

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96 584

REQUERENTE: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, norte-
-americana (Estado de California), com sede
em 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla,
California 92037, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de produção de moléculas com locais
de combinação de anticorpo e de hidrólise ca-
talítica com as mesmas"

INVENTORES: Kim Janda

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 26 de Janeiro de 1990 sob o
n.º. 470 924 e em 23 de Janeiro de 1991 sob o n.º.



PATENTE Nº. 96 584

"Processo de produção de moléculas com locais de combinação de anticorpo e de hidrólise catalítica com as mesmas"

para que

SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION,
pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de produção de moléculas de anticorpo ou de moléculas contendo porções do local de combinação do anticorpo, que hidrolisam cataliticamente uma ligação amida ou éster de ácido carboxílico pré-seleccionada, de um ligando reagente, ligando-se o local de combinação do anticorpo das referidas moléculas a:

(a) um ligando reagente contendo a ligação amida ou éster de ácido carboxílico pré-seleccionada que é hidrolisada, e

(b) um ligando hapténico estruturalmente análogo ao referido ligando reagente que contém um átomo de carbono tetraédrico ligado a um grupo hidroxilo, bem como a um átomo de carbono saturado, numa posição, no ligando hapténico, correspondente à posição do grupo carbonilo, bem como ao heteroátomo ligado ao carbonilo de, respectivamente, uma ligação éster ou amida de ácido carboxílico, pré-seleccionada, a ser hidrolisada, incluindo ainda o referido ligando hapténico um grupo apresentando carga iónica, em solução aquosa, a valores de pH fisiológicos, estando o grupo, que apresenta carga iónica, ausente de uma posição correspondente do referido ligando reagente, e localizado num



volume esférico, definido por um raio de cerca de 7×10^{-10} m, a partir do referido átomo de carbono tetraédrico, caracterizado por se cultivarem as células adequadas num meio de cultura adequado.

O invento refere-se ainda ao processo de hidrólise catalítica de uma ligação pré-seleccionada de um ligando reagente, bem como de produção das células usadas na produção das referidas moléculas.



MEMÓRIA DESCRITIVA

Referência a Pedidos Relacionados

Este pedido é uma continuação em parte do pedido co-pendente nº. de série 470 924, depositado em 26 de Janeiro de 1990, cujo conteúdo é aqui incorporado para referência.

Campo Técnico

O presente invento refere-se a anticorpos, antigénios e imunogénios e, mais em particular, a moléculas que contêm um local de combinação de anticorpo que se liga ao átomo de carbono tetraédrico de um estado de transição de hidrólise de uma amida ou éster e de estruturas circundantes e que apresenta ainda um local de catálise, nucleofílica ou de ácido-base, da ligação amida ou éster que é hidrolisada.

Antecedentes do Invento

Os fenómenos de ligação entre ligandos e receptores desempenham muitos papéis cruciais nos sistemas biológicos. São exemplos destes fenómenos a ligação de moléculas de oxigénio à de-soxi-hemoglobina para formar a oxi-hemoglobina e a ligação de um substrato a um enzima que sobre ele actua, por exemplo, entre uma proteína e uma protease como a tripsina. Ainda outros exemplos de fenómenos de ligação biológica incluem a ligação de um antigénio a um anticorpo e a ligação do componente C3 do complemento ao receptor denominado CR1.

Presume-se também que muitas drogas e outros agentes terapêuticos dependam de fenómenos de ligação. Por exemplo, há informação de que os opiáceos, como a morfina, se ligam a receptores específicos no cérebro. Relata-se também que os agonistas e antagonistas dos opiáceos competem com drogas como a morfina por esses locais de ligação.

Os ligandos, como as drogas feitas pelo homem (como a morfina e seus derivados) e aquelas que estão naturalmente presentes nos sistemas biológicos (como as endomorfina e hormonas) ligam-se a receptores que estão naturalmente presentes

nos sistemas biológicos e ambos os tipos serão aqui tratados juntos. Estas ligações podem conduzir a um certo número de fenómenos biológicos, incluindo particularmente a hidrólise de ligações amida e éster, como quando as proteínas são hidrolisadas nos polipéptidos constituintes por um enzima como a tripsina ou a papaina, ou quando uma gordura é cindida em glicerina e três ácidos carboxílicos, respectivamente.

Slobin, Biochemistry, 5:2836-2844 (1966) relatou a preparação de anticorpos de um conjugado p-nitrocarbобензóxilo da albumina de soro bovino. Estes anticorpos foram depois usados para hidrolisar os ésteres acetato de p-nitrofenilo e o epsilon-aminocaproato. A reacção do éster acetato foi caracterizada por uma constante de velocidade de segunda ordem e parecia ser não-específica. A constante de velocidade de segunda ordem obtida usando gama-globulina normal era aproximadamente igual à dos anticorpos preparados especialmente. A presença de anticorpos preparados especialmente inibia, segundo esse relato, a hidrólise do éster aminocaproato.

Kohen e colaboradores descreveram, também, tentativas de uso de anticorpos para catalisar a esterólise. Os anticorpos utilizados por este grupo foram, em cada caso, produzidos contra uma parte da molécula de substrato essencialmente utilizada que não continha a ligação a ser hidrolisada.

No seu trabalho inicial [FEBS Letters, 100:137-140 (1979) and Biochim. Biophys. Acta, 629:328-337 /1980)] usaram-se anticorpos anti-esteróides para hidrolisar ésteres da 7-umbeliferona (7-hidroxycumarino) de um carboxietil-tioéter de um esteróide. Em cada caso observou-se um aumento da velocidade de hidrólise quando comparada com o meio ou com uma velocidade obtida com IgG normal. Em ambos os casos os números de retorno ("turnover numbers") foram baixos (cerca de uma mole de substrato por mole de anticorpo por minuto, ou menos) e as velocidades de reacção baixaram com o tempo, atingindo uma plataforma, com saturação do anticorpo. Este abrandamento da velocidade foi atribuído a uma ligação irreversível do produto ácido esteróide ao anticorpo.

Kohen et al, também descreveram a hidrólise do 7-[N-(2,4-dinitrofenil)-6-amino-hexanoil]-cumarino usando anticorpos monoclonais produzidos contra as porções dinitrofenilo dessa molécula de substrato [FEBS Letters, 111:427-431 (1980)]. Foi aqui relatado um aumento da velocidade em relação ao meio mas a reacção foi considerada mais estequiométrica do que catalítica. Foi também notado um decréscimo da velocidade que se aproximou do zero à medida que se atingia a saturação do anticorpo. Uma vez mais o decréscimo foi atribuído à inibição do produto provocada pela ligação do produto ácido ao anticorpo pois que alguma da actividade inicial de hidrólise podia ser regenerada por cromatografia de uma mistura anticorpo-substrato-produto.

Quando uma ligação forte de anticorpos é dirigida a estados estáveis de moléculas de substrato, a velocidade lenta de dissociação do complexo vai impedir a catálise. Pensa-se ser esta a situação dos resultados relatados por Kohen e colaboradores.

As construções referidas, ainda que interessantes, são gravemente limitadas pela falha em dirigir o mecanismo de utilização da energia de ligação, o que é essencial para os enzimas [W. P. Jencks, Adv. Enzymol., 43, 219 (1975)].

Estas deficiências podem ser compensadas pelo uso de um análogo do estado de transição, como o hapteno, para provocar os anticorpos pretendidos. Este hapteno pode assumir o papel de inibidor no sistema catalítico.

Pode, assim, usar-se a ligação imunológica para desviar experimentalmente as interacções de ligação para os processos catalíticos. Por exemplo, foi já sugerido que o uso de um anticorpo para um grupo hapténico que se assemelhe ao estado de transição de uma dada reacção, deveria provocar uma aceleração na reacção do substrato forçando os substratos a assemelharem-se ao estado de transição. Jencks, W.P., Catalysis in Chemistry and Enzymology, page 288 (McGraw-Hill, New York 1969). Não obstante essa sugestão lata, não foram sugeridos haptenos de estados de transição específicos nem foram sugeridas reacções específicas

onde tal conceito pudesse ser verificado.

Pela teoria química actualmente aceite, pensa-se que a hidrólise de ligações amida e éster se desenvolve, em meio aquoso, por uma reacção no átomo de carbono do carbonilo para constituir um estado de transição que contém um átomo de carbono tetraédrico ligado a (a) um átomo de carbono da parte ácida da amida ou éster, (b) dois átomos de oxigénio, sendo um do grupo carbonilo e o outro de um ião hidroxilo ou de uma molécula de água do meio e (c) o átomo de oxigénio da parte álcool de um éster ou o átomo de azoto da parte amina de uma amida. Os estados de transição destas reacções são construções mentais úteis que, por definição, não podem ser isoladas, em comparação com os estados intermediários que são isoláveis. Ainda que os referidos estados de transição de hidrólise não possam ser isolados, um grande volume de literatura científica tem sido dedicada a este assunto.

Ainda que se creia que o estado de transição acima descrito para a hidrólise de amidas ou ésteres esteja bem compreendido, os parâmetros topológicos, isto é, tamanho, forma e carga dos locais de ligação dos receptores onde amidas especiais, como as proteínas, ou ésteres, como as gorduras, reagem através de estados de transição, não estão bem compreendidos. Seria portanto benéfico que se conhecesse a topologia de vários locais de ligação, de modo a que se pudessem estudar as interacções dos ligandos que se ligam a esses locais. Infelizmente, a topologia dos locais de ligação dos receptores nas hidrólises biológicas, é em geral desconhecida, excepto para um número relativamente pequeno de enzimas de que se determinaram, por raios X, as estruturas cristalinas.

Esta falta de conhecimento da topologia dos locais de ligação provém em parte da carência de conhecimentos mesmo da localização nas células de muitos locais de ligação dos receptores. Além disso, nos locais de ligação dos receptores em que a localização é conhecida, a identidade química, isto é, a composição da proteína e dos hidratos de carbono, do local de

ligação é, geralmente, desconhecida. Assim, o investigador vê-se geralmente impedido de procurar compreender as exigências topológicas dos locais de ligação dos receptores e, portanto, de procurar construir agentes terapêuticos que satisfaçam essas exigências.

Os investigadores devem portanto pesquisar agentes terapêuticos potenciais em estudos de culturas de células ou em animais, para determinar se um agente terapêutico potencial pode ser útil. Estes sistemas, ainda que úteis, são caros e o seu uso muito demorado.

Mesmo quando a topologia e a reactividade química de um receptor de hidrólise, como um enzima, são conhecidas, os enzimas, p. ex. as proteases de hidrólise, normalmente cindem os seus substratos, cadeias polipeptídicas, adjacentes a um residuo de aminoácido particular, que pode ocorrer várias vezes na cadeia polipeptídica da proteína. Ainda que estas cisões, relativamente ao acaso, possam ser úteis na obtenção do mapa polipeptídico da proteína, essas cisões relativamente casuais não são tão úteis quando se pretende que sejam produzidas sequências de resíduos de aminoácidos, particulares.

Por exemplo, as técnicas modernas de engenharia genética têm-se mostrado úteis na preparação de proteínas de fusão que contêm uma proteína ou polipéptido desejado, fundido com o produto de transcrição de um gene vector como o lac z. O uso destas proteínas de fusão é, contudo, dificultado pela presença de fragmentos do produto do gene vector. Seria portanto benéfico se moléculas de tipo enzima proteolítico pudessem ser criadas para cindir estes produtos de fusão, entre partes desejadas e não desejadas da proteína ou polipéptido de fusão.

Recentemente, Lerner, Tramontano and Janda [Science, 234, 1566 (1986)] descreveram anticorpos monoclonais que hidrolisavam cataliticamente um éster. Tramontano e Lerner descreveram também o uso de anticorpos monoclonais para hidrolisar ésteres, na Patente dos E.U.A. Nº. 4 656 567. Pollack, Jacobs e Schultz

[Science, 234, 1570 (1986)] descreveram também uma proteína de mieloma denominada MOPC167 [Leon et al., Biochem., 10, 1424 (1971)] que catalisa a hidrólise de um carbonato.

Nas duas descrições de Lerner e Tramontano os anticorpos foram produzidos contra um fosfonato que foi sintetizado para representar um análogo estável do estado de transição tetraédrico de hidrólise do éster de ácido carboxílico ou éster carbonato. O anticorpo principalmente discutido por Pollack et al. era uma proteína de mieloma que se verificou ligar a um fosfonato que era estruturalmente análogo ao análogo de carbonato hidrolisado.

Assim, no trabalho de Lerner e Tramontano et al., o substrato a ser hidrolisado era pré-seleccionado, sendo o análogo imunizante e os anticorpos de hidrólise sintetizados de acordo com o produto pretendido. Pollack et al. planearam o substrato a ser hidrolisado pois sabiam a especificidade da proteína do mieloma. Pollack et al. também relataram (anterior) a existência de um sistema anticorpo catalítico, substrato e substrato análogo para a hidrólise de carbonatos, semelhantes, no seu conceito, ao de Lerner et al.. O trabalho que se refere a este sistema está descrito em Jacobs et al., J. Am. Chem. Soc., 109, 2174 (1987).

O pedido, publicado, de patente WO B5/02414 discute o uso possível de anticorpos como catalisadores e apresenta dados que se referem ao uso de soro policlonal na hidrólise do o-nitrofenil-beta-D-galactósido. Nesse pedido diz-se que os anticorpos úteis são indutíveis por um reagente, por um intermediário da reacção, ou por um análogo do reagente ou do produto ou dum intermediário da reacção. O termo "análogo" ali definido abrange isómeros, homólogos ou outros compostos que se assemelhem suficientemente ao reagente, em termos de estrutura química, de modo a que um anticorpo, produzido contra um análogo, possa participar numa reacção imunológica com o reagente, mas que não catalise, necessariamente, a reacção do análogo.

Os resultados apresentados nessa memória descritiva apenas indicam ter ocorrido alguma cisão do substrato (reagente)

galactósido, ao longo de um período de tempo de 18 horas, usando uma preparação de anticorpo relativamente concentrada (diluições 1:10 e 1:20). Ainda que se cite o termo catálise, não foi evidenciada actividade catalítica pois que não se verificou nenhum retorno do anticorpo pretensamente catalisador nem houve indicação da percentagem de substrato galactósido cindido. Aquele pedido de patente indicou que a beta-D-galactosidase cindia cerca de dez vezes mais substrato que os anticorpos policlonais, assumindo linearidade de absorvância à concentração não referida do substrato estudado.

Dos resultados apresentados nesse pedido de patente, é possível que tenha ocorrido a substituição nucleofila do grupo o-nitrofenilo por um grupo amino terminal de um resíduo de lisina da preparação de anticorpos utilizada. Assim, a absorvância observada poderia ser devida à formação de epsilon-amino-lisinil-o-nitrofenil-anilina ou à formação de um epsilon-amino-lisinil-galactósido e o-nitrofenol; qualquer das ocorrências não seria catalítica uma vez que o anticorpo era consumido, mais do que reconstituído.

A patente dos E.U.A. Nº. 4 792 446, de Kim et al. descreve a produção de anticorpos catalisadores. Esses catalisadores reagem com um substrato e são originados por uma molécula de hapteno, revelando o substrato e as moléculas de hapteno uma substancial semelhança estrutural em partes diferentes das do átomo ou grupo nos quais a reacção catalítica ocorre, isto é, o local da reacção. No local da reacção, o substrato e o hapteno diferem pelo facto de o local de reacção, ou os núcleos cataliticamente activos, do hapteno conter uma valência mais elevada e uma ou mais ligações do que a estrutura análoga do substrato.

Além disso, o hapteno inclui um grupo que está ligado à porção cataliticamente activa da molécula, isto é, à porção estruturalmente análoga do local reactivo do substrato. Diz-se que esse grupo adicional é útil para introduzir no anticorpo catalisador uma carga iónica positiva, como com o grupo $-CO_2^+$, ou uma carga iónica negativa, como com o ião amónio. Diz-se ainda

que esse grupo adicional substitui o -OH do substrato, para criar ambientes polares, para criar ambientes não polares ou para fornecer uma cavidade para água.

Lerner et al., BioAssays, 9:107-112 (1988) revelam também o uso de um grupo ionicamente carregado de um hapteno imunizante para induzir a presença de um grupo de carga oposta no local de combinação do anticorpo, de modo que a catálise ácido-base possa ser facilitada pelo uso de um substrato não carregado. Esta estratégia de indução de anticorpos catalíticos é ali referida como "engodo e comutação" ("bait and switch") pois que o anticorpo catalítico é induzido ou "engodado" por um hapteno carregado e o substrato para o anticorpo catalisador induzido é comutado para uma molécula neutra de modo que a carga iônica complementar à carga iônica do hapteno, induzida no anticorpo, possa ser utilizada para proporcionar catálise ácido-base a uma reacção de substrato neutro. Não se revelam, contudo, quaisquer estruturas hapténicas específicas para proceder à estratégia de "engodo e comutação".

Breve Sumário do Invento

O presente invento refere-se a uma molécula de anticorpo ou molécula contendo um local de combinação do anticorpo (molécula catalítica) que hidrolisa cataliticamente uma ligação pré-seleccionada, amida ou éster de ácido carboxílico, de um ligando reagente, refere-se a processos para a preparação e uso desta molécula e a células que produzem a molécula catalisadora.

As moléculas cataliticamente activas são, de preferência, moléculas de anticorpos monoclonais ou moléculas que contenham porções de locais de combinação dos anticorpos monoclonais. O local de combinação do anticorpo destas moléculas imunorreage (liga-se) com pelo menos duas moléculas de ligando. A primeira molécula de ligando é um ligando reagente que contém a ligação pré-seleccionada amida ou éster de ácido carboxílico a ser hidrolisada, bem como um residuo químico, contendo carbono, ligado a cada uma das porções ácido carboxílico e amina ou álcool, da ligação que é hidrolisada.

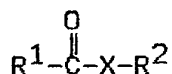
Um segundo ligando é um ligando hapténico usado directa ou indirectamente para induzir as moléculas catalíticas. O ligando hapténico é estruturalmente análogo ao ligando reagente e contém um átomo de carbono tetraédrico ligado a um grupo hidroxilo e a um átomo de carbono saturado numa posição, no ligando hapténico, correspondente à posição do grupo carbonilo e à do heteroátomo ligado ao carbonilo, respectivamente, do ligando reagente pré-seleccionado, de amida ou éster de ácido carboxílico, a ser hidrolisado. Assim, por exemplo, quando uma ligação amida

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (-\text{C}-\text{NH}-) \end{array}$ ou éster $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ (-\text{C}-\text{O}-) \end{array}$ vai ser hidrolisada no ligando

reagente, o ligando hapténico conterá um grupo $\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ -\text{CH}-\text{CH}_2 \end{array}$ em posição análoga à do grupo que contém a ligação éster ou amida. Os resíduos químicos contendo carbono, ligados ao átomo de carbono tetraédrico e ao átomo de carbono saturado do hapteno, são estruturalmente análogos (semelhantes) aos resíduos químicos ligados à porção carboxilo e à porção amina ou álcool, respectivamente, do ligando reagente.

Um ligando hapténico contém, também, um grupo que apresenta uma carga iónica em solução aquosa, a valores fisiológicos do pH. Esse grupo que apresenta a carga iónica está ausente da posição correspondente do ligando reagente e localiza-se dentro de um volume esférico definido por um raio de cerca de $7 \times 10^{-10} \text{ m}$ ($7 \text{ \AA}$) com maior preferência entre cerca de 2×10^{-10} e cerca de $5 \times 10^{-10} \text{ m}$ ($2 - 5 \text{ \AA}$), a partir do acima mencionado átomo de carbono tetraédrico ligado ao grupo hidroxilo. O grupo que apresenta carga iónica proporciona, de preferência, um ião carboxilato ou amónio, em solução aquosa, a valores fisiológicos de pH.

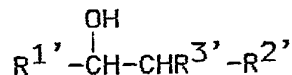
Um ligando reagente pode ser representado pela estrutura



onde R^1 e R^2 representam resíduos químicos, contendo átomos de carbono, do reagente e

$-\text{X}-$ é $-\text{O}-$ ou $-\text{NR}^3-$ onde R^3 é hidrogénio ou um terceiro

resíduo químico contendo carbono. Um ligando haptênico pode ser representado pela estrutura



onde $\text{R}^1\text{'}$ e $\text{R}^2\text{'}$ representam resíduos contendo carbono que são estruturalmente análogos a R^1 e R^2 , respectivamente. Pelo menos um, entre $\text{R}^1\text{'}$ e $\text{R}^2\text{'}$, contém um grupo que apresenta carga iônica em solução aquosa a valores fisiológicos do pH e esse grupo carregado ionicamente localiza-se dentro de um volume esférico definido por um raio de cerca de 7×10^{-10} m, de preferência entre cerca de 2×10^{-10} e cerca de 5×10^{-10} m (2 - 5 Å) a

partir do grupo $\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ -\text{CH}- \end{array}$ da referida estrutura. $\text{R}^3\text{'}$ é H quando -X- for -O- ou $\text{R}^3\text{'}$ é estruturalmente análogo a R^3 quando -X- for $-\text{NR}^3-$.

Também são abrangidas pelo invento as células que produzem as referidas moléculas catalíticas quando cultivadas em meio adequado, in vivo ou in vitro. Essas células, de preferência, não só produzem moléculas catalíticas como também segregam essas moléculas catalíticas para o meio de cultura. Um desses tipos preferidos de células é a célula do hibridoma.

É também abrangido um processo de preparação das referidas células. Neste processo, imuniza-se um animal com um imunogénio que inclui um ligando haptênico acima descrito, presente em quantidade suficiente para induzir anticorpos contra o hapteno, no animal. Mantém-se o animal por um período de tempo suficiente para que segregue anticorpos que imunorreajam com o ligando haptênico.

Os genes que codificam as moléculas de anticorpo ou as moléculas que contêm porções de locais de combinação do anticorpo, são transferidos das células que produzem anticorpos no animal mantido e imunizado, para células hospedeiras para se formarem células híbridas. Estas células híbridas contêm genes de pelo menos duas origens. Quando cultivadas, as células híbridas produzem moléculas de anticorpo ou moléculas que contêm porções

de locais de combinação do anticorpo dos genes transferidos e tais células podem ser cultivadas de modo substancialmente ilimitado quando comparadas com as células produtoras de anticorpos transferidos pelo gene.

As células híbridas são cultivadas num meio apropriado e sob condições de cultura apropriadas, durante um período de tempo suficiente para que essas células híbridas produzam moléculas de anticorpo ou moléculas contendo porções de locais de combinação do anticorpo, que são recuperadas e pesquisadas para se identificar uma célula híbrida que produza moléculas de anticorpo ou moléculas que contenham porções de locais de combinação de anticorpo, que hidrolisem cataliticamente a ligação pré-seleccionada amida ou éster de ácido carboxílico do ligando reagente. Desenvolvem-se então clones da célula híbrida identificada.

Está abrangido pelo invento um processo de hidrolisar cataliticamente uma ligação pré-seleccionada éster ou amida num ligando reactivo. Neste caso, uma quantidade cataliticamente eficaz das moléculas catalíticas acima referidas é misturada com moléculas do ligando reagente, num meio aquoso, para constituir uma mistura reaccional. Esta mistura reaccional é mantida por um período de tempo suficiente para que as moléculas do ligando reagente se liguem às moléculas catalíticas e para que as moléculas catalíticas hidrolisem cataliticamente a ligação pré-seleccionada, formando produtos de hidrólise. Um ou mais dos produtos formados pode, então, ser recuperado.

Breve Descrição dos Desenhos

Nos desenhos que fazem parte desta descrição:

a Figura 1 ilustra as fórmulas estruturais de ligandos hapténicos específicos (compostos 1a, 2, 5a, 6 e 7), de um inibidor (composto 1b), de substrato ou de ligando reagente (composto 3) e do produto de reacção (composto 4) aqui discutido e utilizado.

A Figura 2 é um gráfico que mostra duas curvas de pH vs. log K

A parte superior (Fig. 2A) ilustra um gráfico de $\log K_{cat}^{ap}$ vs. pH para valores logarítmicos entre -3 e -2 (círculos a cheio) para a reacção, catalisada pelo anticorpo monoclonal 30C6, do ligando reagente composto 3. A linha que passa pelos pontos foi calculada usando a equação

$$K_{cat}^{ap} = (K_{cat}) \frac{K_a}{K_4 + a_H}.$$

A parte inferior (Fig. 2B) mostra um gráfico de $\log K_{obs}^c$ vs. pH para valores logarítmicos entre -9,5 e -7,0 (triângulos a cheio), para a reacção do Composto 3 extrapolada até à concentração zero do tampão. A linha calculada foi obtida usando a equação

$$K_{obs}^c = K_O + K_{OH}^{-}[OH^{-}].$$

Os valores de pH para ambos os gráficos estão entre 5,5 e 8,5. Os valores para K_{cat} , K_a (pK_4), K_O e K_{OH} estão indicados na secção "Resultados", a seguir.

A Figura 3 é um gráfico em 2 partes, semelhante ao da Figura 2. A parte superior (Fig. 3A) ilustra um gráfico de $\log K_{cat}$ vs. pH para valores log entre cerca de -3 e cerca de -1 (círculos a cheio) para a reacção, catalisada pelo anticorpo monoclonal 27A6, do ligando reagente composto 3.

A parte inferior da Figura 3 (Fig. 3B) mostra gráficos de $\log K_{obs}$ (constante de velocidade observada) vs. pH para valores log de cerca de -8 até cerca de -6 (triângulos a cheio) para a reacção de hidrólise do composto 3, catalisada pelo anticorpo monoclonal 27A6. Os quadrados a cheio indicam o $\log K_{obs}$ vs. pH para a mesma reacção extrapolada até à concentração zero do tampão. A linha calculada foi obtida usando a equação

$$K_{obs} = K_{OH}^{-}[OH^{-}].$$

Descrição Detalhada do InventoI - Introdução

O presente invento refere-se a moléculas de anticorpo ou a moléculas contendo porções de locais de combinação de anticorpo que colectivamente podem ser referidas como receptores ou como moléculas catalíticas que são induzidas por um ligando hapténico, análogo em estruturas a um ligando reagente. O ligando hapténico imita estereoquimicamente a conformação mas não a carga iónica de um estado de transição na sequência de reacções da hidrólise de uma ligação éster ou amida do ligando reagente. As moléculas catalíticas [moléculas de anticorpo ou moléculas que contêm porções de locais (paratópicos) de combinação de anticorpo] ligam-se ao ligando hapténico e ao ligando reagente. Pensa-se que as moléculas catalíticas estabilizam o estado de transição hidrolítico de uma porção pré-seleccionada do ligando reagente, bem como fornecem um residuo de aminoácido carregado ionicamente que contribui para a catálise, ácido-base ou nucleófila da reacção de hidrólise catalisada. Estas moléculas hidrolisam cataliticamente o ligando reagente.

Os anticorpos e enzimas são ambos proteínas cuja função depende da sua capacidade de se ligarem a moléculas alvo específicas. As reacções enzimáticas diferem das reacções imunológicas pois que numa reacção enzimática, a ligação do enzima ao seu substrato conduz normalmente à catálise química enquanto que o resultado usual duma ligação anticorpo-antigénio é um complexo não catalítico.

Crê-se que os enzimas catalisam a hidrólise das proteínas por se combinarem com a proteína, estabilizando o estado de transição da reacção de hidrólise. Crê-se geralmente que a velocidade de uma reacção enzimática é aumentada relativamente à velocidade de uma reacção não-enzimática devido à capacidade do enzima estabilizar o estado de transição da reacção, isto é, de reduzir a energia livre do estado de transição e portanto a energia livre de activação da reacção [Jencks, W.P., Adv. Enzymology, 43, 219 (1975) e Pauling, L., Amer. Scientist, 36 58 (1948)]. Um apoio para esta teoria vem da observação de que



substâncias que se pensa regularem os alegados estados de transição estão muitas vezes, fortemente ligadas ao enzima como inibidores competitivos. Leinhard, G., Science, 180, 149 (1973) e Wolfenden, R., Acc. Chem. Res., 5, 10 (1972). Pensa-se ainda que o enzima obtém esta redução de energia livre por se ligar à geometria do estado de transição do reagente mais fortemente do que se liga ao(s) corresponde(s) substrato(s) ou produto(s).

Isto significa que a energia de ligação intrínseca do enzima é muito maior do que a que se pode medir pela ligação dos substratos ou produtos. A energia de ligação do enzima é utilizada, principalmente, para realizar a reacção química [Jencks, W.P., XVII International Solvay Conference (November 1983)].

A proposição inversa é a de que um anticorpo que seja preparado para se ligar optimamente a uma imitação adequada de um estado de transição, funcionará como um catalisador. A demonstração deste resultado completa a correlação entre a função do enzima e a estrutura dum anticorpo e permite-nos uma abordagem útil para projectar enzimas artificiais.

A ideia básica que está por detrás da hidrólise imunológica aqui descrita contempla o uso de um ligando hapténico na indução de anticorpos de especificidade predeterminada que (a) de preferência se ligam, e portanto estabilizam, o estado de transição da hidrólise da ligação amida ou éster, por ligação ao ligando reagente especificado e que (b) presumivelmente proporcionam um residuo de aminoácido, catalisador de reacção ácido-base ou nucleófila, ionicamente carregado, no local de combinação induzido. Um ligando hapténico útil estimula, neste caso, a conformação mas não a carga iónica de um estado de transição de alta energia da hidrólise da amida ou éster, para induzir a produção de anticorpos com a capacidade de se ligarem aos referidos substratos (ligandos reagentes) e de estabilizarem a sua hidrólise. O ligando hapténico também inclui um grupo que proporciona uma carga iónica, em solução aquosa a valores fisiológicos do pH, para induzir um residuo de aminoácido de

carga oposta no local de combinação do anticorpo. Crê-se que o resíduo de aminoácido de carga oposta proporciona o efeito catalítico da reacção ácido-base ou nucleófila

Esta ligação preferencial e estabilização resulta numa redução da energia de activação da reacção de hidrólise, indo ao encontro de um critério para a catálise. A presença de um resíduo de aminoácido carregado, no local de combinação, pode simular os resíduos carregados presentes em locais activos dos enzimas proteolíticos, como sejam as proteases da serina. Os anticorpos que apresentam esta propriedade podem ser obtidos por imunização com haptenos sintéticos que estejam quimicamente modificados de modo a induzirem um resíduo carregado e a simularem as características de ligação de um substrato de ligando reagente que esteja a sofrer hidrólise de ligações, isto é, por imunização com um simulacro estereoquímico do estado de transição de determinada reacção.

Mostrou-se que anticorpos monoclonais catalisam diversas reacções de transferência de acilo [(a) Tramontano et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6736 (1986); (b) Tramontano et al. Science, 234:1566 (1986); (c) Jacobs et al., J. Am. Chem. Soc., 109:2174 (1987); (d) Napper et al., Science, 237:1041 (1987); (e) Janda et al., Am. Chem. Soc., 110:4835 (1988); (f) Janda et al., Science, 241:1199 (1988); (g) Janda et al., Science, 244:437 (1989)], utilizando modelos de estados de transição hapténicos [(Lerner et al., BioAssays, 9:107-122 (1988)].

Com vista a expandir o âmbito e as capacidades destes receptores ou anticorpos hidrolíticos, também aqui referidos como abzymas ("abzymes"), devem ser desenvolvidas novas estratégias para causar a actividade catalítica nos locais de combinação dos anticorpos. Relatórios recentes têm-se concentrado sobre a modificação de um local ou bolsa de ligação do anticorpo, quer através de métodos semi-sintéticos [(a) Pollack et al., Science, 242:1038 (1988) (b) Pollack et al., J. Am. Chem. Soc., 111:1929 (1989)] quer de mutagénese dirigida ao local [Baldwin et al., Science, 245:1104 (1989)]. Contudo a generalidade destas estraté-



gias pode ser reduzida devido à carência de dados estruturais disponíveis sobre anticorpos catalíticos.

Sentia-se que podia ser mais vantajoso um processo que pudesse induzir grupos cataliticamente activos de novo a partir de um antigénio hapténico, pois que se pode aproveitar a grande variabilidade da resposta imunitária, através dos processos somáticos de mutação, para realizar a mutagénese "in vivo". Os "Resultados" aqui adiante discutidos descrevem uma táctica que obriga um resíduo de aminoácido, dentro do local de combinação da molécula de anticorpo induzida, a ajudar qualquer reacção de transferência de acilo, por uma metodologia anteriormente denominada catálise "engodo e comutação".

Este plano envolveu a colocação de uma carga iónica no antigénio ou ligando hapténico, Composto 1a (Figura 1), muito perto da porção acilo a ser hidrolisada. Nos anticorpos produzidos contra este hapteno considera-se que haja(m) resíduo(s) de aminoácido(s) no local de combinação, com uma carga complementar desta carga hapténica [(a) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 68:250 (1946); (b) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 75:686 (1953); (c) Grossberg et al., J. Am. Chem. Soc., 82:5470 (1960); (d) Shokat et al., Nature (London), 338; 269 (1989)].

Além disso, o Composto 1a apresenta ao anticorpo um grupo hidroxílico com uma geometria tetraédrica que serve como simulacro estereoquímico ou representação estereoquímica do estado de transição de transferência acilo. Manteve-se esta posição não carregada para que não houvesse efeitos electrostáticos adicionais.

O substrato benzoato ou ligando reagente, Composto 3, (Figura 1) correspondente ao composto hapténico 1a tem dimensões estereoquímicas semelhantes (determinadas por cálculos de MM2) mas carece de carga positiva. Em consequência, o resíduo de aminoácido ionicamente carregado que se assume estar no local induzido de combinação catalítica do anticorpo é libertado pela formação de um par iónico e actua como catalisador potencial

geral, ácido base ou nucleofílico.

O ligando hapténico piridina, Composto 2 (Figura 1), actua como controlo pois é estruturalmente idêntico ao Composto 1a, mas falta-lhe o grupo metilo e uma carga a valores fisiológicos do pH. Utilizou-se anteriormente a complementaridade de carga para eliminar um protão do substrato, numa reacção de eliminação β catalisada por anticorpo, ainda que não tivesse sido feita qualquer comparação com um hapteno neutro. Shokat et al., Nature (London), 338:269 (1989).

O termo "receptor" é aqui usado para designar uma molécula activa biologicamente que se liga a um ligando reagente, ligando inibidor ou ligando hapténico. As moléculas (catalíticas) receptoras, do presente invento, são anticorpos, anticorpos substancialmente intactos ou porções poliamida contendo idiotipo (contendo paratopo) de um anticorpo.

A actividade biológica de uma molécula receptora é evidenciada pela ligação do receptor ao seu ligando reagente antigénico, ligando inibidor ou ligando hapténico, após a sua mistura num meio aquoso, pelo menos a valores fisiológicos do pH e forças iónicas fisiológicas. De preferência, os receptores também se ligam a um ligando antigénico, numa gama de valores de pH entre cerca de 5 e cerca de 9 e a forças iónicas como entre a da água destilada e a do cloreto de sódio a cerca de 1 molar.

As porções poliamida contendo idiotipo (locais de combinação de anticorpos ou paratopos) de anticorpos são aquelas porções de moléculas de anticorpo que incluem o idiotipo e que se ligam ao ligando reagente ou ligando hapténico. Estas porções incluem os fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ preparados a partir de anticorpos por técnicas de cisão enzimática já bem conhecidas. Ver por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº. 4 342 566 de Theofilopoulos e Dixon, na generalidade, e, especificamente, Pollack et al. [Science, 234, 1570 (1987)], que relataram que as velocidades hidrolíticas aceleradas para os fragmentos Fab eram as mesmas que as da Ig nativa. Como os anticorpos dos quais se obtém as

poliamidas contendo idiotipos, são referidos como produzidos contra ou induzidos por imunogénios, os receptores de poliamida contendo idiotipos serão tratados como tendo sido "produzidos contra" ou "induzidos", sabendo-se que normalmente é necessário um passo de cisão para se obter de um anticorpo, uma poliamida contendo idiotipo. Preferem-se, contudo, anticorpos intactos e, no presente invento, estes serão usados para ilustrar moléculas receptoras.

Os receptores (moléculas catalíticas) úteis no presente invento são, de preferência, anticorpos monoclonais ou suas porções. Um "anticorpo monoclonal" é um receptor produzido por clones de uma única célula que produz, e muitas vezes segrega, uma só espécie de molécula receptora. A célula de hibridoma é um exemplo destas células e é obtida por fusão de uma célula produtora de anticorpo, com uma célula de mieloma ou com outra linha de células que se auto-perpetuam.

As técnicas de preparação de anticorpos monoclonais do presente invento, usando a tecnologia dos hibridomas, são já bem conhecidas. Estes receptores foram primeiramente descritos por Kohler e Milstein, Nature, 256, 495 (1975), aqui citados apenas para referência. Os anticorpos monoclonais são normalmente obtidos a partir de culturas de tecido de hibridoma ou de fluido ascítico obtido de mamíferos nos quais se tenha introduzido tecido de hibridoma. Ambos os métodos são aqui descritos.

As moléculas monoclonais catalíticas são aqui preferidas pela sua especificidade única em se ligarem a um determinado epítipo tal como um ligando hapténico imunizante particular e um ligando reagente, bem como pela sua actividade catalítica específica relativamente mais elevada quando comparada com a dos anticorpos policlonais. Podem também ser aqui usadas preparações de anticorpos policlonais mas normalmente têm de ser separadas em fracções que se ligam a ligandos hapténicos imunizantes em fracções que se ligam a epítopos estranhos como os dos portadores antigénicos.

Os anticorpos policlonais que se ligam ao ligando hapténico podem ser separados por separação por afinidade, usando um ligando hapténico como absorvente de afinidade. Após mistura e manutenção de uma preparação de anticorpo com o absorvente de afinidade durante um tempo suficiente para que tenha lugar a imunorreacção apropriada, separa-se o absorvente de afinidade da restante porção da preparação de anticorpo.

A porção restante separada do anticorpo, ligada ao absorvente de afinidade, contém os anticorpos que se ligam ao ligando hapténico, enquanto que os anticorpos na porção restante, separada, da preparação de anticorpos se ligam a epitopos estranhos. Esses anticorpos ligados por afinidade podem, depois, ser isolados pelas técnicas usuais para separar entidades ligadas, dos absorventes de afinidade, tais como a lavagem do absorvente com hidrócloro de glicina a pH 2.

Um "ligando" é aqui definido como uma molécula ou complexo que imunorreage ou se liga a um local de combinação duma molécula receptora de anticorpo. São aqui considerados dois tipos principais de ligandos. O primeiro é denominado ligando hapténico e é usado como imunogénio para induzir a preparação de moléculas de receptores, como inibidor da reacção catalisada pelas moléculas de receptores e como antigénio em ELISA ou outros ensaios. O segundo refere-se ao ligando reagente ou substrato e constitui a molécula que sofre a reacção catalisada. O ligando hapténico é essencialmente inerte em relação à reacção catalisada.

Os análogos químicos de ligandos reagentes amida ou éster, aqui descritos, têm sido sintetizados como haptenos que incorporam um átomo de carbono tetraédrico ligado directamente a um grupo hidroxilo e também ligado directamente ao átomo saturado de carbono num local específico, predeterminado, para mimetizar a conformação mas não a carga iónica do estado de transição na hidrólise de uma ligação amida ou éster de um ligando reagente estruturalmente semelhante ou análogo.

A hidrólise da ligação amida de polipéptidos ou proteínas

requer ligandos hapténicos que estejam substancialmente isentos de hidrólise quando utilizados como imunogénios hapténicos. Assim, um ligando hapténico que inclua o carbono tetraédrico, o seu grupo hidroxilo e o átomo de carbono adjacente saturado directamente ligado, está livre dessa possível hidrólise.

As cadeias polipeptídicas curtas podem induzir a produção de anticorpos que reconheçam e se liguem a uma proteína homóloga num local específico predeterminado. O presente invento representa um importante avanço relativamente ao trabalho anterior sobre polipéptidos.

Neste invento, os anticorpos (receptores) são induzidos por uma primeira molécula (o ligando hapténico) imunizante, que apresenta carga iónica e reconhecem e ligam-se não só a essa primeira molécula, mas também a uma segunda molécula relacionada (o ligando reagente) que esteja livre de carga iónica em posição análoga. Na ligação à segunda molécula, o receptor provoca hidrólise (que como aqui se mostrou é catalítica) de uma ligação pré-seleccionada de éster ou amida que corresponde, em topologia, à topologia da primeira molécula hapténica imunizante. A correspondência em topologia, isto é, o tamanho e a forma mas não a carga iónica, proporciona um meio de pré-seleccionar o local onde ocorre a hidrólise do ligando. Os ligandos inibidores que se assemelhem à estrutura de um ligando hapténico ou à de um ligando reagente são também ligados pelas moléculas do receptor.

Em consequência, por síntese de um ligando hapténico imunizante relativamente pequeno, pode induzir-se a produção de moléculas de receptor que reconhecem, que se ligam e que cindem, cataliticamente, uma ligação de amida ou éster numa outra molécula que contenha diversas ligações amida ou éster. Assim, podem ser preparadas moléculas receptoras que hidrolisem cataliticamente uma ligação escolhida, predeterminada, amida, de uma proteína ou polipéptido, como por exemplo uma proteína de fusão criada por engenharia genética ou uma ligação éster de um éster pré-seleccionada, num poliéster.

Este resultado implica que se pode conferir a actividade de proteases e esterases até agora desconhecidas, às imunoglobulinas.

II - Estado de Transição da Esterólise e Planeamento de Ligandos Hapténicos

O planeamento de ligandos hapténicos deriva da estrutura dos produtos de hidrólise a serem preparados, passa pelo estado de transição para a quebra de ligações a ser imitado e termina no ligando hapténico. Reacções que envolvem a hidrólise da amida ou do éster proporcionam exemplos ilustrativos dos conceitos gerais e são aqui utilizadas a título de exemplo para reacções de hidrólise de ésteres ou amidas.

Os processos de trans-acilação caracterizam-se por mecanismos de adição-eliminação de carbonilo. O grupo acilo pode, portanto, possuir vários graus de carácter tetraédrico neste estado de transição. W. P. Jencks, Catalysis in Chemistry and Enzymology, Ch. 10, (McGraw-Hill, New York, 1969). Seria de esperar que os enzimas que catalisam as reacções de trans-acilação se ligassem bem aos análogos do ligando reagente que tivessem uma configuração tetraédrica perto do centro acilo. Isto é verdade para as proteases da serina onde se forma temporariamente uma ligação covalente entre o ligando (substrato) e o enzima [Westerik et al., J. Biol. Chem., **247**, 8195 (1972); R.C. Thompson, Biochemistry, **12**, 47 (1973) e Imperiali et al., Biochemistry, **25**, 3760 (1986)] bem como para os enzimas que catalisam a hidratação directa das amidas ou ésteres. Esta última categoria é inibida por compostos com uma configuração tetraédrica que incluam um grupo fosfato, fosfonato ou um fosfonamidato em lugar da unidade cindível de amida [Weaver et al., J. Mol. Biol., **114**, 119 (1977) e Jacobsen et al., J. Am. Chem. Soc., **103**, 654 (1981)].

A hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos é um exemplo mais simples de trans-acilação que é aproximada pela imitação estereoquímica hapténica do estado de transição. As reacções de hidrólise de ésteres realizam-se, geralmente, a velocidades espontâneas convenientes às condições ambientais adequadas aos

anticorpos. Qualquer pequena aceleração na velocidade pode, portanto, ser facilmente detectada.

Um ligando hapténico útil contém um átomo de carbono tetraédrico que está ligado a um grupo hidroxilo bem como directamente ligado a um átomo de carbono saturado. Estes átomos imitam estereoquimicamente o átomo de carbono tetraédrico e o átomo de oxigénio ou de azoto (heteroátomo) ligado, do estado de transição de hidrólise de uma ligação amida ou éster de ácido carboxílico, mas não imitam a carga iónica do estado de transição. Assim, o átomo de carbono tetraédrico, o seu grupo hidroxilo e o átomo de carbono saturado ligado directamente, estão numa posição do ligando hapténico que corresponde à posição do grupo carbonilo bem como à do heteroátomo (oxigénio ou azoto) ligado ao carbonilo, respectivamente, da ligação pré-seleccionada de éster ou amida de ácido carboxílico, a ser hidrolisada no ligando reagente. Os resíduos químicos contendo átomos de carbono que sejam estruturalmente análogos aos resíduos contendo átomos de carbono do ligando reagente, estão ligados ao átomo de carbono tetraédrico e ao átomo de carbono saturado, de forma que os ligandos hapténicos e reagente são estruturalmente semelhantes ou análogos, excepto nos átomos em que a hidrólise tem lugar.

Esta imitação estereoquímica estrutural do carbonilo reactivo e do átomo de oxigénio ou de azoto difere, portanto, dos grupos fosfonato ou fosfonamidato ou do grupo carbonato, usados anteriormente pelos cientistas como análogos do estado de transição da hidrólise. A actual imitação estereoquímica difere ainda dos grupos discutidos na patente de Kim et al., em que a estrutura do hapteno deste invento contém uma valência mais baixa do que a estrutura análoga no substrato e contém o mesmo número de ligações que a estrutura análoga do substrato.

Um hapteno aqui considerado útil inclui, ainda, um grupo que apresenta uma carga iónica em solução aquosa, a valores fisiológicos do pH. Esse grupo que apresenta carga iónica pode ser ligado directamente ao átomo de carbono tetraédrico acima mencionado. De preferência, contudo, o grupo que apresenta carga

iônica está ligado indirectamente ao átomo de carbono tetraédrico e localiza-se dentro de um volume esférico definido por um raio de cerca de $7 \times 10^{-10} \text{ m}$ (7 Angstroms ($\text{\AA}$)) a partir do átomo de carbono tetraédrico. Com maior preferência, o raio terá de cerca de 2×10^{-10} até cerca de $5 \times 10^{-10} \text{ m}$ (2 a 5 $\text{\AA}$).

O grupo que apresenta carga iônica está ausente da posição correspondente do ligando reagente ou substrato e pode ser escolhido entre vários grupos bem conhecidos.

Por exemplo, grupos que apresentam uma carga negativa a valores fisiológicos do pH, para induzirem uma carga complementar positiva no local de combinação do anticorpo, incluem o carboxilo ($-\text{COH}_2$), fosfona [$-\text{P}(\text{OH})_2\text{O}$], sulfo ($-\text{SO}_3\text{H}$), fósforo [$-\text{OP}(\text{OH})\text{O}$], sulfato ($-\text{OSO}_3\text{H}$) e semelhantes. São exemplos de grupos que apresentam uma carga iônica positiva a valores fisiológicos do pH, para induzirem uma carga complementar negativa no local de combinação do anticorpo, o amino ($-\text{NH}_2$), guanidina [$-\text{NNC}(\text{N})\text{NH}_2$], amino mono- e dissustituído onde cada substituinte contém até cerca de 10 átomos de carbono, p. ex. um alquilo inferior em, C_1 - C_6 , benzilo, fenilo e naftilo, ou onde dois substituintes formam um anel de cinco ou seis membros, como no morfolino, piperidino, pirrolidino, compostos substituídos de guanidina com os substituintes acima referidos e grupos contendo azoto quaternário como os compostos de amónio trissustituídos, como o grupo trietilamónio ou um anel aromático quaternizado como um anel de quinolinio ou piridínio substituído. Cada um dos grupos acima de carga neutra, existe como grupo iónico de carga negativa ou positiva, em solução aquosa a valores fisiológicos do pH.

Preferem-se os grupos carboxilo e aminas quaternárias que se encontram em anéis heteroaromáticos e que proporcionam iões carboxilato e amónio. As aminas quaternárias, quando quaternizadas por quatro grupos substituintes ou por protonação e quando presentes em forma acíclica ou em forma cíclica como parte de um anel, p. ex. como num residuo de N-metil-piridínio, são todas consideradas como estando na classe dos grupos de amónio quando se discutem grupos que apresentam carga iônica.

Quando o grupo que apresenta uma carga iónica, a valores fisiológicos do pH, faz parte de um outro grupo que esteja ligado ao átomo de carbono tetraédrico acima mencionado, como é o caso do átomo de azoto quaternário do composto de N-metil-piridínio aqui ilustrado no composto 1a, o grupo que apresenta carga iónica é considerado como sendo o átomo de azoto quaternário do anel de piridínio. O grupo que apresenta carga iónica daquela estrutura está, portanto, ligado indirectamente ao átomo de carbono tetraédrico e o átomo desse grupo que apresenta carga iónica que apresenta a carga iónica, isto é, um átomo de azoto quaternário, está separado do átomo de carbono tetraédrico por pelo menos um átomo, de preferência um átomo de carbono. Uma molécula como a de um derivado do ácido glicólico contém o grupo iónico ligado directamente ao átomo de carbono tetraédrico e ao seu grupo hidroxilo.

O ligando reagente é estruturalmente análogo (semelhante) ao ligando hapténico e vice-versa, mas o ligando reagente está livre do acima referido grupo transportador de carga iónica em solução aquosa a valores fisiológicos do pH, que se situa numa posição estruturalmente análoga à posição desse grupo no ligando hapténico. Assim, o ligando hapténico Composto 1a que ilustra o invento, contém azoto quaternário do N-metil-piridínio enquanto que o ligando substrato, Composto 3, que ilustra o invento, contém um anel fenilo de carga neutra e os seus átomos de carbono e hidrogénio na posição correspondente.

O ligando hapténico e/ou o ligando reagente (substrato) podem ainda incluir um ou mais grupos adicionais que apresentem uma carga iónica em solução aquosa a valores fisiológicos do pH. Estes grupos que apresentam carga iónica podem estar em locais correspondentes ou não correspondentes nos dois tipos de moléculas de ligando. Além disso, um tal grupo adicional carregado ionicamente pode existir dentro do mesmo volume esférico definido para o grupo que apresenta carga iónica, acima descrito.

A presença num ou noutro ou em ambos os ligandos, hapténico e reagente, de um ou mais grupos carregados ionicamente, além de

pelo menos um destes grupos carregados ionicamente, acima descrito, pode também ser útil para facilitar a ligação de um hapteno ao local de combinação da molécula do catalisador. Este é particularmente o caso de se utilizar um hapteno relativamente pequeno como aqueles aqui ilustrados.

Por exemplo, estudos com dextranos mostraram que a ligação máxima de anticorpos anti-dextrano ocorre com dextranos que contenham seis ou sete resíduos de glucose. Estudos com oligômeros de polialanina mostraram ligação máxima com um tamanho de quatro a seis resíduos de aminoácido, Chapman et al., Microbiology, 2nd ed., Capítulo 16, páginas 444-447. Os oligômeros mais pequenos ligam-se menos bem e com glucose não exibem ligação.

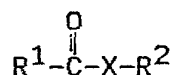
Assim, proporcionando qualquer dos dois ligandos ou ambos com uma ou mais cargas iônicas adicionadas pode ajudar-se à ligação no local de combinação do anticorpo catalítico através da complementação da carga bem como pelo ajustamento estutural quando o ligando é mais pequeno do que todo o tamanho que podia ser acomodado pelo local de combinação.

Portanto, o ligando hapténico contém pelo menos um grupo que proporciona uma carga iónica em solução aquosa a valores fisiológicos do pH, tal como uma amina, um átomo de azoto quaternário ou grupo carboxilo, que proporciona um grupo amónio ou um grupo carboxilato, respectivamente. Esse grupo carregado está dentro do volume esférico definido e não tem uma posição correspondente no ligando reagente.

Como já se fez notar, o volume esférico, no qual se localiza pelo menos um grupo que apresenta carga iónica no ligando hapténico, é definido por um raio de cerca de $7 \times 10^{-10} \text{ m}$ ($7 \text{ \AA}$) a partir do átomo de carbono tetraédrico e, com maior preferência, dentro dum volume definido por um raio de cerca de 2×10^{-10} até cerca de $5 \times 10^{-10} \text{ m}$ ($2 \text{ a } 5 \text{ \AA}$), a partir do átomo de carbono tetraédrico. Esses volumes esféricos e raios podem ser calculados usando programas de computador já bem conhecidos na arte ou pelo uso de modelos moleculares.

Note-se que a colocação de pelo menos um grupo que apresenta carga iónica no ligando hapténico é tal que o residuo de aminoácido, com carga complementar presumivelmente induzida, do local de combinação do anticorpo, tenha acesso ao grupo carbonilo e aos átomos, a si ligados, de oxigénio e azoto do éster ou amida a ser hidrolisado. Posto de modo diferente, o grupo que apresenta carga iónica do ligando hapténico não está estereoquimicamente impedido pelo átomo de carbono tetraédrico, pelo seu grupo hidroxilo e átomo de carbono saturado adjacente.

Um ligando reagente útil é representado pela estrutura

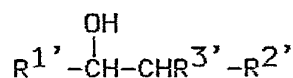


onde R^1 e R^2 representam residuos quimicos contendo átomos de carbono e $-\text{X}-$ é $-\text{O}-$ ou $-\text{NR}^3-$ onde R^3 é hidrogénio ou um terceiro residuo quimico contendo carbono.

R^1 e R^2 podem ser iguais ou diferentes. Cada um pode ser um residuo de aminoácido, um polipeptido ou proteína, bem como um radical orgânico como um residuo cíclico ou de cadeia aberta, linear ou ramificada, alifático ou alifático substituído, incluindo um residuo contendo heteroátomos, cíclico ou de cadeia aberta e pode, também, ser um residuo aromático, aromático substituído, heteroaromático ou heteroaromático substituído. Desde que o ligando reagente possa ser solubilizado em meio aquoso que não iniba substancialmente a acção da molécula catalisadora e seja suficientemente grande para ser ligado pelo catalisador, as estruturas específicas de R^1 e R^2 podem essencialmente ser quaisquer residuos quimicos contendo carbono.

Quando for diferente de hidrogénio (H), R^3 pode também essencialmente ser qualquer residuo quimico contendo carbono, como no caso de R^1 e R^2 .

Um ligando hapténico é estruturalmente análogo (semelhante) ao ligando reagente. Um ligando reagente é representado pela estrutura



onde $\text{R}^1\text{'}$ e $\text{R}^2\text{'}$ representam resíduos contendo átomos de carbono que sejam estruturalmente análogos (semelhantes) a R^1 e R^2 , respectivamente, e $\text{R}^3\text{'}$ é estruturalmente análogo (semelhante) a R_3 quando $-\text{X}-$ for $-\text{NR}_3-$. Quando $-\text{X}-$ for $-\text{O}-$, $\text{R}^3\text{'}$ será hidrogénio. Pelo menos um, entre $\text{R}^1\text{'}$ e $\text{R}^2\text{'}$, dará também o grupo transportador de carga iónica em solução aquosa a valores fisiológicos de pH, que está ausente do ligando reagente e esse grupo está dentro do volume esférico anteriormente discutido.

Refere-se na prática que os membros dos pares de grupos R , R^1 e $\text{R}^1\text{'}$, R^2 e $\text{R}^2\text{'}$, R^3 e $\text{R}^3\text{'}$, sejam de tal modo análogos estruturalmente que R^1 e $\text{R}^1\text{'}$ sejam substancialmente idênticos, R^2 e $\text{R}^2\text{'}$ sejam substancialmente idênticos e R^3 e $\text{R}^3\text{'}$ sejam substancialmente idênticos, excepto quando $-\text{X}-$ for $-\text{O}-$. Nesta situação preferida, as diferenças entre os pares de grupos R , numerados de modo semelhante, são o ligando hapténico conter o grupo transportador de carga iónica ausente no ligando reagente, e o ligando hapténico incluir também um átomo ou grupo que seja utilizado para ligar o ligando hapténico à molécula portadora de antigénio (imunogénica) para formar um conjugado imunogénico, como adiante se discute.

Excepto quanto às diferenças acima citadas, os grupos de pares numerados de modo semelhante, são de preferência aproximadamente do mesmo tamanho, formato, carga e grau de insaturação. Se o tamanho dos pares de grupos R , numerados de modo semelhante, diferir, então prefere-se que o ligando hapténico seja de maior tamanho do que o ligando reagente, de modo que o ligando reagente, mais pequeno, se possa acomodar no local de ligação catalítica induzida.

As estruturas dos ligandos hapténicos e dos ligandos reagentes, utilizados neste invento, foram escolhidas de acordo com certos critérios. Estes critérios incluem a disponibilidade e estabilidade dos precursores que contêm átomos de carbono tetraédrico, o correspondente substrato de éster ou amida de

ácido carboxílico, a conveniência da síntese química para a sua preparação e a adaptabilidade a diversos esquemas de apresentação imunológica. Incluindo substituintes amino nos anéis aromáticos, no grupo benzílico ou no fenólico, por exemplo, pode obter-se um prolongamento funcional para ligação às proteínas de veículo imunogénico para a apresentação hapténica.

III - Células Produtoras de Anticorpos Catalíticos e Processos

As células que, quando cultivadas em meio apropriado, produzem moléculas catalisadoras monoclonais (moléculas de anticorpos ou moléculas que contêm porções de locais de combinação dos anticorpos) que hidrolisam cataliticamente uma ligação pré-seleccionada, éster ou amida de ácido carboxílico, de um ligando reagente são também abrangidas pelo invento. Essas células de preferência, segregam também as moléculas referidas no ambiente do seu meio de cultura, quer o ambiente do meio de cultura seja in vitro ou in vivo. Numa concretização preferida, essas células são células de hibridoma tal como o hibridoma 30C6.

Geralmente, estas células produtoras de moléculas catalisadoras são preparadas imunizando um animal de laboratório, como um ratinho, uma ratazana, uma cabra ou um cavalo, com um imunogénio que contenha uma quantidade indutora de anticorpo de um ligando hapténico acima descrito. Normalmente, o imunogénio é um conjugado do ligando hapténico com um veículo antigénico (imunogénico), como adiante se discute.

O animal assim imunizado é mantido durante um período de tempo suficiente para que o animal segregue anticorpos que imunorreajam com o ligando hapténico. O ensaio ELISA, adiante discutido, é útil para determinar a imunorreacção necessária.

Os genes que codificam as moléculas de anticorpo ou as moléculas que contêm porções de locais de combinação dos anticorpos, de células que produzem anticorpos do referido animal em período de manutenção, como os esplenócitos, são transferidos para células hospedeiras. Esta transferência de genes forma células híbridas que contêm genes de pelo menos duas origens. As

células híbridas produzem moléculas de anticorpo ou com porções de locais de combinação de anticorpos a partir dos genes transferidos, quando cultivadas adequadamente, e podem ser cultivadas por tempo substancialmente indefinido no que se refere a células produtoras de anticorpos a partir das quais se transferem os genes. São exemplo de células que podem ser cultivadas por tempo substancialmente indefinido no que se refere a células que transferem genes, as células de hibridoma, células de E. coli, células de leveduras como a S. cerevisiae, células de mamíferos transformadas como sejam as células CHO e semelhantes.

As células híbridas assim produzidas são cultivadas em meio de cultura apropriada, p. ex., in vivo ou in vitro, durante um período de tempo suficiente para que essas células híbridas cultivadas produzam moléculas de anticorpos ou moléculas que contenham locais de combinação de anticorpos, moléculas essas que são depois recolhidas. Exemplos de condições de cultura in vivo ou in vitro das células de hibridoma são aqui discutidas e são já bem conhecidas, como são as condições de cultura de células como a E. coli, S. cerevisiae, CHO e semelhantes.

As células recuperadas são, então, seleccionadas para se identificar uma célula híbrida que produza moléculas que hidrolisem cataliticamente a ligação éster ou amida de ácido carboxílico, pré-seleccionada, do ligando reagente. Uma vez identificada essa célula híbrida, desenvolvem-se mais clones dessa célula híbrida.

O processo referido anteriormente abrange a preparação de hibridomas, um processo bem conhecido na arte e que é aqui discutido em pormenor. É também sabido na arte que os genes que codificam substancialmente apenas a porção local de combinação de anticorpo de uma molécula de anticorpo, podem ser transferidos de uma célula de mamífero para outra e pretende-se que o processo acima descrito inclua também esses processos. Também se pretende que o processo acima descrito abranja o processo de Shastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728 (1989) e Huse et al., Science, 246:1275 (1989), cujas revelações são aqui incorporadas

apenas para referência, em que as moléculas contendo porções de locais de combinação do anticorpo são produzidas em organismos de não mamíferos, como a E. coli pelo uso de técnicas de engenharia genética. Os genes transferidos, citados nesses trabalhos, resultam do uso de ARNm a partir de hibridomas ou de baços de animais imunizados para preparar genes codificadores de porções anticorpo V_H ou Fab, respectivamente, que foram expressos em células de E. coli.

Num outro aspecto do processo deste invento, uma quantidade catalítica das moléculas anticorpo monoclonais ou de moléculas que contenham porções de locais de ligação de anticorpos (moléculas catalíticas) produzidas por aquelas células, são misturadas com moléculas de ligando reagente num meio aquoso para formar uma mistura reaccional. A mistura reaccional assim constituída é mantida por um periodo de tempo suficiente para que as moléculas do ligando reagente se liguem às moléculas catalíticas e para que as moléculas catalíticas hidrolisem cataliticamente a ligação pré-seleccionada. Se tal for pretendido, pode-se recolher o produto da reacção de hidrólise.

Este processo hidrolítico deste invento utiliza um meio aquoso como parte da mistura reaccional. O meio contém, normalmente, água e sais tampão. Além disso, o meio pode conter outros sais como o cloreto de sódio, bem como sais de cálcio e magnésio solúveis em água, como é frequente encontrar em meios contendo proteínas. Podem também estar presentes solventes orgânicos como o metanol, etanol, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dioxano, hexametilfosforamida e N,N-dimetilformamida. Podem ainda estar presentes agentes tensio-activos que emulsificam o ligando reagente e a molécula receptora. A característica crítica dos ingredientes presentes no meio aquoso é a de que esses ingredientes não interfiram substancialmente ou inibam a reacção catalítica, p. ex., por desnaturação da molécula catalítica. Além disso, o meio aquoso deve ser substancialmente isento de sais, proteínas em geral, e de enzimas, especialmente, que inibam a reacção de cisão de ligação, catalisada pela molécula catalítica.

O meio aquoso tem normalmente um valor de pH de cerca de 5 até cerca de 9 e, de preferência, de cerca de 6,0 até cerca de 8,0. Podem ainda ser utilizados valores de pH maiores e menores do que os valores citados desde que a reacção catalisada, uma vez mais, não sofra interferência substancial ou seja inibida.

As reacções catalíticas realizam-se normalmente à temperatura ambiente, isto é, desde cerca de 20 até cerca de 25°C ou a 37°C, e a uma pressão atmosférica ambiente, isto é, a cerca de uma atmosfera. Podem contudo também ser usadas temperaturas até cerca do ponto de congelação do meio aquoso e até ao ponto de ebulição do meio, à pressão atmosférica. Como se sabe, as proteínas como as moléculas catalíticas referidas tendem a desnaturar-se a temperaturas elevadas como aquelas a que um meio aquoso ferve, isto é, a cerca de 100°C, e assim preferem-se temperaturas abaixo de 40°C.

O ligando reagente está presente numa mistura reaccional numa quantidade até à da sua solubilidade no meio aquoso. Pode também ser usado um sistema de duas fases que inclua o ligando reagente insolúvel, mas normalmente não se usa deste modo. Normalmente, as concentrações usadas do ligando reagente estão entre cerca de 0,1 micromolar (μM) até cerca de 10 milimolar (mM), sendo esse valor função da solubilidade do ligando reagente no meio aquoso. Se se desejar o produto, per se, usam-se concentrações relativamente mais elevadas do que as concentrações baixas usadas quando se estuda o mecanismo da reacção ou a cinética da reacção.

Está, também, presente uma quantidade cataliticamente eficaz das moléculas catalíticas. Assim, as moléculas catalíticas são normalmente usadas numa razão molar em relação ao ligando reagente, de cerca de 1:2 até cerca de 1:10 000, preferindo-se uma razão molar de cerca de 1:10 até cerca de 1:100.

A razão moléculas catalíticas/ligando reagente depende normalmente da densidade das moléculas catalíticas em relação ao ligando reagente e da finalidade do utilizador ao realizar a

reacção. Assim quando se pretende obter o produto, usa-se uma concentração de moléculas relativamente mais elevada e uma razão moléculas catalíticas/ligando reagente mais elevada. Quando se estuda o mecanismo da reacção ou a cinética da reacção usam-se, normalmente, concentrações e razões mais baixas. Pode também usar-se uma quantidade estequiométrica de moléculas catalíticas ou ainda menos, mas, como se utilizam moléculas catalíticas, o uso de quantidades mesmo estequiométricas pode representar um desperdício.

A duração do período de tempo de manutenção da reacção é função de vários parâmetros incluindo as moléculas catalíticas e o ligando reagente escolhidos, as suas concentrações, valores de pH e temperatura, bem como aquilo que se procura obter da reacção. Quando se realizam estudos de cinética, encontram-se frequentemente tempos de manutenção de minutos até horas. Quando se pretender obter produtos da reacção, os tempos de manutenção mais usuais são de horas até dias.

IV - Resultados

Os ligandos hapténicos, Compostos 1a e 2, foram sintetizados em 5 e 4 passos, respectivamente, começando a partir do brometo de 4-nitro-fenetilo como se descreve adiante. [Todos os novos compostos mostraram análises espectroscópicas (RMN, IV) e de combustão satisfatórias ($\pm 0,3\%$)]. Ambos os ligandos hapténicos Compostos 1a e 2 foram acoplados (através de éster N-hidroxisuccinimida) às proteínas portadores de albumina de soro bovino (BSA) e à hemocianina de lapa (género *Fissurella*) (KLH) para formarem conjugados imunogénicos. Foram imunizados ratinhos 129GIX⁺ com o conjugado de KLH dos compostos 1a e 2 e criaram-se anticorpos que se pesquisaram como adiante se descreve. [(a) Kohler et al., Nature (London), 256; 495 (1975); (b) Engvall, Method Enzymol, 70:419 (1980)].

A imunização com o ligando hapténico Composto 1a produziu 23 hibridomas, enquanto que o ligando hapténico, Composto 2, produziu 21 hibridomas que se ligaram aos respectivos haptenos. Todos os monoclonais eram da classe IgG e foram purificados a

partir de fluido ascítico por cromatografia de permuta aniônica seguida de cromatografia de afinidade numa coluna de proteína G. Os anticorpos foram considerados homogêneos, por electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio.

Os anticorpos monoclonais, a uma concentração de 20 μ M, foram inicialmente pesquisados (tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, 37°C) contra o éster benzoato do ligando reagente, Composto 3, (500 μ M) quanto à produção do ácido 5-[[4-(hidroxi)-fenil]amino]-5-oxo-pentanoico, Composto 4. [A análise foi realizada por HPLC numa coluna RP-C18 eluindo com água/acetonitrilo (op:10) a um caudal de 1 ml/min, com detector de UV aos 254 nm. O produto de hidrólise, Composto 4, (Figura 1; tempo de retenção 7 min) foi recolhido (recuperado) e verificou-se ser idêntico por análise de co-injecção RP-HPLC e análise espectral de massa, com uma amostra autêntica].

Dos 23 anticorpos monoclonais obtidos do ligando hapténico, Composto 1a, sete foram considerados catalíticos. Nenhum dos anticorpos para o ligando hapténico, Composto 2, mostrou qualquer tendência para acelerar a velocidade de hidrólise do éster do ligando reagente, Composto 3.

Os 7 anticorpos considerados catalíticos, foram completamente inibidos pela adição do hapteno livre, Composto 1b. Tais resultados sugerem que a catálise se segue à ligação do substrato na bolsa de ligação do anticorpo ou no local de combinação do anticorpo.

Altamente significativo foi o esmagador número de anticorpos catalíticos induzidos pelo ligando hapténico Composto 1a vs. Composto 2. Um destes sete anticorpos catalíticos, denominado hibridoma e anticorpo monoclonal 30C6, foi caracterizado em pormenor.

A velocidade inicial de hidrólise do substrato ou do ligando reagente, Composto 3 (fosfato 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,2, 37°C) catalisado pelo anticorpo monoclonal 30C6 (20 μ M) seguiu a

cinética de Michaelis-Manten [as concentrações do produto de hidrólise, Composto 4, foram determinadas por medidas por HPLC da altura do seu pico em relação à do padrão interno, ao longo de 1-2 horas (3 ou mais determinações)]. Uma curva padrão mostrou linearidade das concentrações do produto de hidrólise Composto 4 (até 0,5 mM) com valores de K_{cat}^{ap} e K_m , de $5 \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e $1,12 \pm 0,05 \text{ mM}$, respectivamente. A hidrólise catalisada por anticorpo de benzoato do ligando reagente, Composto 3, foi inibida competitivamente ($K_1 = 83 \pm 5 \text{ }\mu\text{M}$) pela adição do sal de piridínio do Composto 1b.

A dependência do pH, da hidrólise do substrato, Composto 3, foi examinada na presença de anticorpos monoclonais 30C6 (20 μM) entre pH 6,0 e 7,2 (Bis-tris) e 7,2-8,0 (fosfato), ambos com tampão 50 mM, NaCl 100 mM e a 37°C (Figura 2). A dependência de pH, do K_{cat}^{ap} , revela a participação da forma básica de um grupo dissociável, cujo pK_a foi determinado como sendo $6,26 \pm 0,05$ (Figura 2A). A variação da concentração iónica do tampão (12,5-50 mM) não mostrou dependência de K_{cat} da presença da espécie tampão.

Para se fazer uma comparação directa, mediram-se também as velocidades de hidrólise (K_{obs}^c) do ligando reagente Composto 3, ao longo da região idêntica de pH, extrapolada até à concentração zero do tampão (Figura 2B). O perfil do pH vs. velocidade implicou que as espécies (Bruice et al., Bioorganic Chemistry; Benjamin: New York, 1965; Vol. 1) envolvidas na cisão seriam água na região de pH de 6,0 a 6,5 ($K_c = 0,6 \times 10^{-9} \text{ min}^{-1}$) e hidróxido de pH 6,6 e acima ($K_{OH^-} = 4,2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

A razão K_{cat}/K_o , uma comparação da velocidade de hidrólise catalisada por anticorpo e independente do pH, do substrato Composto 3 com a da hidrólise em água, corresponde a uma aceleração da velocidade pelo anticorpo de mais de um milhão de vezes. É significativo que o pH óptimo da reacção catalisada pelo anticorpo se tenha deslocado para uma região neutra do pH, pela participação de um residuo de aminoácido, até agora não identificado, que está presumivelmente carregado negativamente.

Os compostos de hapteno, Composto 5a e 6, foram sintetizados a partir do brometo de 4-nitrofenetilo como adiante se refere. O antigénio dimetilaniínio, Composto 7, foi preparado a partir do álcool 4-amino-benzílico como também adiante se refere. O conjugado dos Compostos 5a, 6 e 7, produziram 18, 22 e 26 hibridomas, respectivamente, sendo todas as moléculas receptoras monoclonais da classe IgG.

Os anticorpos, a uma concentração de 20 μM , foram inicialmente pesquisados (tampão fosfato 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, 37°C) por um ensaio HPLC contra o éster benzoato Composto 3 (500 μM) quanto à produção de ácido 5-[(4-hidroxifenil)amino]-5-oxopentanoico, Composto 4. Dos 18 monoclonais obtidos para o Composto 5a, três eram catalíticos. Os 22 e 26 anticorpos obtidos das imunizações com haptenos, Compostos 6 e 7, respectivamente, mostraram um efeito insignificante ou inibidor sobre a velocidade espontânea de hidrólise do Composto 3. Os três anticorpos que se verificaram ser catalíticos foram completamente inibidos pela presença de 50 μM do carboxilato, Composto 5b.

A cinética do anticorpo catalítico mais eficiente, o receptor monoclonal segregado pelo hibridoma 27A6 obtido a partir de imunizações com o hapteno, Composto 5a, foi caracterizada em pormenor. Esse receptor monoclonal é também referido como receptor ou anticorpo 27A6. A velocidade inicial de hidrólise do Composto 3 [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinopropano-sulfónico (EPPS) 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5, 37°C] catalisada pelo receptor 27A6 seguiu a cinética de Michaelis-Menten, com valores de K_{cat} e K_{M} de $0,01 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ e $(243 \pm 15) \times 10^{-6} \text{ M}$, respectivamente. A hidrólise catalisada por anticorpos, do benzoato Composto 3 foi inibida competitivamente ($K_1 = 6 \pm 2 \text{ } \mu\text{M}$) pela adição de carboxilato Composto 5b.

Examinou-se a dependência no pH, da hidrólise do Composto 3 na presença do receptor monoclonal 27A6 (20 μM) entre pH 7,2-8,4 (EPPS) e valores de pH 8,4-10,0 [ácido 2-(ciclo-hexilamino)etanossulfónico (CHES)] com tampão 50 mM e NaCl 100 μM , a 37°C (Figura 3). A dependência do pH do $\log K_{\text{cat}}^{\text{ap}}$ (Figura 3A) foi



linear nesta região, tal como o foram a velocidade de fundo ("background") de hidrólise ($\log K_{obs}$: Figura 3B, triângulos a cheio) e a velocidade de hidrólise do Composto 3 extrapolada até à concentração zero do tampão ($K_{OH} = 2,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) (Figura 3B, quadrados a cheio). A variação da concentração do tampão (12,5 - 50 mM) na presença do receptor monoclonal 27A6 indicou não haver dependência de K_{cat}^{ap} da concentração da espécie tampão. Não houve diferenças nas velocidades observadas com o receptor monoclonal 27A6 quando ensaiado a pH 8,5 em EPPS e CHES (tampão 50 mM, NaCl 100 mM).

A actividade estereolítica do receptor monoclonal 27A6 não foi afectada pelo tratamento com pirocarbonato de dietilo ou com anidrido maleico num excesso molar de 50 vezes em relação à proteína. Um tratamento semelhante com fenilglioxal provocou uma perda de 75% da actividade catalítica. Esta mesma preparação de anticorpo mostrou, também, uma queda de 4 vezes no título (ligação ao hapteno, Composto 5b), observada por ELISA. O tratamento idêntico da proteína na presença do inibidor, Composto 5b, (em excesso molar de cinco vezes em relação à proteína) provocou apenas uma perda de 35% da actividade catalítica e nenhuma alteração apreciável no título.

Devido a estes resultados, outros anticorpos, catalíticos e não-catalíticos, para os haptenos, Composto 5a, 6 e 7, foram modificados quimicamente com fenilglioxal exactamente do modo acima descrito. Os anticorpos contra os, Compostos 6 (2G4, 4E3, 6H4, 6A11) e 7 (52D11, 57G12, 70F3, 5G3, 60A4) não foram afectados (ELISA). Em contraste, cinco anticorpos induzidos usando o Composto 5a (57G11, 60A4, 52D11 e 5G3) mostraram, todos, alguma perda de ligação (ELISA). Os anticorpos catalíticos 57G11 e 70F3 mostraram um decréscimo de 4 vezes no título e os anticorpos 60A4, 52D11 e 5G3 mostraram uma queda no título, respectivamente, de 3 vezes, 2 vezes e 1 vez.

A estratégia acima apresentada, baseada na utilização de anticorpos que foram induzidos a partir de uma série homóloga de haptenos (Figura 1) possuindo, cada um deles, uma carga pontual

muito próxima ou substituindo directamente o grupo químico (éster ou amida) a ser transformado no respectivo substrato (Figura 1), mostrou ser eficaz. Pensou-se que os anticorpos produzidos contra estes haptenos deveriam possuir resíduos de aminoácidos no local de combinação dos anticorpos ou no local de ligação com uma carga complementar a esta carga hapténica. O éster do substrato Composto 3 não tem esta carga mas retém uma estrutura global semelhante. Assim, após ligação do Composto 3, o resíduo de aminoácido do local de combinação está livre do seu papel original de estabilização de carga e pode agora servir como um ácido/base potencial ou como um elemento estabilizador do estado de transição.

Ainda que a complementaridade de carga anticorpo-hapteno fosse considerada essencial para o sucesso global do projecto, consideraram-se importantes duas outras áreas no planeamento do hapteno. A primeira foi a substituição da funcionalidade acilo a ser hidrolisada, a segunda foi a necessidade do uso de haptenos não carregados.

O primeiro ponto foi tentado usando iso-ésteres com a parte acilo adequada. Utilizou-se um grupo hidroxílico com uma geometria de tetraedro que servia como uma representação adequada do desenvolvimento do estado de transição. Esta posição foi intencionalmente deixada sem carga para que não houvesse efeitos electrostáticos adicionais. É contudo previsível que uma "segunda geração de haptenos" possa incluir um grupo fósforo, carregado, nesta posição, como se descreve na patente Americana Nº. 4629567 e pedido publicado europeu Nº. 0260439A2. Foram necessários haptenos não carregados como controlos [i.e., Compostos 2 e 6 (Figura 1)], para assegurar a validade da hipótese, uma vez que são estrutural e virtualmente idênticos aos Compostos 1 e 5, mas sem uma carga.

Os resultados acima mencionados mostraram que a estratégia "engodo e comutação" de catálise de reacções de transferência de acilo, era útil quando se empregava o sal de N-metilpiridínio Composto 1a para indução do anticorpo. Com este hapteno, 30% dos

anticorpos monoclonais obtidos eram catalíticos. Ainda que este número seja impressionante, mais interessante foi verificar que um destes receptores utilizava a participação de uma forma básica de um grupo ionizável ($pK_a = 6,26 \pm 0,05$) no processo catalítico. Além disso, o pH ótimo da reacção catalisada pelo anticorpo estava perto da neutralidade e a utilização do hapteno neutro, Composto 2, não mostrava tendência para induzir anticorpos catalíticos.

O hapteno, Composto 7, foi preparado como adiante se indica. A característica mais notável desta molécula é a carga catiónica tetraédrica que substitui directamente o carbono do acilo do substrato. Ainda que este hapteno possa mesmo ser considerado um afastamento mais radical dos substitutos típicos dos haptenos fosfonatos, ele dirige-nos para um certo número de questões, não respondidas anteriormente, relativas à estratégia de "engodo e comutação". Duas delas referem a importância da carga catiónica, incluindo a sua colocação em relação à ligação cindível do substrato e a relevância da substituição do carbono do acilo presente pelo hidróxilo isostérico.

Dos 26 anticorpos produzidos contra o hapteno, Composto 7, nenhum acelerou a velocidade de hidrólise de qualquer modo apreciável em relação à velocidade de fundo. Este resultado foi bastante intrigante em face do facto de que um antigénio semelhante, planeado pelo grupo de pesquisa de Schultz, mostrou uma elevada propensão (66%) para induzir anticorpos catalíticos para uma reacção de eliminação [Shokat et al., Nature (London), 338:269 (1989)]. Ainda que as reacções sejam bastante diferentes, o grupo Schultz obteve forte evidência de que o carboxilato estava envolvido no processo catalítico, como se verificou pelo uso do hapteno de metilpiridínio, Composto 1, para induzir anticorpos na reacção estereolítica. Estes resultados harmonizam-se com os obtidos com anticorpos dos haptenos Composto 1a e 2 e sugerem o seguinte: (1) A melhoria de velocidade observada com os receptores monoclonais induzidos a partir do hapteno, Composto 1a não são unicamente devidos à presença de um carboxilato actuando como base catalítica. (2) A funcionalidade no hapteno usado para



representar o estado de transição, é crítica. (3) A combinação de uma carga catiónica e, pelo menos, uma representação neutra do estado de transição, é necessário para induzir moléculas receptoras hidrolíticas.

Foi concebido um processo global semelhante a este (que usou um hapteno catiónico Composto 1a) utilizando um hapteno aniónico estruturalmente semelhante. O hapteno ácido benzoico, Composto 5a, preencheu os requisitos necessários. A espinha dorsal do Composto 5a era homóloga à dos Compostos hapténicos 1a e 2, ainda que possuisse uma carga pontual aniónica muito perto da porção acilo que planeavamos hidrolisar. A escolha de um grupo carboxilato baseou-se nos resultados de Pressman que indicavam que este tipo de funcionalidade numa molécula hapténica, tem uma forte propensão para induzir um aminoácido (isto é, lisina ou arginina) carregado positivamente, dentro da bolsa de ligação de anticorpo [(a) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 68:250 (1946); (b) Pressman et al., J. Am. Chem. Soc., 75:686 (1953); (c) Grossberg et al., J. Am. Chem. Soc., 82:5470 (1960)]. Pensou-se que qualquer das duas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos poderia ajudar no processo catalítico por estabilização geral por ácido ou electrostática, de um estado de transição. O último processo, envolvendo resíduos de arginina, tem estado implicado em catálises por enzimas [(a) Riordan et al., Science, (Washington, D.C.) 155:884 (1977); (b) Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:2551 (1979); (c) Springs et al., Tet Lett., 32:3223 (1977)].

Sintetisou-se o ácido hidroxietilbenzóico, Composto 5b. O composto foi "equipado" com éster N-hidroxi-succinimida Composto 5a para facilidade de ligação ao veículo de proteína. Imunizações para o conjugado Composto 5a-KLH, produziram 18 anticorpos monoclonais, três dos quais eram catalíticos e cuja catálise foi inibida pelo hapteno livre, Composto 5b. Ainda que o número de receptores catalíticos induzidos pelo Composto 5a não tenha sido tão grande como com o Composto 1a, foi agradável verificar que nenhum dos 22 anticorpos monoclonais induzidos pelo homólogo neutro (Composto 6) dos Compostos 1a e 5a era catalítico. Uma vez

mais se observava a importância da funcionalidade carregada contida na estrutura do antígeno.

Observações sobre o perfil pH-velocidade do receptor monoclonal 30C6 (induzido a partir do Composto 1a) indicaram que estava envolvida na catálise a forma básica de um grupo dissociável. Também se verificou a independência de K_{cat}^{ap} em relação à concentração da espécie tampão, como se verificou com o receptor monoclonal 27A6, que foi induzido pelo Composto 5a (Figura 1). Em contraste com o comportamento do receptor 30C6, surgiram resultados de uma dependência do pH, do K_{cat}^{ap} com o receptor 27A6 (Figura 3A). Ainda que tal pareça contradizer a essência da teoria de "engodo e comutação", pensa-se que o pK_a da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos do local de combinação, possa estar fora da zona de pH investigada, ou que interações electrostáticas de proteína-substrato (catálise electrostática) constituam a característica essencial da capacidade deste receptor para acelerar a reacção [Fersht, Enzyme Structure and Mechanism, Freeman, eds., New York (1985)].

Ainda que tenha sido impossível detectar qualquer envolvimento dos aminoácidos na reacção hidrolítica do receptor 27A6 através dos efeitos do pH, observou-se uma inactivação específica de todos os três (27A6, 57G12 e 70F3) anticorpos catalíticos, através do uso do fenilglioxal, reagente modificador da arginina [Takahashi, J. Biol. Chem., 243:6171 (1968)]. A perda de actividade (catalítica/de ligação) pode ser interpretada como sendo devido à reacção do reagente com uma cadeia lateral de resíduos de aminoácidos no local de ligação; ela pode ser significativamente reduzida pela presença do hapteno, Composto 5b.

Contudo, uma alteração de conformação após reacção do reagente num local diferente, conduziria a uma conclusão semelhante. Assim, é possível que um resíduo de arginina, situado algures que não no local de ligação, seja alterado quimicamente levando à estabilização de conformações da proteína onde o local de ligação está alterado, de modo que não mais se pode ligar ao

substrato Composto 3 ou ao hapteno Composto 5b. Esta complicação parece não se aplicar aqui.

Ensaio catalítico e ELISA demonstram, bem como estudos de ligação anteriores verificados por Freedman et al., Immunochem., 9:169 (1972) e Mayers et al., Immunochem., 9:169 (1972), que a glioxalação de grupos guanidínio destrói a actividade catalítica e/ou de ligação apenas de anticorpos contra haptenos carregados negativamente e não a de anticorpos contra o hapteno neutro, Composto 6, ou o hapteno carregado positivamente, Composto 7. Se a glioxalação exerceu o efeito de alterar um guanidínio distante do local de ligação pelo referido mecanismo, será difícil entender porque é que os anticorpos do Composto 6 ou do hapteno 7 não são afectados de modo semelhante. Crê-se assim que uma arginina, cujo grupo lateral guanidínio tem um valor de pK_a acima da zona aqui estudada, está no local de ligação e está envolvida na catálise observada.

Prevê-se um conjunto de cargas múltiplas que possa produzir um certo número de grupos catalíticos, dando à velocidade um efeito aditivo. Este feito combinado com o acesso a uma muito vasta diversidade de anticorpos catalíticos potenciais [Shastri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5728 (1989)] aumenta a probabilidade de se desenvolverem catalisadores muito melhores.

V - Preparação de Ligandos

A não ser que se mencione em contrário, as reacções foram realizadas em material de vidro seco à chama, em atmosfera de azoto. As transferências de reagente e solvente foram executadas com seringas e agulhas secas em estufa. O diclorometano e o acetonitrilo foram obtidos por destilação contínua com hidreto de cálcio. O tetra-hidrofurano (THF) foi destilado em sódio metálico/cetil-benzofenona. Todos os reagentes foram comparados à Aldrich Chemical Company. Todos os solventes de cromatografia foram obtidos no comércio e usados tal qual. As reacções foram controladas por métodos analíticos de cromatografia em camada fina (TLC) usando placas (0,25 mm) de vidro da E. Merck de sílica-gel 60F. A cromatografia flash foi realizada usando

silica-gel 60 (230-400 mesh) da E. Merck, tal como descreve Still et al., J. Org. Chem., **43**:2923 (1978).

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de ponto de fusão Fisher-John e não foram corrigidos. Todos os espectros de RMN de prótão (300 MHz) foram obtidos em soluções de CDCl_3 , CD_3CN ou de DMSO, à temperatura ambiente, num espectrómetro Bruker AM-300, os desvios químicos (α) referem-se em partes por milhão em relação ao tetrametilsilano interno (0,00 ppm). A análise elementar (C, H, N) foi realizada nos Galbraith Laboratories, Knoxville, TN.

Exemplo 1: p-nitrofenilacetaldeído

O p-nitrofenilacetaldeído foi preparado pelo processo descrito por Lethbridge et al., J. Chem. Soc. Perkin I, **35** (1973) a partir do p-nitrofeniletileno. O p-nitrofeniletileno foi preparado pelo processo descrito em Strassburg et al., J. Am. Chem. Soc., **69**:2142 (1947) a partir de 1-bromo-2-(p-nitrofenil)etano (obtido comercialmente na Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI).

Exemplo 2: Composto I

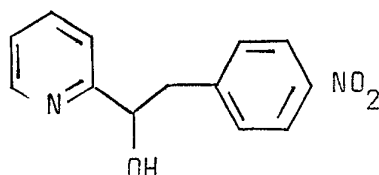
Juntou-se n-butil-lítio ($3,33 \times 10^{-2}$ moles) a tetra-hidrofurano (THF; 100 ml) mantido a -100°C em banho de éter/azoto. Juntou-se a esta mistura 2-bromo-piridina ($3,64 \times 10^{-2}$ moles), sob agitação, ao longo de 15 min. A temperatura da mistura reaccional subiu até -78°C quando se transferiu o recipiente da reacção para um banho de acetona/ CO_2 e agitou-se a mistura durante 1 h.

Juntou-se, lentamente, à mistura reaccional p-nitrofenil-acetaldeído (5 g; $3,03 \times 10^{-2}$ moles), obtido no Exemplo 1, dissolvido em THF (30 ml) e agitou-se a mistura durante 3 h a -78°C .

Após agitação, verteu-se a mistura para uma solução saturada de cloreto de amónio (500 ml) e éter dietílico. Extractou-se a mistura duas vezes com éter dietílico, as camadas etéreas juntas foram secas sobre sulfato de sódio e passaram numa coluna com 15% CH_3CN em CH_2Cl_2 . O produto, Composto I [1-hidroxi-1-(2-piridi-

nil)-2-(p-nitrofenil)etano] foi recolhido obtendo-se 648 mg ($2,7 \times 10^{-3}$ moles, 9% de rendimento).

^1H RMN 8,55 (d, 1H); 8,10 (d, 2H); 7,65 (m, 1H); 7,3 (d, 2H); 7,2 (m, 2H); 5,05 (dd, 1H); 3,20 (m, 2H).

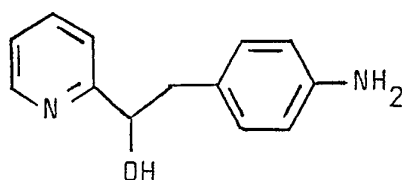


Composto I

Exemplo 3: Composto II

Juntou-se metanol seco (12 ml) a um recipiente de reacção, seco, de 25 ml, inundado com azoto.

Dissolveu-se o composto I (100 mg), obtido no Exemplo 2, em metanol, obtendo-se uma solução cor de laranja. A solução foi inundada com azoto e juntaram-se-lhe 10% de paládio sobre carvão (Pd/C, 75 mg). As paredes laterais do recipiente de reacção foram lavadas com uma pequena quantidade de metanol, inundou-se a solução com azoto e depois, com hidrogénio. Agitou-se a mistura reagente por cerca de 1 hora e depois filtrou-se por um leito de Celite. O filtro foi lavado 4 vezes com diclorometano (CH_2Cl_2) e, depois, foi lavado 3 vezes com metanol até que não se obtivesse, por cromatografia de camada fina (TLC), nenhum material de sujidade do filtro. As lavagens do filtrado foram secas com sulfato de sódio e evaporadas até à secura, obtendo-se 85,6 mg (97,6% de rendimento) de substância sólida, cristalina, amarela, Composto II [1-hidroxi-1-(2-piridinil)-2-(p-aminofenil)etano].



Composto II

Exemplo 4: Composto 2

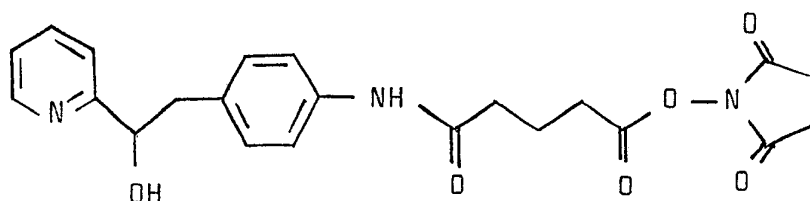
O Composto II (155 mg; $7,24 \times 10^{-4}$ moles) do Exemplo 3, foi

misturado com CH_2Cl_2 seco (1,5 ml) e trietilamina $[(\text{Et}_2\text{N})]$, $(1,45 \times 10^{-3}$ moles)]. Juntou-se cloreto de N-hidroxi-succinimidoil-glutaróilo (359 mg; $1,45 \times 10^{-3}$ moles) e a mistura reaccional resultante foi agitada a 25°C durante cerca de 40 minutos. O produto de reacção foi evaporado até à secura por roto-evaporação, obtendo-se 61,5 mg (20% de rendimento) de 5-[(2,5-dioxo)-1-pirrolidinil)oxi]-N-[4-[2-hidroxi-2-(2-piridinil)etil]fenil]-5-oxo-pentanamida (Composto 2).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,82 (s, 1H); 8,48 (d, 1H, $J=4,3$ Hz); 7,75 (dd, 1H, $J=2 \times 7,6$ Hz); 7,42 (d, 2H, $J=7,9$ Hz); 7,22 (m, 2H); 7,05 (d, 2H, $J=7,9$ Hz); 5,38 (d, 1H, $J=5,1$ Hz); 4,76 (dd, 1H, $J=4,0, 3,5$ Hz); 3,05 (dd, 2H, $J=13,7, 4,0$ Hz); 2,80 (s, 4H); 2,76 (t, 2H, $J=8,2$ Hz); 2,42 (t, 2H, $J=8,2$ Hz); 1,90 (m, 2H).

Anal. Calc. $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$: C, 62,12; H, 5,41; N, 9,88.

Obtido: C, 62,19; H, 5,37; N, 9,92 por cento.



Composto 2

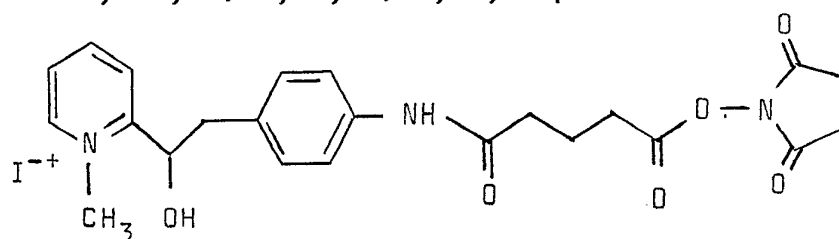
Exemplo 5: Composto 1a

Misturou-se o Composto 2 (30 mg; $7,06 \times 10^{-5}$ moles) do Exemplo 4, com iodeto de metilo ($7,06 \times 10^{-4}$ moles) em acetona (0,5 ml) e submeteu-se a refluxo durante cerca de 17 h. A mistura reaccional foi lavada 3 vezes com clorofórmio e depois lavada 3 vezes com acetato de etilo quente, obtendo-se 20 mg (50% de rendimento) do ligando hapténico iodeto de 2-[2-[5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-1,5-dioxopentil]-4-aminofenil]-1-hidroxietil]-1-metil-piridínio (Composto 1a).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,86 (s, 1H); 8,92 (d, 1H, $J=6,1$ Hz); 8,55 (d, 1H, $J=8,0$ Hz); 8,08 (t, 1H, $J=6,8$ Hz); 8,00 (t, 1H, $J=7,9$ Hz); 7,48 (d, 2H, $J=7,9$ Hz); 7,12 (d, 2H, $J=7,9$ Hz); 6,30 (d, 1H, $J=5,1$ Hz); 5,34 (dd, 1H, $J=4,0, 3,5$ Hz); 4,35 (s, 3H); 3,02 (dd, 2H, $J=13,6, 4,0$ Hz); 2,80 (s, 4H); 2,72 (t, 2H, $J=8,2$ Hz); 2,45 (t, 2H, $J=8,2$ Hz); 1,90 (m, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_6\text{I}$: C, 48,67; H, 4,59; N, 7,41.

Obtido: C, 48,11; H, 4,51; N, 7,37 por cento.



Composto 1a

Exemplo 6: 2-[(4-nitrofenil)metil]-1,3-dioxolana (Composto III)

Dissolveu-se p-nitrofenilacetaldeído (500 mg; $3,0 \times 10^{-3}$ moles) em CH_2Cl_2 (cerca de 1,5 ml). Juntou-se à mistura CaSO_4 (383 mg) seguido de resina Rexyn 101 (forma protônica, Fisher Scientific; 128 mg) e etilenoglicol ($13,8 \times 10^{-3}$ moles). Agitou-se a mistura sob azoto durante cerca de 4 horas. Antes de serem usados, a Rexyn 101 e o CaSO_4 foram mantidos durante 20 h a cerca de 120°C em estufa de secagem e depois arrefecidos num exsiccador.

Retirou-se uma amostra e fez-se uma mancha de TLC em CH_2Cl_2 puro. Juntou-se mais Rexyn 101 e CaSO_4 e agitou-se a mistura durante a noite (cerca de 16-18 h). Juntou-se CH_2Cl_2 (10 ml) à mistura, sob agitação. Verificou-se uma amostra por TLC que não mostrou impurezas.

Juntou-se água (10 ml), agitou-se a mistura, separou-se a camada orgânica, secou-se com sulfato de sódio e purificou-se por cromatografia flash usando hexano/acetato de etilo (2:1) obtendo-se 435,8 mg (70% de rendimento) do Composto III.

^1H RMN: δ 8,10 (d, 2H); 7,4 (d, 2H); 5,10 (t, 1H); 3,8 (s, 4H); 3,0 (d, 2H).

Numa segunda preparação, juntou-se etilenoglicol (5,4 ml, 97 mmol) a uma solução agitada de p-nitrofenilacetaldeído (3,0 g, 18,2 mmol) em 10,0 ml de cloreto de metileno. A isto juntou-se 1,0 g de resina de permuta catiónica Rexyn 101 (H) (Fisher Scientific) e 3,0 g de sulfato de cálcio em pó, previamente seco em estufa (120°C) durante a noite. Agitou-se a mistura durante 24 h, à temperatura ambiente, e verteu-se depois a mistura reagente sobre 100 ml de H_2O e extractou-se 3 vezes com porções de 50 ml

de cloreto de metileno. As camadas orgânicas combinadas foram secas com sulfato de sódio e purificadas por cromatografia flash com hexanos/acetato de etilo, 2:1, obtendo-se 2,28 g, 60% da quantidade teórica.

^1H RMN (CDCl_3) δ 8,18 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 7,42 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,08 (t, $J=4,3$ Hz, 1H), 3,8-4,0 (m, 4H), 3,06 (d, $J=4,3$ Hz, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$: C, 57,42; H, 5,26; N, 6,70.

Obtido: C, 57,51; H, 5,19; N, 6,65.

Exemplo 7: 4-(1,3-dioxolan-2-ilmetil)-benzenamina (Composto IV)

O Composto III (231 mg), do Exemplo 6, foi dissolvido em metanol (cerca de 3 ml) e passou-se azoto pela mistura. Juntou-se Pd/C (120 mg) à mistura e as paredes laterais do balão de reacção foram lavadas com metanol (cerca de 2 ml). Passou-se azoto pela mistura e depois passou-se hidrogénio. Agitou-se a mistura reaccional durante 45 min e depois filtrou-se por Celite. Lavou-se a Celite várias vezes com metanol e o filtrado e lavagens foram roto-evaporadas, obtendo-se 184,4 mg (90.6% de rendimento) do Composto IV.

Numa outra preparação, juntou-se o Composto III (2,0 g, 9,6 mmol) a 20 ml de metanol. A esta suspensão juntou-se 10% de paládio sobre carvão activado (200 mg), ligou-se ao balão uma garrafa de hidrogénio e agitou-se rapidamente à temperatura ambiente durante 6 h. Filtrou-se a mistura reaccional por celite e concentrou-se, obtendo-se 1,63 g, 95% da quantidade teórica. Este material foi utilizado sem purificação adicional na repetição do exemplo seguinte. TLC $R_f=0,3$, acetato de etilo/hexanos (1:1).

Exemplo 8: N-[4-(1,3-dioxolan-2-ilmetil)fenil-N-(fenilmetil)-benzenometanamina (Composto V)

O Composto IV (1,91 g, $1,07 \times 10^{-2}$ moles) do Exemplo 7, foi misturado com CH_2Cl_2 (10 ml) e Et_3N (4,45 ml, $3,2 \times 10^{-2}$ moles) e agitou-se. Juntou-se, gota a gota, à mistura agitada, brometo de benzilo ($1,07 \times 10^{-1}$ moles), depois de cerca de metade do Composto IV se ter dissolvido na solução. Dissolveu-se, então, toda a amina. Parou-se a reacção após cerca de 1 h. Fez-se passar

a solução numa coluna em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HCl}$ (9:1) e recolheram-se 3,048 mg (79% de rendimento) do produto pretendido (Composto V).

^1H RMN: δ 7,25 (s, 10H); 7,05 (d, 2H); 6,85 (d, 2H); 5,00 (t, 1H); 4,60 (s, 4H); 3,9 (m, 4H); 2,8 (d, 2H).

Repetindo a síntese acima, juntou-se trietilamina (4,5 ml; 32 mmol) a uma suspensão agitada do Composto IV (2 g, 11,2 mmol) em 10 ml de cloreto de metileno. A adição de brometo de benzilo (6,4 ml, 107 mmol) foi realizada, gota a gota, ao longo de 30 min, com agitação rápida, sendo a mistura resultante agitada por mais 60 min. Diluiu-se a mistura reaccional com cloreto de metileno (50 ml) e extractou-se com (2 x 25 ml) de HCl 0,5 M. Os extractos orgânicos combinados foram secos com sulfato de sódio e purificados por cromatografia flash em cloreto de metileno/hexanos, 4:1, obtendo-se 3,2 g, 80% da quantidade teórica. ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,35-7,23 (m, 10H), 7,06 (d, $J=8,6$ Hz, 2H) 6,66 (d, $J=8,6$ Hz, 2H) 5,50 (s, $J=4,3$ Hz, 1H), 4,62 (s, 4H), 3,8-4,00 (m, 4H), 2,82 (d, $J=4,3$ Hz, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_2$: C, 80,22; N, 6,96; O, 3,90.

Obtido: C, 80,35; H, 7,11; N, 3,86.

Exemplo 9: 4-[bis(fenilmetil)amino-benzenoacetaldeído (Composto VI)

O Composto V (2 g, $5,6 \times 10^{-3}$ moles) do Exemplo 8 foi dissolvido em acetona (6 ml) e agitado sob azoto. Juntou-se à mistura HCl 4 M (6 ml) e continuou-se a agitar até a mistura reaccional ficar ligeiramente amarela. Transferiu-se a mistura reaccional para um funil de separação contendo CH_2Cl_2 e lavou-se com NaCl aquoso. Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio e guardou-se sob vácuo, durante a noite (16-18 h).

A amostra passou em TLC e a marcação com ninidrina mostrou 5 manchas em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$ (4:1). O produto da reacção foi colocado numa coluna de 50 mm de sílica pré-absorvida e recolheram-se 500 mg (29% de rendimento) da mancha correspondente ao produto pretendido (Composto VI).

^1H RMN: δ 9,5 (t, 1H); 7,1 (s, 10H); 6,8 (d, 2H), 4,5 (s, 4H); 3,4

(d, 2H).

Numa outra preparação, juntaram-se 2 ml de HCl 4M, a uma solução de 2,0 g (5,6 mmol) do Composto V em 15 ml de acetona. Agitou-se esta solução durante 24 h à temperatura ambiente. Juntou-se sílica (10 g) à mistura reaccional e concentrou-se a mistura até à secura. Fez-se uma cromatografia flash, em cloreto de metileno/hexanos, 4:1, com o produto de reacção pré-absorvido em bruto, obtendo-se 0,7 g, 40% da quantidade teórica. ^1H RMN (CDCl_3) δ 9,7 (t, $J=2,9$ Hz, 1H), 7,40-7,20 (m, 10H), 7,00 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,7 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 4,66 (s, 4H), 3,54 (d, $J=2,9$ Hz, 2H).

Anal. Calc. $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}$: C, 83,81; H, 6,67; N, 4,44.

Obtido: C, 84,06; H, 6,58; N, 4,50.

Exemplo 10: ácido 2-[2-(4-aminofenil)-1-hidroxietil]-benzoico
(Composto VII)

Dissolveu-se ácido 2-bromobenzoico (88 mg, $4,33 \times 10^{-4}$ moles) em THF (2 ml) e arrefeceu-se até -78°C . Juntou-se n-butil-lítio (n-BuLi) ($8,38 \times 10^{-4}$ moles) e agitou-se a mistura durante 2 h.

Dissolveu-se o Composto VI (91 mg, $2,89 \times 10^{-4}$ moles), obtido no Exemplo 9, em THF (1 ml) e juntou-se à mistura agitando durante 4 h, a -78°C . A mistura reaccional foi diluída com acetato de etilo, lavada 2 vezes com NH_4Cl saturado seguido por uma lavagem com HCl 1M. Separou-se a fracção orgânica, secou-se com sulfato de sódio e roto-evaporou-se durante a noite (cerca de 16-18 h).

A TLC do produto em CH_2Cl_2 /hexano (4:1) mostrou duas manchas. Ambas foram recolhidas de uma coluna. O produto pretendido obtido (Composto VII) pesava 32 mg (25% de rendimento).

^1H RMN: 7,1-7,8 (m, 14H); 6,9 (d, 2H); 6,6 (d, 2H); 5,6 (t, 1H); 4,6 (s, 4H); 3,0 (m, 2H)

Numa outra preparação, dissolveu-se ácido 2-bromobenzoico

(957 mg, 4,8 mmol) em 20 ml de tetra-hidrofurano e arrefeceu-se até -78°C (CO_2 /acetona), juntou-se n-butil-lítio(n-buLi; 5,8 mM, 1,6 M em hexanos, 9,2 mmol) e agitou-se durante 1 h. Por uma cânula, juntou-se o aldeído Composto VI (1,9 g, 3,2 mmol) dissolvido em 10 ml de tetra-hidrofurano arrefecido até -78°C e depois agitou-se durante 4 h a -78°C . Verteu-se a mistura reaccional sobre cloreto de amónio saturado e extractou-se com 2 x 50 ml acetato de etilo. Os extractos orgânicos combinados foram secos com sulfato de sódio e purificados por cromatografia flash usando cloreto de metileno puro, obtendo-se 860 mg, 62% da quantidade teórica.

^1H RMN (CDCl_3) δ 7,90-7,80 (m, 1H), 7,68-7,40 (m, 2H), 7,40-7,05 (m, 11H), 7,0 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,64 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,62 (t, $J=7,1$ Hz, 2H), 3,64 (br s, 2H), 3,4-2,8 (m, 2H).

Anal. Calc. $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{NO}_3$: C, 80,37; H, 6,24; N, 3,23.

Obtida: C, 80,44; H, 6,29; N, 3,19.

Exemplo 11: ácido 2-[2-[4-[bis(fenilmetil)amino]fenil]-1-hidroxi-etil]-benzóico (Composto 5b)

Dissolveu-se o Composto VII (32 mg), obtido no Exemplo 10, em metanol (2 ml). Juntou-se Pd/C (10 mg), passou-se hidrogénio pela mistura reaccional e agitou-se durante cerca de 1,5 h até que todas as partículas desaparecessem, o que se determinou por TLC em CH_2Cl_2 /acetato de etilo (1:1), obtendo-se 16,2 mg (86% de rendimento) do Composto 5b.

Numa outra síntese, o carboxilato, Composto VII (320 mg, $7,3 \times 10^{-4}$ moles) foi dissolvido em 20 ml de metanol. Seguiu-se a adição de 10% de paládio sobre carvão activado (32 mg), encheu-se o balão com hidrogénio e agitou-se rapidamente durante 90 min. Por filtração através de celite, seguida de concentração, obtiveram-se 179 mg, 95% da quantidade teórica. Esta substância foi utilizada sem purificação adicional na repetição do exemplo seguinte. TLC $R_f=0,6$, cloreto de metileno/acetato de etilo (1:1).



Exemplo 12: ácido 2-[2-[4-[[5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-
-1,5-dioxopentil]amino]fenil]-1-hidroxietil-benzóico
(Composto 5a)

O Composto 5b (16,2 mg, $6,3 \times 10^{-5}$ moles), obtido no Exemplo 11, foi dissolvido em CH_2Cl_2 (70 μl) e Et_3N ($1,26 \times 10^{-4}$ moles), sob agitação.

Juntou-se cloreto de N-hidroxi-succinimidoil-glutaróilo (19,1 mg, $8,19 \times 10^{-5}$ moles) e agitou-se a mistura reaccional em atmosfera de azoto. A mistura reaccional foi, então, colocada directamente numa placa de TLC preparativa e eluiu-se com CH_2Cl_2 /acetato de etilo (1:1), obtendo-se 14,3 mg (50% de rendimento) do ligando hapténico pretendido, Composto 5a.

^1H RMN: δ 9,2 (s, 1H); 7,2-6,8 (m, 6H); 6,6 (d, 2H); 5,2 (t, 1H); 2,6 (m, 2H); 2,1 (s, 4H); 2,0 (t, 2H); 1,8 (t, 2H); 1,4 (m, 2H).

Numa síntese de repetição, dissolveu-se o carboxilato VIII (100 mg, $3,9 \times 10^{-4}$ mol) em 800 μl de cloreto de metileno e trietilamina (109 μl , $7,8 \times 10^{-4}$ mol). Esta dissolução foi seguida da adição de cloreto de 5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)-oxi]-5-oxo-pentanoilo (118 mg, $5,1 \times 10^{-4}$ mol) e agitação durante 20 minutos. A purificação realizou-se carregando a mistura reagente, em bruto, numa coluna de cromatografia flash e eluindo com cloreto de metileno/acetato de etilo, 1:1, obtendo-se 159 mg, 90% da quantidade teórica.

^1H RMN (CDCl_3) δ 9,24 (s, 1H), 7,36-6,8 (m, 6H), 6,42 (d, $J=8,6$ Hz, 2H) 5,20 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 2,66-2,36 (m, 2H), 2,15 (s, 4H), 2,1-1,96 (m, 2H), 1,96-1,7 (m, 2H), 1,5-1,16 (m, 2H).

Anal. Calc. $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 61,54; H, 5,13; N, 5,98.

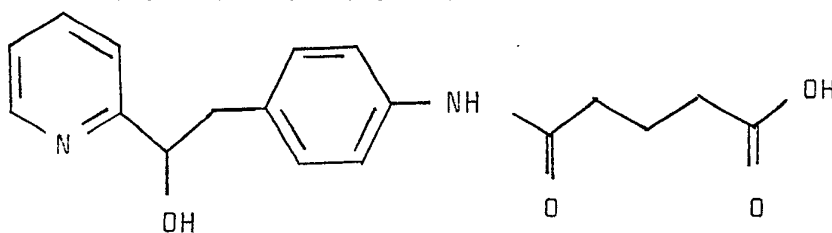
Obtido: C, 61,62; H, 5,10; N, 5,89.

Exemplo 13: Composto IX

Dissolveram-se o Composto II do Exemplo 3 (262 mg, $1,22 \times 10^{-3}$ moles) e anidrido glutárico (140 mg) em CH_2Cl_2 (10 ml) e agitou-se durante 16-18 horas. Juntou-se à solução mais anidrido glutárico (40 mg)), agitou-se a mistura reaccional durante 3 h e verteu-se sobre uma solução aquosa de Et_3N ($1,47 \times 10^{-3}$ moles).

Diluiu-se, então, a solução com acetato de etilo, removeu-se a camada aquosa e acidificou-se com ácido trifluoroacético (TFA). Extractou-se a camada aquosa com acetato de etilo, purificou-se por HPLC usando um gradiente padrão de 10:90 até 90:10 de CH₃CN/H₂O e obtiveram-se 240 mg (60% de rendimento) do Composto IX pretendido.

¹H RMN: δ8,3 (m, 3H); 7,6 (t, 2H); 6,9 (d, 2H); 6,7 (d, 2H); 5,1 (t, 1H); 2,8 (m, 2H); 2,0 (m, 4H); 1,5 (m, 2H).

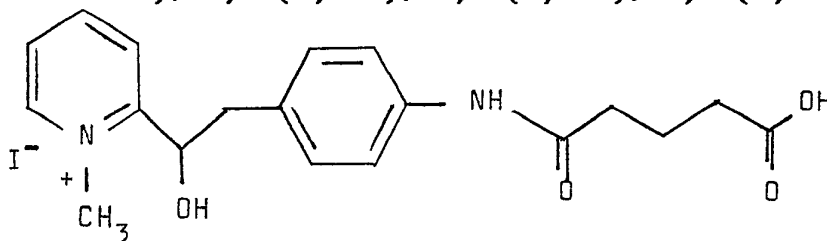


Composto IX

Exemplo 14: Composto 1b

O Composto IX (58 mg, $1,77 \times 10^{-4}$ moles) do Exemplo 13 foi misturado com iodeto de metilo ($8,84 \times 10^{-4}$ moles), dissolvido, num tubo selado, em acetona (cerca de 5 ml) e aquecido durante cerca de 16-18 h a 80°C. O precipitado foi filtrado e lavado com CHCl₃, obtendo-se 56 mg (67% de rendimento) do Composto 1b.

¹H RMN: δ8,5-7,5 (m, 4H); 7,2-6,8 (m, 4H); 5,2 (t, 1H); 3,2 (m, 2H); 2,2 (t, 2H); 1,8 (t, 2H); 1,2 (m, 2H).



Composto 1b

Exemplo 15: Composto X

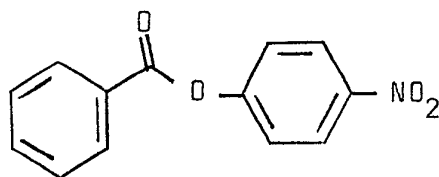
Dissolveu-se p-nitrofenol (1 g, $7,19 \times 10^{-3}$ moles) em CH₂Cl₂ (3 ml) e juntou-se Et₃N ($7,19 \times 10^{-3}$ moles) obtendo-se uma solução amarela.

Juntou-se à solução, gota a gota, cloreto de benzilo ($8,63 \times 10^{-3}$ moles) do que resultou uma certa ebulição. A cor amarela dissipou-se após cerca de 5 min e formou-se um precipitado.

Juntou-se CH_2Cl_2 (2 ml) à solução que continha o precipitado e juntou-se acetato de etilo (3 ml) que dissolveu o precipitado. Agitou-se a solução durante 1 hora.

Misturou-se a solução com água, agitou-se durante cerca de 45 min, lavou-se uma vez com HCl 1 M, depois duas vezes com NaHCO_3 a 10%, duas vezes com HCl 1 M e duas vezes com NaCl saturado. A camada orgânica foi seca com sulfato de sódio, roto-evaporador, guardada em vácuo e separada numa coluna em CH_2Cl_2 /hexano (2:1). Recolheu-se a mancha de TLC com R_f mais baixo, obtendo-se 1,2613 g (72% de rendimento) do Composto X (p-nitro-fenilbenzoato).

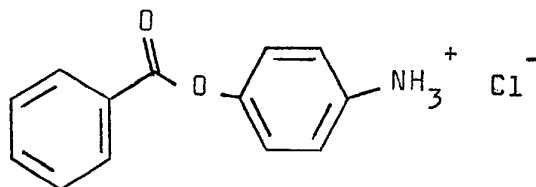
$^1\text{H RMN}$: δ 8,4-8,0 (m, 4H); 7,7-7,3 (m, 5H).



Composto X

Exemplo 16: Composto XI

O Composto X (530 mg, $2,18 \times 10^{-3}$ moles) do Exemplo 15, HCl 12 M (200 μl), Pd/C (275 mg) e hidrogénio gasoso foram misturados em metanol (cerca de 15 ml) e agitados durante 2,5 h sob atmosfera de azoto, até que desaparecessem todas as partículas, o que foi determinado por TLC em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1). Filtrou-se a solução e secou-se, obtendo-se 518 mg (95% de rendimento) do Composto XI.



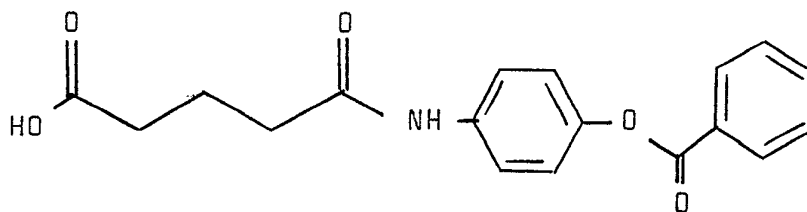
Composto XI

Exemplo 17: Composto 3

Misturou-se o Composto XI (518 mg, $2,08 \times 10^{-3}$ moles) do Exemplo 16 com CH_2Cl_2 (10 ml) e anidrido glutárico (260 mg, $2,28$

$\times 10^{-3}$ moles). Dissolveu-se Et_3N ($4,58 \times 10^{-3}$ moles) na solução e agitou-se a mistura reaccional durante 16-18 horas.

Por TLC detectaram-se partículas por reagir, em CH_2Cl_2 /acetato de etilo (9:1). Juntou-se mais anidrido glutárico (0,25 mg) à solução e agitou-se a mistura reaccional por mais 3 h até que desaparecesse todo o material por reagir. Diluiu-se a solução com acetato de etilo, lavou-se por 2 vezes com HCl 1 M. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio e evaporou-se, obtendo-se 655 mg do produto em bruto. O produto em bruto foi purificado por FPLC em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1:4), obtendo-se 397 mg do Composto 3.
 ^1H RMN: δ 9,9 (s, 1H); 8,1 (d, 2H); 7,7-7,4 (m, 5H); 7,1 (d, 2H); 2,3 (t, 4H); 1,8 (m, 2H).



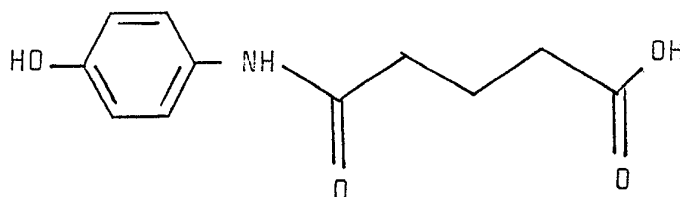
Composto 3

Exemplo 18: Composto 4

Dissolveram-se anidrido glutárico (1,34 g, $1,17 \times 10^{-2}$ moles) e p-aminofenol (1,6 g, $1,47 \times 10^{-2}$ moles) em CH_2Cl_2 (5 ml) e agitou-se a 35°C durante 1 hora. Diluiu-se a mistura em acetato de etilo e lavou-se por 2 vezes com HCl 1 M. Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio e roto-evaporou-se. A HPLC mostrou que o produto se tinha dissolvido na camada aquosa. Por liofilização obtiveram-se 214 mg do produto em bruto.

O produto em bruto foi dissolvido em H_2O (16 ml), metanol (5 ml) e CH_3CN (5 ml), e foi purificado por FPLC, obtendo-se 89 mg do Composto 4.

^1H RMN: δ 9,6 (s, 1H); 7,3 (d, 2H); 6,6 (d, 2H); 2,2 (m, 4H); 1,7 (m, 2H).



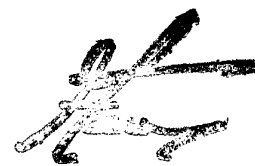
Composto 4

Exemplo 19: 2-[2-(4-aminofenil)-1-hidroxietil]-1-metilbenzeno
(Composto XII)

Juntou-se $n\text{-BuLi}$ (2,8 ml, 2,6 M em hexanos, 4,4 mmol) a 30 ml de THF e arrefeceu-se a -78°C (CO_2 /acetona). A esta solução juntou-se 2-bromotolueno (0,573 ml, 4,8 mmol) e agitou-se durante 30 minutos. Juntou-se o aldeído Composto VI (1,9 g, 3,2 mmol), dissolvido em 15 ml de THF e arrefecido até -78°C , e agitou-se a mistura resultante durante 2 h. Verteu-se a mistura reaccional sobre solução saturada de cloreto de amónio e extractou-se com 2 x 25 ml de cloreto de metileno. As camadas orgânicas combinadas foram secas com sulfato de sódio e purificadas por cromatografia flash em hexanos/cloreto de metileno/acetato de etilo, 6:1:1,5, obtendo-se 900 mg do Composto XII, 69% da quantidade teórica. ^1H RMN (CDCl_3) δ 7,9-7,8 (m, 1H), 7,68-7,40 (m, 2H), 7,40-7,15 (m, 12H), 7,05 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 6,70 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,3 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 4,62 (s, 4H) 3,0-2,7 (m, 2H), 2,3 (s, 3H).
Anal. Calc. para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}$: C, 85,50; H, 7,13; N, 3,44.
Obtido C, 85,58; H, 7,08; N, 3,41.

Exemplo 20: 2-[2-[4-[bis(fenilmetil)amino]fenil]-1-hidroxietil]-1-metilbenzeno (Composto XIII)

Juntou-se 10% de paládio sobre carvão activado (100 mg) a uma solução do Composto XII (900 mg, 2,2 mmol) em 50 ml de acetato de etilo. O recipiente de reacção foi pressurizado até 345 kPa (50 psi) com hidrogénio num aparelho de hidrogenação PARR. A reacção completou-se após 4 h, foi depois filtrada através de celite e concentrada in vacuo, obtendo-se 476 mg do Composto XIII, 95% da quantidade teórica. Esta substância foi usada sem purificação adicional no exemplo seguinte. TLC $R_f=0,05$, cloreto de metileno/hexanos, 4:1.



Exemplo 21: 2-[2-[4-carboxi-1-oxobutil)amino]fenil]-1-hidroxi-etil]-1-metilbenzeno (Composto 6)

Juntou-se cloreto de 5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxil]-5-oxo-pentanoilo (572 mg, 2,3 mmol) a uma solução do Composto V (476 mg, 2,1 mmol) em 10 ml de cloreto de metileno contendo trietilamina (351 µl, 2,5 mmol). Agitou-se a solução durante 30 min após o que se diluiu com acetato de etilo (25 ml), lavou-se com HCl 1 M (2 x 15 ml) e secou-se com sulfato de sódio. O material em bruto foi purificado por cromatografia flash, cloreto de metileno/acetato de etilo, 1:1, obtendo-se 780 mg do Composto 6, 85% da quantidade teórica. ^1H RMN (CDCl_3) δ 9,24 (s, 1H), 7,4-6,85 (m, 6H), 6,45 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 5,20 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 2,65-2,4 (m, 2H) 2,3 (s, 3H), 2,15 (s, 4H), 2,1-1,96 (m, 2H), 1,96-1,72 (m, 2H), 1,5-1,20 (m, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 65,75; H, 5,94; N, 6,39.
Obtido: C, 65,79; H, 5,91; N, 6,41.

Exemplo 22: 5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-N-[4-(hidroximetil)fenil]-5-oxo-pentanamida (Composto XIV)

Numa solução de trietilamina (1,13 ml, 8,2 mmol) em 10 ml de cloreto de metileno, dissolveu-se álcool p-aminobenzílico (1,9 g; 8,1 mmol). A esta solução juntou-se cloreto de 5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-5-pentanoilo (2,21 g, 8,9 mmol) e agitou-se durante 1 h. A mistura reaccional foi diluída com cloreto de metileno (25 ml) e extractada com 2 x 26 ml de uma solução de HCl 2 M. A camada orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio e purificada por cromatografia flash em cloreto de metileno/metanol, 9:1, obtendo-se 2,43 g do Composto XIV, 90% da quantidade teórica.

^1H RMN (CDCl_3) δ 8,0 (br x, 2H), 7,52 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 7,30 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 4,62 (s, 2H), 3,45 (s, 2H), 2,9 (s, 4H), 2,75 (t, $J=10$ Hz, 2H), 2,5 (t, $J=10$ Hz, 2H), 2,38-2,10 (m, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 57,49; H, 5,39; N, 8,38.
Obtido: C, 57,42; H, 5,44; N, 8,29.

Exemplo 23: N-[4-(bromometil)fenil]-5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxil]-5-oxo-pentanamida (Composto XV)

Juntou-se dibromotrifetilfosforano (3,04 g, 7,2 mmol) a uma

solução do Composto XIV (2,9 g, 6 mmol) em 20 ml de dimetilformamida. Aqueceu-se, depois, a mistura reaccional até 50°C e agitou-se durante 4 h. Diluiu-se, então, a mistura reaccional com um litro de acetato de etilo, extractou-se com salmoura (4 x 200 ml) e secou-se com sulfato de sódio. Por purificação através de cromatografia flash, acetato de etilo/cloreto de metileno, 1:1, obtiveram-se 1,20 g do Composto XV, 50% da quantidade teórica.

^1H RMN (CDCl_3) δ 8,0 (br s, 1H), 7,50 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 4,5 (s, 2H), 2,9 (s, 4H), 2,75 (t, $J=10$ Hz, 2H), 2,5 (t, $J=20$ Hz, 2H), 2,38-2,10 (m, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 58,72; H, 5,20; N, 8,56.

Obtida: C, 58,66; H, 5,24; N, 8,50

Exemplo 24: brometo de 4-[[5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxil]-1,5-dioxopentil]amino]-N,N-dimetil-N-brometo-benzeno-metanaminio (Composto 7)

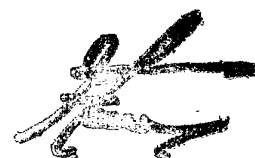
O brometo, Composto XV, (1,9 g, 2,5 mmol) foi dissolvido em 60 ml de cloreto de metileno e juntou-se-lhe dimetilanilina (1,6 ml, 12,5 mmol). Agitou-se a solução durante 30 min após o que se formou um precipitado; continuou-se a agitar durante 4 h. A suspensão formada foi transferida para um funil de separação e extractada com 3 x 30 ml de água destilada. As lavagens aquosas combinadas foram liofilizadas, obtendo-se 1,17 g do Composto 7, 90% da quantidade teórica ^1H RMN (D_2O) δ 7,60 (s, 5H), 7,38 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 7,9 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 4,95 (s, 2H), 3,62 (s, 6H), 2,9 (s, 4H), 2,75 (t, $J=10$ Hz, 2H), 2,5 (t, $J=10$ Hz, 2H), 2,38-2,10 (m, 2H).

Anal. Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_5\text{Br}$: C, 55,60; H, 5,41; N, 8,11.

Obtido: C, 55,67; H, 5,39; N, 8,07.

Exemplo 25: Preparação de cloretos de succinimidil-adipoilo e de glutaroilo (Agentes de acoplamento)

Aqueceu-se a 40°C durante 2 h uma solução do éster monometílico do ácido adipico (5,4 g, 33,3 mmol) em cloreto de tionilo (15 ml). Concentrou-se, então, a mistura e destilou-se in vacuo (ponto de ebulição 119°C a 20 mmHg), obtendo-se 3,58 g (60% de rendimento, em peso) do éster metílico do cloreto ácido. Este



foi dissolvido em 20 ml de diclorometano e juntou-se N-hidroxisuccinimida (2,75 g, 24,0 mmol) seguida de trietilamina (4,2 ml, 30 mmol). Agitou-se a mistura durante 10 min, depois diluiu-se com acetato de etilo e lavou-se com HCl 0,5 M e salmoura. Secou-se a solução sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e concentrou-se, obtendo-se 4,5 g (87,5% de rendimento, em peso) de adipato de metilsuccinimidilo, como um óleo incolor.

RMN de Protão, em CDCl_3 a 100 MHz (em relação a TMS como padrão interno): delta 3,73 (singuleto, 3H), delta 2,90 (singuleto, 4H), 2,70 (multiplete, 2H), 2,37 (multiplete, 2H) e 1,79 (multiplete, 4H).

Aqueceu-se ao refluxo, durante 12 h, uma solução do adipato de metil-succinimidilo (4,5 g, 17,5 mmol), clorotrimetilsilano (11,1 ml, 87,5 mmol) e iodeto de sódio (13,1 g, 87,5 mmol) em 10 ml de acetonitrilo. Arrefeceu-se, depois, a mistura até temperatura ambiente e diluiu-se com acetato de etilo. Lavou-se repetidamente a mistura reaccional com bissulfito de sódio aquoso a 5%, até a solução orgânica ficar incolor. Lavou-se, então, com salmoura, secou-se sobre sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e concentrou-se, obtendo-se 3,2 g (71% de rendimento, em peso) do éster mono-succinimidílico do ácido adípico, como um sólido branco.

RMN de Protão, em CDCl_3 , a 100 MHz (em relação a TMS como padrão interno): delta 3,90 (singuleto, 4H), 2,70 (multiplete, 2H), 2,4 (multiplete, 2H), 1,80 (multiplete, 4H).

Aqueceu-se a 40°C, durante 3 h, uma mistura do éster succinimidílico do ácido adípico (1,00 g, 3,80 mmol) e de cloreto de tionilo (5 ml), depois, arrefeceu-se até temperatura ambiente e concentrou-se in vacuo. Agitou-se o residuo várias vezes com hexano seco, separou-se o óleo e secou-se in vacuo, obtendo-se 0,97 g (90% de rendimento, em peso) de cloreto de succinimidil-adipoilo. Este foi dissolvido em tetra-hidrofurano seco até se obter uma solução 5 molar que foi usada como tal na preparação de compostos adequados ao acoplamento a veículos proteicos.

RMN de Protão, em CDCl_3 , a 100 MHz (em relação a TMS como padrão interno): 3,00 (multiplete, 2H), 2,90 (singuleto, 4H), 2,70 (multiplete, 2H), 1,80 (multiplete, 4H).

Preparou-se, de modo semelhante, o cloreto de succinimidil-glutaróilo [5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-5-oxo-pentanoil-cloreto] que foi utilizado como adiante se indica.

VI - Preparação de Conjugados e de Inóculos

Os conjugados de moléculas de ligando hapténico com veículos proteicos como a hemocianina de lapa (género *Fissurella*) (KLH) ou com a albumina de soro bovino (BSA), podem ser preparados, por exemplo, por activação do veículo com um agente de acoplamento como o MBB (éster *m*-malimidobenzoil-N-hidroxi-succinimida) e acoplamento ao grupo tiol do ligando hapténico. Ver, por exemplo, Liu et al., *Biochem.*, **80**, 690 (1979). Como é bem sabido na arte, é frequentemente benéfico ligar um composto ao seu veículo por meio de um grupo de ligação, intermediário.

Os veículos úteis são já bem conhecidos na arte e, geralmente são, eles próprios, proteínas. São exemplos destes veículos a hemocianina de lapa (género *Fissurella*) (KLH), edestina, tiroglobulina, albuminas como a albumina do soro bovino ou a albumina do soro humano (BSA ou HSA, respectivamente), os glóbulos vermelhos como os eritrócitos do carneiro (SRBC), toxoide do tétano, toxoide da cólera bem como os ácidos poliamino como poli(D-lisina:ácido D-glutâmico) e semelhantes.

A escolha do veículo depende mais do fim pretendido para o antigénio do que da porção determinante do antigénio e baseia-se em critérios não particularmente envolvidos no presente invento. Por exemplo, se o conjugado é para ser usado em animais de laboratório, deverá escolher-se um veículo que não gere uma reacção inconveniente no animal.

O conjugado veículo-hapteno é dissolvido ou disperso numa composição aquosa de um diluente fisiologicamente tolerável como a solução salina normal PBS, ou água estéril para formar um

inóculo. Pode também ser incluído no inóculo um adjuvante como o adjuvante completo ou incompleto de Freund, ou o alúmen. O inóculo é introduzido por injeção no animal usado para criar anticorpos em quantidade suficiente para induzir anticorpos, como é já bem sabido.

Prepararam-se exemplos de conjugados imunogénicos a partir de um ligando hapténico, adaptando as suas sínteses de modo a incorporarem uma cadeia linear de átomos de carbono no grupo benzílico do ligando hapténico (correspondente à porção fenólica do éster ligando reagente) como elemento espaçador, como acima se referiu. Podem ser preparados outros exemplos de conjugados imunogénicos com um elemento espaçador/ligante a partir de um ligando hapténico, adaptando as sínteses de modo a incorporarem a cadeia linear de átomos de carbono na porção do ligando hapténico correspondente à parte ácida do ligando reagente.

Concluiu-se que a cadeia flexível de carbono de um apêndice de adipato ou glutarato reduziria qualquer propensão para imunorreactividade devida à exigência conformacional imposta pela ligação covalente ao veículo proteico. O reagente bi-funcional, preparado para este fim, entrega, também, o grupo carboxilo pré-activado para ligação, através da formação da ligação amida, com os resíduos de lisina do veículo. O método de acoplamento particular deste estudo será aqui ainda desenvolvido. Os ligandos hapténicos foram acoplados à hemocianina de lapa (género *Fissurella*) (KLH) através de um grupo amino da porção fenólica da estrutura.

De acordo com o presente invento, o agente intermediário de ligação é de preferência o cloreto de succinimidil-adipoílo ou glutaroílo, preparados como acima se referiu. Prepara-se um conjugado antigénico (imunogénico) do modo seguinte.

Num processo dado a título de exemplo, 2,5 mg de um produto da reacção como acima, de um hapteno e de cloreto de succinimidil-adipoílo ou de cloreto de succinimidil-glutaróilo em 250 µl de dimetilformamida, são adicionados lentamente, sob agitação, a

2 mg de KLH em 750 µl de tampão de fosfato de sódio, 0,01 M, a um pH de 7,2. Utiliza-se uma temperatura de 4°C e agita-se a mistura resultante durante cerca de 1 h, para preparar o conjugado KLH ligado a hapteno. O conjugado produto da reacção, assim formado, é depois purificado pelos meios usuais.

VII - Preparação de Receptores Monoclonais

Os referidos conjugados de KLH (cerca de 100 µg) foram usados para imunizar grupos de 4 ratinhos com 8 semanas de idade, (estirpe 129G1X⁺) por injeccção intraperitoneal (IP) em adjuvante completo de Freund. Uma outra injeccção IP de 50 µg de um conjugado, em alúmen, foi aplicada duas semanas depois. Um mês depois, o ratinho com o título de anticorpos mais elevado, contra o hapteno, foi injectado por via intravenosa com 50 µg do conjugado de KLH. Três dias depois o baço foi retirado para preparação de hibridomas e de anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais foram obtidos como foi descrito por Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 4524 (1980) and Niman et al., in Monoclonal Antibodies and T-Cell Products, ed., Katz, D.H., 23-51 (CRC Press, Boca Raton, FL 1982). Resumidamente, fundiram-se células do baço (1×10^5) com $2,0 \times 10^7$ células de mieloma Sp2/O. Colocaram-se as células em 45 placas de 96 alvéolos; cada alvéolo continha 150 µl de meio HAT-DMEM contendo ainda 1% de nutridoma e 2% de BSA. Os linfócitos utilizados para formar os hibridomas do presente invento podem ser obtidos de qualquer mamífero, por exemplo, um primata, roedor (e.g. ratinho ou ratazana), coelho, cobaia, vaca, cão, carneiro, porco ou semelhante. Conforme for apropriado, o hospedeiro pode ser sensibilizado por injeccção do imunogénio, neste caso um ligando hapténico, seguido de uma injeccção de reforço e isolamento do baço.

Prefere-se que a linha de células de mieloma seja da mesma espécie que os linfócitos. Utilizam-se portanto normalmente híbridos fundidos, como os híbridos ratinho-ratinho [Shulman et al., Nature, **276**, 269 (1978)] ou os híbridos ratazana-ratazana [Galfre et al., Nature, **277** 131 (1979)]. Contudo, também, têm



sido usados com sucesso alguns híbridos ratazana-ratinho [Goding, "Production of Monoclonal Antibodies by Cell Fusion", in Antibody as a Tool, Marchalonis et al. eds., John Wiley & Sons Ltd., p. 273 (1982)] na formação de hibridomas. São linhas de mieloma adequadas ao presente invento, p. ex., MPC-11 (ATCC CRL 167), P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580), Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 1581), P3 X 63 AgBU.1 (ATCC CRL 1597), Y3-Ag1.2.3 (depositadas na Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Paris, França, n.º. I-078) e P3X663Ag8 (ATCC TIB 9). Para uso do presente invento, prefere-se a linha Sp2/O ou Sp2/O-Ag14 de mieloma do murino, não segregante.

As células de hibridoma que por fim se obtiveram podem ser cultivadas seguindo as técnicas usuais de cultura de tecidos in vitro para tais células, como já é bem conhecido. Com maior preferência, as células de hibridoma são cultivadas em animais, usando técnicas análogas bem conhecidas, sendo os receptores monoclonais obtidos a partir do fluido ascítico assim criado. Os animais usados para produzirem fluido ascítico foram os ratinhos Balb/c x 129G1X⁺ criados na colônia de ratinhos da Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, California; quando contudo forem usados outros animais que não ratinhos para a preparação de hibridomas, podem usar-se ratinhos ou esses animais para a produção de fluido ascítico.

Num caso particular produziu-se, a título de exemplo, um receptor monoclonal pela tecnologia padrão dos hibridomas de Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975). Especificamente, imunizaram-se ratinhos 129G1X⁺ por injeção intraperitoneal com um inóculo de 100 microgramas de conjugado (p. ex., o Composto 1a, 2 ou 5a, ligados a KLH) em 300 microlitros de uma mistura (1:1) de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, e adjuvante completo de Freund. Duas semanas mais tarde, os ratinhos foram de novo injectados de modo semelhante com 50 microgramas do referido conjugado em 300 microlitros de uma mistura (1:1) de PBS (pH 7,4) e alúmen a 10 mg/ml. Após mais oito semanas, os ratinhos foram imunizados por via intravenosa com 50 microgramas do conjugado em 200 microlitros de PBS (pH 7,4). Retiraram-se os baços dos



-64-

ratinhos 4 dias mais tarde e fundiram-se as células do baço com células de mieloma.

As células do baço foram misturadas e fez-se uma só suspensão de células. As células nucleadas de baço ($1,4 \times 10^8$) foram então fundidas com 3×10^7 células, não-segregantes, de mieloma Sp2/0 na presença de um promotor de fusão de células (polietilenoglicol 2000). O hibridoma que produz um anticorpo monoclonal particular foi escolhido por sementeira das células de hibridoma em placas de 96 alvéolos e por crescimento em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo glucose a 4500 mg/l (10%), 10% de soro de vitela fetal (FCS), hipoxantina, aminopte- rina e timidina (isto é, meio HAT) que não permite o desenvolvi- mento de células de mieloma não fundidas.

Após 2 a 3 semanas, amostrou-se o sobrenadante de cada alvéolo, acima dos clones da célula e analisou-se pelo ensaio ELISA (Ensaio de Imunossorção com enzima ligado, ensaio aqui descrito adiante) quanto à presença de anticorpos contra o Composto 1a, 2 ou 5 como antigénios. Cada ligando hapténico foi conjugado a BSA nos ensaios ELISA. Os alvéolos positivos foram clonados por duas vezes por limitação de diluição. Aqueles clones que continuaram a produzir anticorpos específicos do Composto 1a ou 2, após duas clonações, foram expandidos para se produzirem volumes maiores de fluido sobrenadante.

Sete dos 23 receptores monoclonais (cerca de 30%) que imuno-reagiram com o Composto 1a, hidrolisaram cataliticamente os ésteres do ligando reagente Composto 3. Cada uma dessas catálises podia ser inibida por um ligando hapténico apropriado, como p. ex. o Composto 1b. Deste modo, uma percentagem relativamente elevada de receptores monoclonais induzidos era capaz de catali- sar uma reacção esterolítica. Nenhum dos 21 anticorpos induzidos pelo hapteno Composto 2 mostrou actividade catalitica em relação ao ligando reagente Composto 3. De modo análogo, as colónias que produziram inicialmente anticorpos que se ligavam aos Compostos 5a, 6 ou 7, foram sub-clonadas por duas vezes, após o que permaneceram activas 18 para o Composto 5a, 22 para o Composto 6

e 26 para o Composto 7. Estes anticorpos eram da classe da IgG.

As moléculas monoclonais catalíticas foram precipitadas com sal dos fluidos ascíticos, desenvolvidas em ratinhos Balb/c x 129G1X⁺ pré-sensibilizados com pristano, purificadas por cromatografia de permuta aniônica (DEAE) seguida de cromatografia de afinidade (proteína G) e dialisadas em fosfato 50 mM (NaCl 100 mM, pH 7,5). Os anticorpos foram considerados como homogêneos (95%) por electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio.

Um dos hibridomas, denominado 30C6, foi ainda mais estudado e depositado na American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD. Este hibridoma foi depositado no dia 24 de Janeiro de 1990 e recebeu o número de acesso HB 10341. Dois outros hibridomas, 27A6 e 57G11, foram analogamente depositados na ATCC em 11 de Dezembro de 1990 e receberam os números de acesso HB 10621 e HB 10622, respectivamente.

Estes depósitos foram realizados de acordo com as exigências do Tratado de Budapeste de que os depósitos durariam 30 anos a partir da data de depósito ou 5 anos após o último pedido de depósito naquele depositário ou pelo período de vida vigente da patente americana completado a partir deste pedido, sendo adoptado, destes períodos, o maior. Os hibridomas deverão ser renovados caso se tornem não viáveis no depositário.

Pode também ser preparado um receptor monoclonal do presente invento, introduzindo, p. ex., por injeção, o hibridoma na cavidade peritoneal de um mamífero como um ratinho. De preferência, como já se fez notar, usam-se mamíferos singénicos ou semi-singénicos, como na patente U.S. 4 361 549, cujo teor é aqui citado apenas para referência. A introdução do hibridoma provoca a formação de hibridomas produtores de anticorpos após um período adequado de desenvolvimento, p. ex. 1-2 semanas, produzindo-se uma elevada concentração de receptores que podem ser recuperadas da corrente sanguínea e do exsudado peritoneal (ascite) do ratinho hospedeiro. Ainda que o ratinho hospedeiro também tenha

receptores normais no seu sangue e ascite, a concentração dos receptores normais é normalmente apenas cerca de 5% da concentração de receptores monoclonais.

Os receptores monoclonais presentes no sobrenadante do hibridoma podem ser usados sem purificação adicional ou pode recolher-se o receptor da ascite ou do soro do ratinho usando técnicas padrão como a cromatografia por afinidade, usando células infectadas com AD169 ligadas a um imunossorvente como a Sepharose 6B ou 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), seguida de eluição a partir do imunoabsorvente usando um tampão ácido como o hidrocloreto de glicina a um valor de pH de cerca de 2,5.

Nestes estudos, as fracções IgG foram normalmente obtidas a partir da ascite do ratinho, por precipitação com sulfato de amónio a 45%, saturado, seguida de cromatografia em DEAE-Sephacel com eluição com cloreto de sódio, como já se referiu. A fracção que foi eluída com sal 100 mM foi dialisada e concentrada.

VIII - Ensaio de Imunossorção com Enzima Ligado (ELISA)

A ligação de ligandos e o efeito das modificações químicas foram avaliadas por ELISA com o anticorpo a uma concentração fixa na gama do seu título e com concentração variável do reagente ou ligando. Considera-se haver inibição se o título for reduzido de 50%, a uma razão de reagente para hapteno inferior a 1000:1.

Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação, em polivinilo, de fundo plano (Dynatech, Alexandria, VA). A título de exemplo, revestiram-se os alvéolos com uma solução contendo o Composto 1a ligado a BSA como ligando antigénico, em solução salina tamponada com fosfato (PBS), usando 50 microlitros de solução por alvéolo. Os ligandos foram revestidos a 1 micrograma por mililitro. Incubaram-se, então, as placas durante a noite a 37°C em estufa de secagem. As placas secas foram guardadas a 4°C até serem usadas. Antes do ensaio ELISA, as placas secas foram re-hidratadas por 2 lavagens de 2 minutos cada, com PBS 10 milimolar (mM), pH 7,4, contendo 0,1% de polioxalquileno (20),

monolaurato de sorbitano (Tween 20) e 0,02% de Thimerosal (etilmercuritio-salicilato de sódio), (Sigma, St. Louis, MO).

A fim de reduzir as ligações não específicas, os sobrenadantes dos hibridomas foram diluídos a 1:2 em tampão de lavagem contendo 0,1% de BSA como diluente. Juntaram-se, depois, 50 microlitros dos sobrenadantes de hibridomas diluídos, a cada alvéolo e incubaram-se durante 1 h a 4°C num giro-agitador para estabelecer contacto entre o sobrenadante contendo anticorpos monoclonais e o Composto 1 ligado. Após duas lavagem de 2 minutos cada, juntaram-se a cada alvéolo 50 microlitros de IgG + IgM de cabra, anti-ratinho, marcada com peroxidase, (Tago, Burlingame, CA), diluído a 1:1000, e incubou-se a mistura reaccional a 4°C durante 1 h para ligar o anticorpo marcado com o anticorpo monoclonal ligado.

O substrato usado para avaliar a actividade da peroxidase ligada, foi preparado imediatamente antes de usar e consistia em 400 microgramas/ml de o-fenilenodiamina (Sigma, St. Louis, MO) em tampão de fosfato-citrato 80 mM, pH 6,0, contendo 0,12% de H₂O₂. Após duas lavagens finais, juntaram-se 50 microlitros da solução de substrato, a cada alvéolo e deixou-se a cor desenvolver durante 15 min no escuro. Parou-se o desenvolvimento da cor pela adição de 25 microlitros de H₂SO₄ 4 molar (M) a cada alvéolo e mediu-se a densidade óptica a 492 nanómetros (nm) com um leitor de placas Multiskan ELISA.

IX - Medidas Cinéticas

Dialisaram-se anticorpos monoclonais purificados, contra tampão EPPS (1 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM) ou contra tampão CHES (1 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM). A sua concentração em proteína foi determinada pelo método BCA (pierce). Realizaram-se avaliações por HPLC (coluna de fase inversa, C₁₈, VYDAC 201TP54) com CH₃CN/H₂O (0,1% TFA) num programa isocrático de 10/90. Usou-se um padrão interno de o-acetamidofenol para calcular a quantidade de produto formada [4-(carboxibutiramido)fenol].

As soluções base de anticorpos foram diluídas em 1 ml de

tampão adequado [EPPS, 50 mM (pH 7,2-8,6); CHES (pH 8,6-10,0), NaCl 100 mM] para se obter uma concentração final, em proteína, de 20 μ M. As reacções continham 5% de co-solvente dioxano e manteve-se a temperatura a $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. As velocidades lineares iniciais foram medidas a < 5% de hidrólise do substrato total. Verificou-se que os anticorpos eram estáveis durante pelo menos 48 h nas condições da reacção, o que foi determinado por ensaios de ligação ELISA. As velocidades observadas foram corrigidas em relação à velocidade de hidrólise não catalisada, na ausência de anticorpos. Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_n foram determinados pelo ajustamento não linear, de mínimos quadrados, da velocidade inicial vs. concentração do substrato, dando uma curva hiperbólica descrita pela equação de Michaelis-Manton.

A variação da velocidade inicial em função do pH foi medida em CHES (50 mM) (NaCl 100 mM) a um valor de pH acima de 8,6 e de outro modo em EPPS (50 mM) (NaCl 100 mM). Não houve diferenças nas velocidades observadas com anticorpo 27A6, quando verificadas a pH 8,6 em EPPS e CHES (50 mM) (NaCl 100 mM). A variação de concentração iónica do tampão (12,5 - 50 mM) mostrou não haver dependência de K_{cat} (anticorpo 27A6) na presença da espécie tampão.

A equação 1 descreve o perfil de velocidade pH obtido para a velocidade de hidrólise (K_{obs}) do Composto 3, extrapolada para a concentração zero do tampão. Bruice et al. Bioorganic Chemistry, Vol. 1; Benjamin: New York (1965).

$$K_{\text{obs}} = K_{\text{OH}} [\text{OH}^-]$$

A linha de quadrados a cheio (Figura 3b) foi criada fazendo variar a concentração do tampão (12,5 mM - 50 mM) a uma concentração fixa do Composto 3 (400 μ M) ao longo da gama de pH de 7,2 a 10,0. Os tampões utilizados e a sua gama de variação de pH testados, foram exactamente os mesmos acima descritos. O valor de K_{OH^-} pode ser calculado a partir da inclinação do gráfico de K_{obs} vs. K_w/a_H .

X - Modificações Químicas dos Anticorpos

(a) Fenilglioxal; uma aliquota de 50 μ l de uma solução de



fenilglioxal (6 mM), (NaHCO_3 125 mM, pH 7,5) foi adicionada a tampão 195 μl (125 mM, pH 7,5, NaHCO_3) contendo anticorpos (20 μM). A mistura foi submetida a vórtex e deixada repousar durante 1 h à temperatura ambiente. Esta mistura reaccional foi, depois, transferida para um microdialisador (Pierce) e dialisada com 125 mM, pH 7,5, NaHCO_3 , com um caudal de aproximadamente 150 ml/h durante 2 h. O microdialisador foi então lavado com porções de 4 x 60 ml de CHES 50 mM, NaCl 100 mM, a pH 8,4, e deixado repousar neste tampão durante a noite (cerca de 15-18 h). Lavou-se de novo o microdialisador com porções de 3 x 50 ml de CHES 50 mM, NaCl 100 mM, a pH 8,4, na manhã seguinte. Retiraram-se as amostras, recalcularam-se as concentrações em proteína (BCA) e fizeram-se ensaios de actividade catalítica (HPLC) e de ligação (ELISA). Usou-se um processo semelhante com hapteno presente (200 μM).

(b) Anidrido maleico; juntou-se uma aliquota de 5 ml de uma solução de anidrido maleico (0,05 M, dioxano) a 299 μl de borato, 20 mM, pH 8,9, NaCl 100 mM contendo 20 μM de anticorpos. Submeteu-se a solução a um vórtex e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 1 h. Transferiu-se então esta mistura reaccional para um microdialisador e dialisou-se, como acima se descreveu, com CHES 50 mM, pH 8,4, NaCl 100 mM. Retiraram-se as amostras, calcularam-se as concentrações em proteína (BCA) e fizeram-se ensaios de actividade catalítica e de ligação.

(c) Pirocarbonato de dietilo; 10 μl de uma solução 0,6 M de dietilpirocarbonato em etanol, foram diluídos em 1 ml de acetato de sódio (NaOAc) (150 mM, pH 6, NaCl 100 mM). Juntaram-se 5 microlitros dessa solução a 299 μl de NaOAc (150 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM) contendo 20 μM de anticorpos. Submeteu-se a mistura a vórtex e deixou-se repousar a 4°C durante a noite (cerca de 15-18 h). Transferiu-se então esta mistura reaccional para um microdialisador e dialisou-se, como acima se descreveu, com CHES (50 mM, pH 8,4, NaCl 100 mM). Retiraram-se amostras, determinaram-se as concentrações em proteína (BCA) e fizeram-se ensaios de actividade catalítica e de ligação.

72 167
SCRF Case 195.1(POR)

-70-



Pretende-se que a exposição antecedente ilustre o presente invento sem o limitar. Podem realizar-se numerosas variações e modificações sem afastamento do verdadeiro espírito e âmbito do invento.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de produção de moléculas de anticorpo ou de moléculas contendo porções do local de combinação do anticorpo, que hidrolisam cataliticamente uma ligação amida ou éster de ácido carboxílico pré-seleccionada, de um ligando reagente, ligando-se o local de combinação do anticorpo das referidas moléculas a:

(a) um ligando reagente contendo a ligação amida ou éster de ácido carboxílico pré-seleccionada que é hidrolisada, e

(b) um ligando hapténico estruturalmente análogo ao referido ligando reagente que contém um átomo de carbono tetraédrico ligado a um grupo hidroxilo, bem como a um átomo de carbono saturado, numa posição, no ligando hapténico, correspondente à posição do grupo carbonilo, bem como ao heteroátomo ligado ao carbonilo de, respectivamente, uma ligação éster ou amida de ácido carboxílico, pré-seleccionada, a ser hidrolisada, incluindo ainda o referido ligando hapténico um grupo apresentando carga iónica, em solução aquosa, a valores de pH fisiológicos, estando o grupo, que apresenta carga iónica, ausente de uma posição correspondente do referido ligando reagente, e localizado num volume esférico, definido por um raio de cerca de 7×10^{-10} m, a partir do referido átomo de carbono tetraédrico, caracterizado por se cultivarem as células adequadas num meio de cultura adequado.

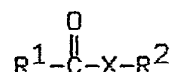
2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido grupo que apresenta carga iónica estar indirectamente ligado ao referido átomo de carbono tetraédrico, com pelo menos um átomo a separar o referido átomo de carbono tetraédrico do átomo que tem carga iónica do referido grupo que apresenta carga iónica.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as moléculas serem anticorpos monoclonais.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido ligando hapténico conter um ião amónio ou um ião carboxilato, a valores fisiológicos do pH, como referido grupo que apresenta carga iónica.

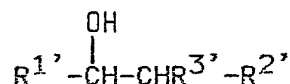
5 - Processo de produção de moléculas de anticorpo monoclonal ou de moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo que hidrolisam cataliticamente uma ligação amida ou éster de ácido carboxílico pré-seleccionada de um ligando reagente, ligando-se o local de combinação com anticorpo das referidas moléculas a:

(a) um ligando reagente contendo a ligação amida ou éster de ácido carboxílico pré-seleccionada que é hidrolisada, sendo o referido ligando reagente representado pela estrutura



na qual R^1 e R^2 representam resíduos químicos do reagente, contendo átomos de carbono e $-\text{X}-$ é $-\text{O}-$ ou $-\text{NR}^3-$, onde R^3 é hidrogénio ou um terceiro resíduo químico contendo carbono;

(b) um ligando hapténico que é estruturalmente análogo ao referido ligando reagente, sendo o referido ligando hapténico representado pela estrutura



na qual R^1' e R^2' representam resíduos contendo átomos de carbono que são estruturalmente análogos a R^1 e a R^2 , respectivamente, e contendo pelo menos um de R^1' e R^2' , um grupo apresentando uma carga iónica em solução aquosa, a valores de pH fisiológicos, proporcionando o referido, pelo menos um grupo, carga iónica a valores de pH fisiológicos, localizado num volume esférico definido por um raio de cerca de 7×10^{-10} m a partir do referido

grupo $\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}-$ da referida estrutura, e R^3' é H quando $-\text{X}-$ é $-\text{O}-$ ou R^3' é estruturalmente análogo a R^3 quando $-\text{X}-$ é $-\text{NR}^3-$, caracterizado por se cultivarem células adequadas, num meio de cultura adequado.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por -X- ser -O-.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido grupo que apresenta uma carga iónica a valores de pH fisiológicos ser um ião amónio ou um ião carboxilato.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por as moléculas serem segregadas pelo hibridoma 30C6, que possui o nº. de acesso, no ATCC, HB 10341.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por as moléculas serem segregadas pelo hibridoma 27A6, que possui o nº. de acesso, no ATCC, HB 10621.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o referido grupo que apresenta carga iónica estar indirectamente ligado a, pelo menos, um átomo que separa o referido átomo de carbono tetraédrico do átomo do referido grupo carregado que apresenta carga iónica, e por o referido grupo que apresenta carga iónica estar localizado dentro de um volume esférico definido por um raio com cerca de 2×10^{-10} a cerca de 5×10^{-10} m a partir do referido átomo de carbono tetraédrico.

11 - Processo para hidrolisar cataliticamente uma ligação éster ou amida pré-seleccionada, numa molécula de ligando reagente, caracterizado por compreender os passos de:

(a) misturar uma quantidade cataliticamente eficaz de moléculas de anticorpo monoclonal ou de moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo de acordo com a reivindicação 1, com as referidas moléculas de ligando reagente, num meio aquoso, de modo a formar uma mistura reaccional, e

(b) manter a referida mistura reaccional durante um período de tempo suficiente para que as referidas moléculas de ligando reagente se liguem às referidas moléculas de anticorpo ou



moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo e para que as referidas moléculas de anticorpo ou moléculas contendo suas porções de local de combinação de anticorpo hidrolisem cataliticamente a referida ligação pré-seleccionada e formem produtos.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por as referidas moléculas de anticorpo ou moléculas contendo suas porções de local de combinação de anticorpo serem segregadas pelo hibridoma 30C6, possuindo o nº. de acesso, no ATCC HB 10341, ou pelo hibridoma 27A6, possuindo o nº. de acesso, no ATCC, HB 10621.

13 - Processo de preparação de células que quando cultivadas num meio produzem moléculas de anticorpo ou moléculas contendo porções do local de combinação do anticorpo, que hidrolisam cataliticamente uma ligação éster ou amida de ácido carboxílico pré-seleccionada de um ligando reagente a partir de genes obtidos de um animal previamente imunizado com um imunogénio que inclui um ligando hapténico que contém um átomo de carbono tetraédrico ligado a um grupo hidroxilo, bem como a um átomo de carbono saturado, numa posição, no ligando hapténico, correspondente à posição do grupo carbonilo, bem como ao heteroátomo ligado ao carbonilo de, respectivamente, uma ligação éster ou amida de ácido carboxílico, pré-seleccionada, a ser hidrolisada, incluindo ainda o referido ligando hapténico um grupo apresentando carga iónica, em solução aquosa, a valores de pH fisiológicos, estando o grupo, que apresenta carga iónica, ausente de uma posição correspondente do referido ligando reagente e localizado num volume esférico, definido por um raio de cerca de 7×10^{-10} m (7 Ångstroms), a partir do referido átomo de carbono tetraédrico, mantendo o referido animal durante um período suficiente para que segregue anticorpos que imunorreagem com o referido ligando hapténico, caracterizado por compreender:

(a) a transferência dos genes que codificam as moléculas de anticorpo ou as moléculas, contendo porções do sitio de combinação do anticorpo, das células produtoras de anticorpo produzidas

e retiradas do referido animal previamente imunizado e mantido, para células hospedeiras de modo a formar células híbridas que contêm genes de, pelo menos, duas origens, sendo estas células híbridas formadas capazes de (i) produzir, quando cultivadas, moléculas de anticorpo ou moléculas contendo porções do local de combinação do anticorpo, dos referidos genes transferidos e (ii) serem cultivadas de modo substancialmente indefinido;

(b) cultura das células híbridas num meio de cultura apropriado, durante um período de tempo suficiente para que estas células híbridas produzam moléculas de anticorpo ou moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo,

(c) recuperação das moléculas de anticorpo, ou das moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo, a partir das células híbridas cultivadas;

(d) rastrear as moléculas de anticorpo ou moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo, obtidas, de modo a identificar a célula híbrida que produz as moléculas de anticorpo ou as moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo que hidrolisam, cataliticamente, a referida ligação éster ou amida de ácido carboxílico predeterminada,^e

(e) fazer crescer clones da referida célula híbrida identificada que produz moléculas de anticorpo ou moléculas contendo porções do local de combinação de anticorpo que hidrolisam, cataliticamente, a referida ligação éster ou amida de ácido carboxílico predeterminada.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por as células formadas no passo (a) serem células de hibridoma.

15 - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por as células de hibridoma serem as do hibridoma 30C6 que tem o número de acesso, no ATCC, HB 10341.

72 167

SCRF Case 195.1(POR)

-76-

16 - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracteriza-
do por as células de hibridoma serem as do hibridoma 27A6 que tem
o número de acesso, no ATCC, HB 10621.

Lisboa,

25. JAN. 1991

Por SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION

- O AGENTE OFICIAL -

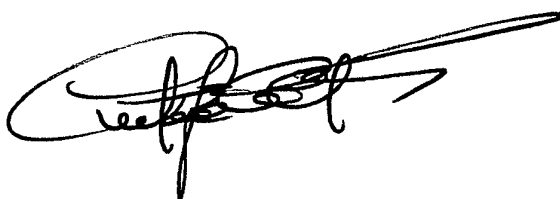
A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

FIGURA 1

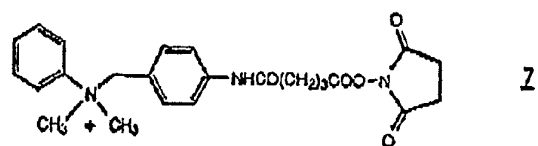
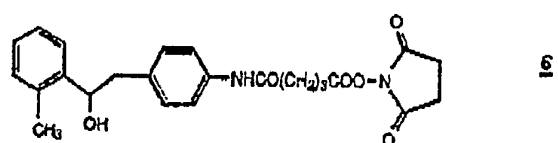
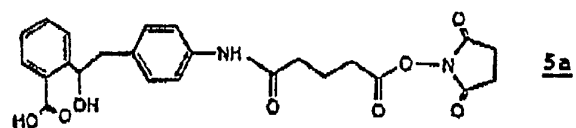
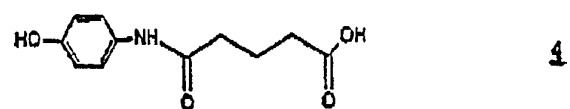
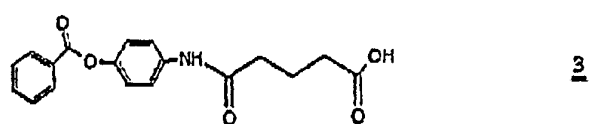
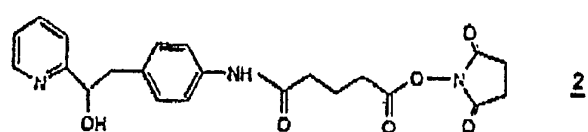
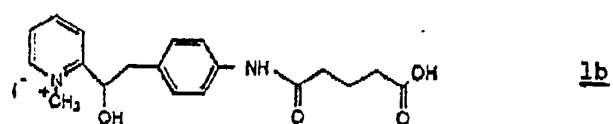
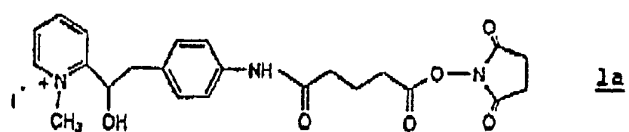


FIGURA 2

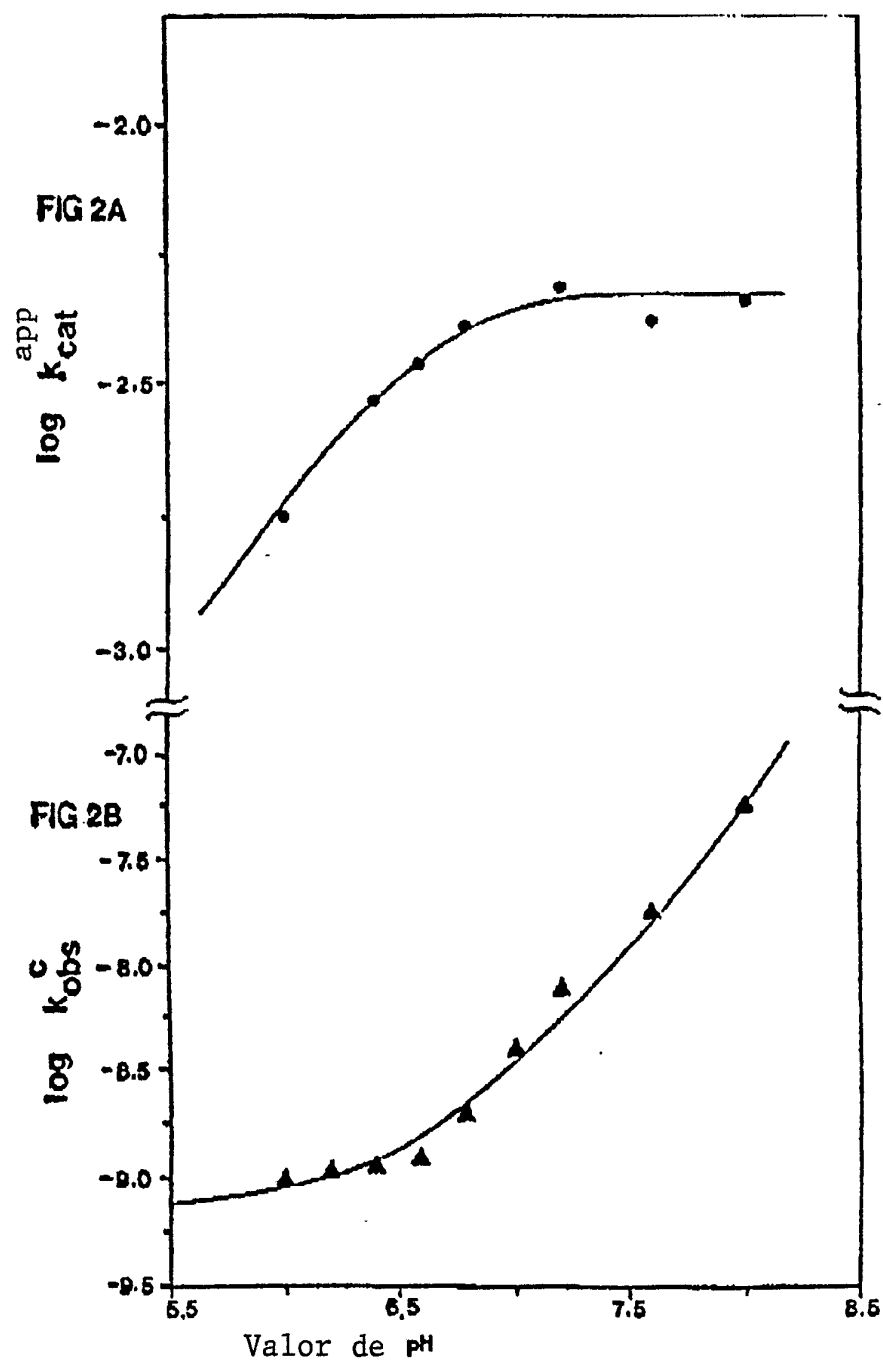


FIGURA 3A

FIGURA 3B

