambos da Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO. Mantém-se a concentração celular na gama de cerca de $1-2 \times 10^5$ células por ml de meio e cerca de $1-2 \times 10^6$ células por ml de meio, para o crescimento das células, divisão, e produção de anticorpos.

Para produzir fluidos de tumor ascítico contendo moléculas de anticorpo anti-D₃₀, sensibilizam-se imunologicamente ratinhos Balb/c de 10 semanas de idade por injeção intraperitoneal com 0,3 ml de óleo mineral e subsequentemente injectam-se intraperitonealmente com $3-5 \times 10^5$ células de hibridoma anti-D₃₀. Mantém-se então os ratinhos inoculados durante um período de tempo suficiente para se acumularem fluidos de tumor ascítico contendo anticorpos anti-D₃₀, p.ex., durante cerca de 10 a cerca de 21 dias. Recolhe-se o fluido ascítico e clarifica-se por centrifugação a $15\ 000 \times g$ durante 1 hora a 4°C e armazena-se congelado a -20°C.

Isolam-se as moléculas de anticorpo anti-D₃₀ do fluido ascítico submetendo o fluido a cromatografia líquida de proteínas rápida (FPLC) numa coluna de permuta aniónica Pharmacia Mono QHR 5/5 num Sistema Pharmacia FPLC (ambos da Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ), utilizando um gradiente 0-0,5 M de NaCl em Tris 10 mM, pH 8,0, e seguindo as instruções fornecidas com a coluna. Podem-se então transferir as moléculas de anticorpo anti-D₃₀ assim isoladas para qualquer diluente fisiologicamente tolerável, desejado para diálise.

Alternativamente, podem-se isolar as moléculas de anticorpo anti-D₃₀ do fluido de tumor ascítico por precipitação com sulfato de amónio, de acordo com o processo descrito por Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, p100-101 (1983). Resumidamente, este processo compreende a adição lenta de sulfato de amónio saturado ao fluido de tumor ascítico até se atingir uma concentração entre cerca de 45% e cerca de 50% de sulfato de amónio. Recolhem-se então as imunoglobulinas precipitadas, por centrifugação a $2\ 000 \times g$, preferivelmente, a

10 000 x g. Lava-se o precipitado 2 ou 3 vezes com 40% de sulfato de amónio saturado. Dialisam-se então as moléculas de anticorpo anti-D₃₀ precipitadas, contra 500-1000 volumes de solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou qualquer outro diluente fisiologicamente tolerável que se deseje, para remover o sulfato de amónio. Muda-se o fluido da diálise várias vezes, a intervalos de algumas horas. Determina-se a concentração da proteína da solução de anticorpos anti-D₃₀ dialisada, recuperada, pelo processo de Lowry [Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)] utilizando uma albumina de soro bovino padrão.

5. Preparação de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀)

Emulsionam-se trezentas µg da solução dialisada recuperada contendo anticorpos monoclonais anti-D₃₀, obtida como no exemplo 4, em CFA, e injectam-se por via subcutânea em múltiplos locais ao longo da cadeia mamária de um coelho branco fêmea de Nova Zelândia que se pré-sangrou para se obter soro pré-imune. Realiza-se a purificação do soro pré-imune como se descreve seguidamente. Dão-se duas injeções de reforço intramusculares de 100 µg de anticorpo em PBS nos dias 7 e 30, e recolhem-se os soros 10 dias mais tarde. Absorvem-se extensivamente os soros obtidos sobre Ig de ratino reunido (Cappel Laboratories, Cochranville, PA), seguido de IgG2a e IgG2b de ratinho acoplado a Sepharose 4B (Pharmacia Chemicals). Quando não se pode eluir mais proteína destes imuno-adsorventes com ácido acético 0,5N, adsorve-se o fluxo directo e elui-se com 5 mg de anticorpos monoclonais anti-D₃₀ purificados, preparados como se descreveu no exemplo 4, acoplado a Sepharose 4B. Concentra-se o eluido por sulfato de sódio até uma concentração final de 18% (p/vol), dialisa-se contra PBS, e armazena-se a 4°C até se utilizar. A imunoglobulina eluida da coluna detecta-se por um radio-imunoensaio (RIA).

Utiliza-se um RIA na fase sólida para medir a ligação de anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) purificado aos anticorpos monoclonais anti-D₃₀ fixos. Diluem-se os anticorpos monoclonais anti-D₃₀ (de 1:1 000 a 1:16 000, dependendo da concentração do fluido ascítico) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 8,9), e

adicionam-se porções de 25 μ l a alvéolos de placas de polivinilo de microtitulação (Dynatech Laboratories). Deixam-se secar estes anticorpos nos alvéolos por incubação durante a noite a 37°C. Bloqueiam-se os locais de ligação livres nos alvéolos durante pelo menos 1 hora, com um soro de cavalo gama a 10% (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) dissolvido em PBS contendo 0,08% de azida de sódio. Adicionam-se diluições (25 μ l) de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀), e após 1 hora à temperatura ambiente, lavam-se extensivamente as placas.

Detectam-se os anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) ligados adicionando 25 μ l ((30 000 cpm) de IgG de cabra anti-coelho, marcada com ¹²⁵I (Cappel Laboratories, Downington, PA) marcada pelo processo do iodogénio, como se descreveu no exemplo 2A. Mantém-se a mistura durante um período adicional de 1 hora à temperatura ambiente. Todas as diluições de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) ou sondas radiomarcadas são feitas em soro de cavalo gama a 10% dissolvido em PBS contendo 0,08% de azida de sódio. Lavam-se placas isentas de sonda não ligada, e mede-se a radioactividade ligada a cada alvéolo com um contador gama e compara-se com a radioactividade ligada a alvéolos nos quais se utilizou soro pré-imune de controlo em vez de anticorpos monoclonais anti-D₃₀.

As composições de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) monoclonais também são geradas por imunização de ratinhos Balb/c, como se descreveu no exemplo 3, com anticorpos monoclonais anti-D₃₀ preparados como se descreveu anteriormente. Realizam-se injeções e fusões subsequentes, como se descreveu no exemplo 3. A detecção de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) segregados por hibridomas realiza-se como se descreve seguidamente. A produção e a purificação de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) realiza-se como se descreveu no exemplo 4.

A confirmação da especificidade funcional de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) na amostra de soro ou no sobrenadante da cultura de hibridomas, determina-se em ensaios de ligação a linfócitos de expressão do receptor Mac-1, como descrito no exemplo 2, ou em ensaios de competição, como se descreve seguidamente

no exemplo 6.

6. Competição da ligação de fragmentos D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1 em neutrófilos

Purificou-se o fibrinogénio como se descreveu no exemplo 1 e radiomarcou-se como se descreveu para o D₃₀ no exemplo 2A. Prepararam-se os neutrófilos possuindo receptores Mac-1, como se descreveu no exemplo 2B. Incubaram-se simultaneamente alíquotas separadas de neutrófilos estimulados a uma concentração de $1,5 \times 10^7$ células/ml, com uma dose sub-saturante pré-determinada de fibrinogénio marcado com ^{125}I (50 $\mu\text{g/ml}$) e concentrações crescentes de várias proteínas de competição, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Terminou-se a reacção na mistura por centrifugação através de óleos de silício, como se descreveu no exemplo 2. Determinou-se a quantidade de complexo receptor Mac-1:fibrinogénio marcado por detecção gama. Calculou-se a ligação não específica, como se descreveu no exemplo 2 e subtraiu-se ao total para calcular a ligação específica.

Testaram-se o fibrinogénio e os fragmentos X, D:E e D do fibrinogénio, não marcados, obtidos como se descreveu nos exemplos 1A e B, quanto à sua capacidade para competir com a ligação do fibrinogénio marcado aos neutrófilos estimulados. Todas as quatro composições de proteína inibiram a ligação do ^{125}I -fibrinogénio aos neutrófilos estimulados duma maneira dependente da concentração com um IC_{50} variando entre 25-50 $\mu\text{g/ml}$ de competidor adicionado como se mostra na figura 3. O ^{125}I -fibrinogénio ligou-se especificamente às células na ausência de competidores, a uma concentração de $80\ 200 \pm 8\ 000$ moléculas/célula. Uma solução um mM de RGD, sob as mesmas condições experimentais, não inibiu a ligação do ^{125}I -fibrinogénio aos neutrófilos.

Testaram-se os fragmentos de fibrinogénio E e D₃₀ obtidos como se descreveu no exemplo 1B, quanto à sua capacidade para competir com a ligação do fibrinogénio marcado aos neutrófilos estimulados. Os resultados de três experiências independentes, mostrados na figura 4, revelam que concentrações crescentes de

D_{30} produzem inibição, dependente da dose, da ligação do ^{125}I -fibrinogénio às células estimuladas com um $\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$, enquanto que, sob as mesmas condições experimentais, o fragmento E não foi eficaz. A concentração de ^{125}I -fibrinogénio ligado na ausência de competidores foi de $99\,600 \pm 4\,500$ moléculas/célula.

Avaliam-se também os anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) purificados como inibidores competitivos da ligação do ^{125}I -fibrinogénio aos neutrófilos estimulados possuindo receptores Mac-1, como se descreve seguidamente. Avaliam-se os anticorpos anti-(idiotipo D_{30}) numa gama de concentrações entre concentrações sub-saturantes e a concentração saturante. Determina-se a quantidade de complexo ^{125}I -fibrinogénio:Mac-1 marcado como se descreve seguidamente.

7. Preparação de um anti-(complexo Mac-1:homólogo de D_{30})

Purifica-se um homólogo de D_{30} e marca-se, como se descreveu nos exemplos 1 e 2A, respectivamente. Obtêm-se neutrófilos possuindo receptores Mac-1 e estimulam-se, como se descreveu no exemplo 2B. Os ensaios de ligação de D_{30} marcado a neutrófilos estimulados realizam-se como se descreveu no exemplo 2C com a excepção de que a concentração óptima pré-determinada de D_{30} marcado, 20 mg/ml , se adiciona a dez milhões de neutrófilos estimulados. Realizam-se ensaios para verificar a ligação como se descreveu no exemplo 2C. Diluem-se em PBS alíquotas separadas de neutrófilos possuindo receptores Mac-1:homólogo de D_{30} não marcado, então injectam-se para a cavidade peritoneal de ratinhos Balb/c. O protocolo de injeção para a geração de uma resposta imunitária está descrito no exemplo 3. Determinam-se os títulos de anticorpos em amostras de soro a períodos de uma semana após reforço no ensaio descrito seguidamente. Sacrificam-se então os ratinhos que exibem títulos altos de anti-(Mac-1:homólogo de D_{30}) e colhem-se os baços de cada um e fundem-se como se descreveu no exemplo 3 para gerar anticorpos monoclonais contra o complexo Mac-1:homólogo de D_{30} .

Seleccionam-se os clones de hibridoma em crescimento quanto

à produção de anticorpos apenas para o complexo Mac-1:D₃₀ em dois ensaios. Misturam-se alíquotas separadas de sobrenadantes da cultura de hibridoma com os neutrófilos possuindo receptores Mac-1 desocupados ou com neutrófilos possuindo homólogo de D₃₀:receptor Mac-1. Analisa-se a reacção dos anticorpos monoclonais com a superfície dos neutrófilos, por coloração indirecta da suspensão celular. Resumidamente, incubam-se 1×10^6 neutrófilos em placas de microtitulação com fundo em V (Costar Corp. Cambridge, MA) com concentrações saturantes pré-determinadas de cada anticorpo testado, durante 30 minutos a 4°C. Após lavagens com soro de bovino fetal (FCS) e RPMI 1640 contendo 10% de FCS, incubam-se as células com IgG de cabra anti-ratinho de F(ab')₂ conjugado com fluoresceína, durante um período adicional de 30 minutos a 4°C. Após lavagens em RPMI 1640, analisa-se a ligação específica de anticorpos monoclonais à superfície das células por citometria de fluxo num classificador de células activadas por fluorescência Becton Dickinson IV/40.

Apenas os sobrenadantes de hibridomas que reagem com neutrófilos possuindo o complexo Mac-1:homólogo de D₃₀ são seleccionados em RIA de fase sólida, como se descreveu no exemplo 3, onde se fixa 5 µg/ml de D₃₀ aos alvéolos em placas de microtitulação.

Os hibridomas que segregam anticorpos que apenas reagem com neutrófilos possuindo homólogo de D₃₀:receptor Mac-1 e não com neutrófilos possuindo receptores Mac-1 desocupados ou D₃₀ isolado são expandidos. Purificam-se os anticorpos por eles segregados, como se descreveu no exemplo 4. Apenas estes anticorpos purificados, contra o complexo Mac-1:homólogo de D₃₀, se usam em ensaios de diagnóstico para detectar estes complexos na superfície das células em questão. Os ensaios de diagnóstico realizam-se como se descreveu anteriormente.

Os anticorpos anti-(complexo Mac-1:homólogo de D₃₀) seleccionados para se utilizar ligam o complexo Mac-1:homólogo de D₃₀, como determinado por ensaios de diagnóstico e estes anticorpos não ligam um homólogo de D₃₀ ou o receptor Mac-1 isolados.



A descrição anterior, incluindo as concretizações e exemplos específicos, pretende ser ilustrativa do presente invento e não se deve tomar como limitante. Podem-se efectuar numerosas outras variações e modificações sem afastamento ao verdadeiro espírito e âmbito do presente invento.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de uma composição farmacêutica, caracterizado por compreender a dispersão de pelo menos 0,1 por cento em peso de um homólogo de D₃₀ substancialmente puro e farmacêuticamente aceitável, capaz de se ligar ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1 e de inibir a ligação de D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1, num excipiente farmacêuticamente aceitável.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido homólogo de D₃₀ ser disperso numa solução estéril.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido homólogo de D₃₀ ser D₃₀.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido homólogo de D₃₀ ser um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀).

5 - Processo de preparação de um anticorpo anti-(idiotipo D₃₀) que:

(i) se liga ao local de ligação de D₃₀, do Mac-1 e inibe a ligação do D₃₀ ao local de ligação de D₃₀ do Mac-1; e

(ii) imunorreage com um anticorpo anti-D₃₀ caracterizado por compreender a selecção de anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) provenientes de um animal previamente imunizado com anticorpos monoclonais que imunorreagem com D₃₀, tendo o referido animal sido mantido durante um período de tempo suficiente para os anticorpos anti-(idiotipo D₃₀) se formassem.

6 - Processo de detecção da quantidade de um homólogo de D₃₀ numa amostra líquida compreendendo:

(a) misturar uma amostra de células activadas possuindo receptores Mac-1 com uma quantidade predeterminada de uma amostra líquida contendo um homólogo de D₃₀ e com uma quantidade predeterminada de D₃₀ marcado para formar uma mistura reaccional; e

(b) manter a referida mistura reaccional durante um período

de tempo predeterminado, suficiente para que todo o homólogo de D_{30} presente na referida composição se ligue aos referidos receptores Mac-1 e formem um complexo receptor Mac-1: homólogo de D_{30} e para permitir que o referido D_{30} marcado se ligue aos referidos receptores Mac-1 para formar um complexo marcado receptor Mac-1: homólogo de D_{30} ;

(c) avaliar a quantidade de complexo marcado receptor Mac-1: homólogo de D_{30} formado no passo (b), detectando-se assim a quantidade de um homólogo de D_{30} na referida composição.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por as referidas células activadas serem neutrófilos polimorfonucleares.

8 - Processo de detecção da quantidade de homólogo de D_{30} numa amostra líquida, compreendendo:

(a) misturar um anticorpo específico para D_{30} capaz de ligar D_{30} mas não outros fragmentos de fibrinogénio com uma quantidade predeterminada de uma amostra líquida contendo um homólogo de D_{30} para formar uma mistura imuno-reaccional;

(b) manter a referida mistura imuno-reaccional durante um período de tempo predeterminado suficiente para que o referido homólogo de D_{30} presente na referida amostra líquida se ligue ao referido anticorpo e forme um complexo de imuno-reacção contendo homólogo de D_{30} e anticorpo anti- D_{30} ; e

(c) determinar a quantidade do referido complexo de imuno-reacção formado, detectando-se assim a presença de homólogo de D_{30} na referida amostra líquida.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida amostra ser uma amostra de fluido corporal.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por o referido anticorpo anti- D_{30} ser um anticorpo monoclonal.

11 - Processo de detecção da quantidade de um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} numa composição líquida compreendendo:

(a) misturar um anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D_{30}) capaz de se ligar especificamente a um complexo Mac-1:homólogo de D_{30} com uma quantidade predeterminada de uma composição líquida contendo um complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} para formar uma mistura imuno-reaccional:

(b) manter a referida mistura imuno-reaccional durante um período de tempo predeterminado, suficiente para que o referido complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} presente na referida composição líquida se ligue ao referido anticorpo e forme um complexo de imuno-reacção contendo o referido complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} e o anticorpo anti-(complexo Mac-1:homólogo de D_{30}); e

(c) avaliar a quantidade de qualquer referido complexo de imuno-reacção formado no passo (b), detectando-se assim a quantidade de complexo receptor Mac-1:homólogo de D_{30} na referida composição líquida.

Lisboa, 19. JUL. 1990

Por SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION

- O AGENTE OFICIAL -





1 ADSGEGDFLAEGGGVRGPRVVERHQSA CKD
31 SDWPFCSDEDWHYKCPSSGCRMKGLIDEVHQ
61 DFTNRINXLKNSLF EYQKMNKDSHSLTTNI
91 MEILRGDFSSAHNRDNTYHRVSEDLRSRIE
121 VLKRRKVIQKVQHIQLLQKNVRAQLVDMKRL
151 EVDIDIKIRSCRGSCSRALAREVDLKNYED
181 QQKQLEQVIAKD L LPSRDRQHLPLIKMKPV
211 PNLVPGHF KSQLQKV PPEWKALTDMPQMRK
241 ELERPGGNEITRGGSTSYGTGSETE'SPRNP
271 SSAGSWNSGSSSGPGSTGNRNPGSSGTGSGA
301 TWKPGSSGPGSTGSWNSGSSGTGSTGNQNP
331 GSPRPGSTGTWNP GSSSERGSAGHWTSESSY
361 SGSTGQWHSESGSFRPDSPGSGNARPNDPN
391 WGT FEEVSGNVSPGTRREYHTEKLYTSKGD
421 KELRTGKEKVTSGSTTTTTRRSCSKTYTKTY
451 IGP DGHKEVTKEVVTSE DGSDCPEAMP LGT
481 LSGIGTLDGFRHRHPDEAAFFDTASTGKTF
511 PGFFSPMLGEFYSETESRGSESGIFTNTKE
541 SSSHHPGIAEFPSRGKSSSYSKQFTSSSTSY
571 HRGDSTFESKSYKMADEAGSEADHEGLHST
601 KRGHAKSRPV

FIGURA 1A

α AD SG E Q D F L A E G G V R G P R V Y E R H Q S A
 β Q G V N D E E G F F S A G C H R P L D K C R E E A P S L A P A P P I S G G G Y A A R A K A A A T Q K K Y E R K A P D A G G C L H A D P D L G V L C P T G C Q L Q E A L L Q Q E R P I R H S Y D E L N H N V E A Y S Q T S S S S Q F Y M L
 γ Y V A T R D N C C I L D E R F G S Y C P T I G I A D F L S T Y Q T K V D K Q L Q S L E D I L M Q E N K T S E Y K Q L I K

 α H T H E I L R C D F S S A H N R O N T Y N R V S E D L R S R I E V L K R K V I Q K V Q H I Q L L E K H V R A Q L V D H K R L E V D I O I K I R S C R G S C S R A L A R E V D L K N Y E D Q Q L E Q V I A K D L P S R D R Q H P L I R H K
 β L K D I W Q K R Q K V I D E I N V N E Y S S E L E K H Q L Y I D E T Y M S N I P T H L R V L R S I L E N L R S K I Q K L E S D V S A Q H E Y C R I P C T V S C D I P V V S G K E C E E I I R K G G E T S E M L I Q P D S S V K
 γ A I Q L T Y N P D E S S K P H I D A A T L K S R H E E I H K Y E A S I L T H O S S I R Y L Q E I T Y N S N M Q I V N L K E K Y A Q L E A Q C Q E P C K D T V Q I I D I T G K D C Q D I A N K G A K Q S G L Y F I Y P L K A N Q

 α P V P H L V P Q H F K S Q L Q K Y P P E N K A L I D N P Q H R H
 β P I R Y Y C D H H T E N G G T Y I Q H R Q D S Y D F G R K X D P Y K Q G E G N V A T N D G K B Y C G L P G E Y M L G B B K I S E L T R M G P T E L L I E H E D M K G D K V K A I Y G G F T Y Q N E A N K Y Q I S Y N K Y R G T A G N A
 γ Q F L Y T C E I D G S G N G T Y F Q K R L D G S Y D F K X K W I Q Y K E G F G H L S P T G T T E F M L G H E K I H L I S T Q S A I P Y A L R V E L E D M H G R T S T A D Y A M E K Y G P E A D X Y R L T Y A Y A G G D A G O

 α K P G S S G P G T G S M N S G S S G T G T G N Q I P G S P R P G S T G T N P G S S E R S A G I N T S E S S V S G S T G Q H S E S G S F R P D S P G S G N A R P H O P H M G T F E E V S G N V S P G T R R E Y H T E L V T S K G D K E L R
 β L M D G A S Q L M G E N R T M I I H R G H F E S
 γ A F D G F D F G D P S D K F F T S H R G H Q E S

 α I G K E V T S G S T T T R R S C S K T V T K T V I G P D G H K E Y T K E V T S E D G S O C P E A M O L G T L S G I G T L D G F R H R P D E A F F D T A S T G T F P G F F S P H L G E F Y S E T E S R G S E S G I F T I N T K E S S H H P
 β I Y D R O N D G M L I S D P R K Q C S K E D G G G H W Y B R C H A A H P H G R Y T N G G Q Y T W O M A K H G T B D G V Y M H M K C S H Y S H R Q S M K I R P F F P Q Q
 γ T W D N D H O K F E G M C A E Q D G S G N M M K C H A G H L N G V Y T O G G T Y S K A S T P N G Y O N G I J H A T K I R H Y S H K T T H K I I P F N R L T I G E G Q H I L G C A K Q A G D V

 α G I A E F P S R G K S S Y S K Q F T S T S Y N R G D S T F E S K S Y O M D E A G S E A D H E G T H S T R G C H A K S R P V
 β
 γ

FIGURA 1B



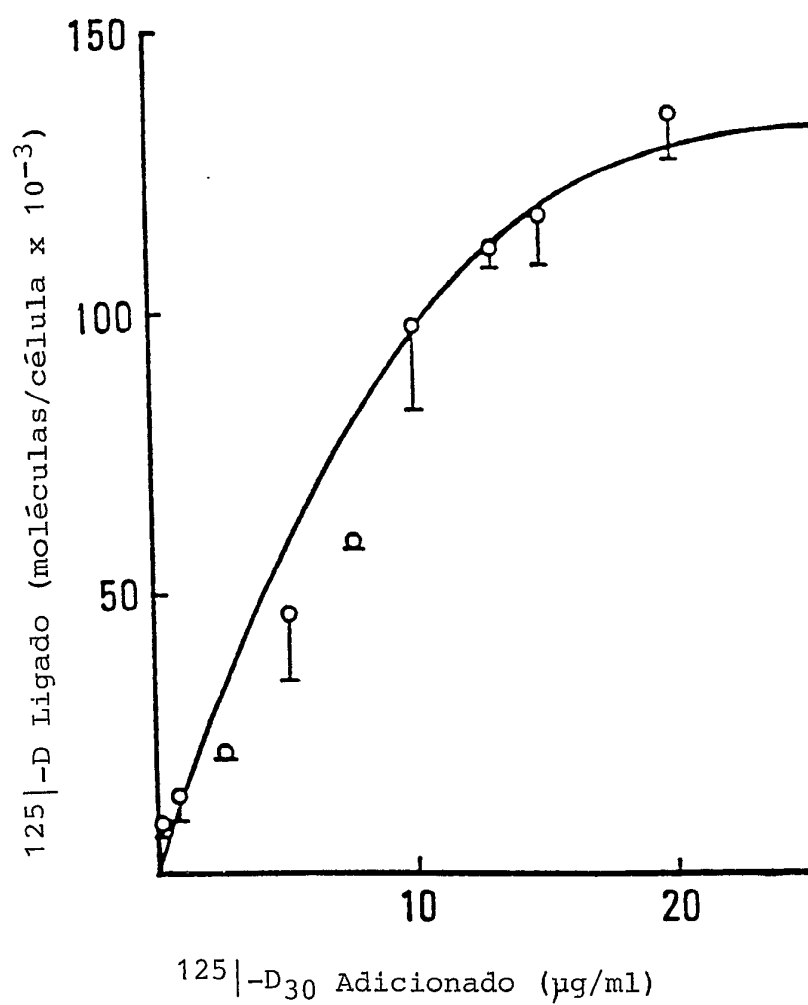


FIGURA 2

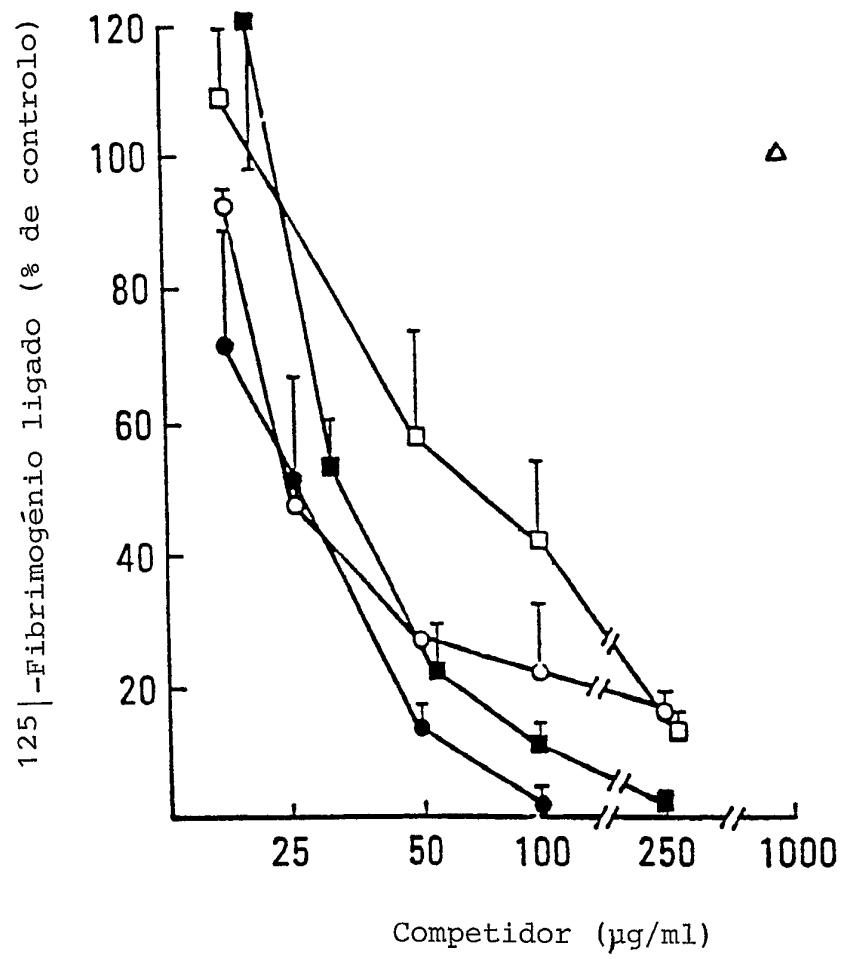


FIGURA 3

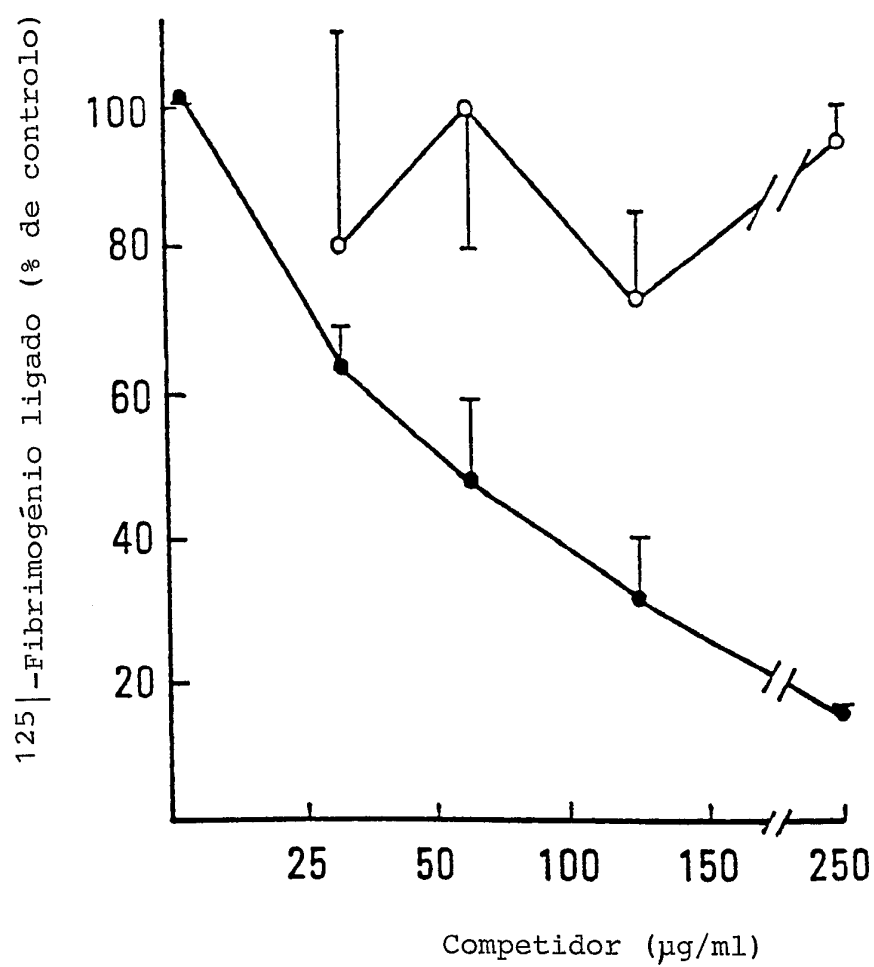


FIGURA 4