# DESCRIÇÃO

# DA

# PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99 501

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

EPÍGRAFE: "Processo de activação de uma integrina e de preparação de um penso, de uma composição terapêutica e de formação de um anticorpo monoclonal que imunorreage com uma integrina"

INVENTORES: Mark H. Ginsberg, Edward F. Plow, Timothy E. O'Toole e Andrew L. Frelinger

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 13 de Novembro de 1990 sob o nº 07/613 357

73 367
SCR 0561P/SCRF 227.0 POR

PATENTE Nº 99 501

**"Processo de activação de uma integrina e de preparação de um penso, de uma composição terapêutica e de formação de um anticorpo monoclonal que imunorreage com uma integrina"**


RESUMO

O presente invento refere-se a um processo para activar uma integrina que se liga a um ligando específico, que compreende o contacto da referida integrina com uma solução contendo uma quantidade activadora de anticorpos activadores de integrina que:

(a) imunorreagem com a referida integrina e que quando imunorreagidos aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação ao referido ligando específico; e

(b) imunorreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando formado na referida integrina quando a referida integrina está especificamente ligada ao referido ligando específico.

O invento refere-se ainda ao processo de determinação da competência de activação de células possuindo integrina na sua superfície celular, ao processo de preparação de um penso para cicatrização de feridas e de uma composição terapêutica, ao processo de produção de um conjunto de diagnóstico, para a determinação da presença de competência de activação da integrina em células e ao processo de formação de um anticorpo monoclonal que imunorreage com uma integrina.

MEMÓRIA DESCRITIVA

Campo técnico

O presente invento refere-se a anticorpos que activam integrinas por ligação às integrinas e aumento da afinidade da integrina pelo seu ligando. Os anticorpos imunoreagem também com um sítio de ligação induzido por ligando que é produzido quando um receptor de adesão celular se liga a um péptido, polipéptido ou ligando proteico. O presente invento refere-se também a métodos terapêuticos para aumento da adesão celular mediados por integrinas activadas, particularmente a adesão de plaquetas e células endoteliais.

Fundamentos

A adesão celular envolve geralmente o reconhecimento de proteínas específicas de adesão pelos receptores celulares de superfície. Uma família de receptores de superfície celular com particular interesse são as integrinas.

As integrinas são um grupo de receptores celulares de adesão funcional e estruturalmente relacionados que interagem com uma vasta variedade de ligandos incluindo glicoproteínas da matriz extracelular, complemento e outras células. Hynes, Cell, 48:549-554 (1987), Ginsberg et al, Thromb. Haemostas., 59:1-6 (1988); Rouslathi et al., Science, 238:491-497 (1987). As integrinas participam na adesão célula-matriz e célula-célula em muitos processos fisiologicamente importantes incluindo o desenvolvimento embrionário, hemostase, trombose, cicatrização de feridas, fagocitose, mecanismos de defesa imunitárias e não imunitárias e transformação oncogénica. Duas doenças genéticas humanas, a trombastenia de Glazmann e a deficiência de adesão leucocitária, envolvem membros da família da integrina.

Devido ao papel vital que as integrinas desempenham nos processos celulares, a regulação da função da integrina tem importantes consequências biológicas. Uma abordagem à regulação da função da integrina é a modulação da afinidade da integrina pelo seu ligando. Alguns membros da família da integrina

mostraram requerer activação para manifestar uma total competência de ligação para o seu ligando. Veja-se por exemplo, Wright et al., J. Immunol., 136: 1759-1764 (1986) e Detmers et al., J. Cell Biol., 105:1137-1145 (1987) para o receptor do complemento; e veja-se Bennet et al., J. Clin. Invest., 64:1393-1401 (1979) e Marguerie et al., J. Biol. Chem., 254:5357-5363 (1979) para o receptor das plaquetas (GPIIb-IIIa). A modulação da afinidade duma integrina pelo seu ligando é a abordagem escolhida pelo presente invento para regular a função da integrina.

Estruturalmente, as integrinas são complexos heterodiméricos constituídos por subunidades alfa e beta não covalentemente associadas. Entre a família das integrinas existem grupos reconhecidos relacionados pela presença de uma subunidade beta semelhante e distinguem-se membros em cada grupo por subunidades alfa únicas.

Por exemplo, GPIIb-IIIa é um complexo heterodimérico não covalente, dependente de $Ca^{++}$ constituído pelas subunidades alfa e beta. Jennings et al., J. Biol. Chem., 257:10458-10466 (1982). A subunidade alfa GPIIb, consiste numa cadeia pesada (hGPIIb) possuindo uma massa molecular relativa de cerca de 120 kilodaltons (KDa), e uma cadeia leve (lGPIIb) de cerca de 20 KDa, ligados entre si por pontes de dissulfureto. A subunidade beta, GPIIIa, é um polipéptido de cadeia simples de cerca de 100 KDa. Phillips et al., J. Biol. Chem., 252:2121-2126 (1977). Identificaram-se moléculas da superfície celular imunologicamente relacionadas com GPIIb-IIIa numa variedade de tipos de células. Veja-se Thiagarajan et al., J. Clin. Invest., 75:896-901 (1985).; Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6002-6006 (1986); e Fitzgerald et al., J. Biol. Chem., 260:10893-10896 (1985).

A GPIIb-IIIa contribui para a função das plaquetas através de interacções com proteínas contendo RGD, tal como fibrinogénio [Bennet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2417-2421 (1983)], fibronectina [Ginsberg et al., J.Clin. Invest., 71:619-624 (1983)], e o factor de von Willebrand [Ruggeri et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 79:6038-6041 (1982)], sendo assim um componente do receptor da proteína de adesão de plaquetas [Pytela et al., Science, 231:1559-1562 (1986) e Plow et al., J. Biol. Chem., 259: 5388-5391 (1984)].

Evidências recentes indicam que a GPIIb-IIIa é um dos vários receptores de adesão que partilham uma subunidade beta semelhante e a propriedade funcional de reconhecer a sequência dos resíduos aminoácidos do tripéptido Arg-Gly-Asp (utilizando apenas símbolos de uma letra: RGD). Pytela et al., Science, 231:1559-1562 (1986) e Ruoslathi et al. Cell, 44:517-518 (1986). Adicionalmente a GPIIb-IIIa, este grupo de receptores relacionados inclui o receptor da vitronectina (VnR) e o receptor da fibronectina (FnR) isolados de células de osteossarcoma [Pytela et al., Cell, 40:191-198 (1985), Pytela et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5766-5770 (1985) e Sanchez-Madrid et al., J. Exp. Med., 158:1785-1803 (1983)].

As propriedades funcionais, estruturais e antigénicas semelhantes destas proteínas sugerem que a GPIIb-IIIa e a VnR (um tipo receptor contendo GPIIIa) tipo $\beta_3$ são membros de um grupo de receptores de adesão para o qual foi proposta a designação de "citoadesinas". Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6002-6006 (1986). No grupo das citoadesinas, subunidades alfa distintas combinam-se com uma subunidade beta comum ou muito semelhante, resultando em receptores funcionalmente distintos. Ginsberg et al., J. Biol. Chem., 262:5437-5440 (1987).

Identificaram-se pelo menos dois outros grupos de receptores de adesão heterodiméricos em que uma subunidade beta comum se combina com um número de subunidades alfa distinto. Um dos grupos encontra-se em leucócitos e tem sido referido como família de adesão de leucócitos e inclui a LFA-1, Mac-1 e p150,95. Sanchez-Madrid et al., J. Exp. Med., 158:1785-1803 (1983). e Springer et al., Cyba Found. Symp., 118:102-126 (1986). O outro está mais vastamente distribuído e tem sido referido como família VLA. Hemler et al., J. Biol. Chem., 262:3300-3309 (1987). A subunidade beta da família VLA [Hemler et al., J.Biol. Chem.,

262:3300-3309 (1987) na galinha foi clonada e sequenciada, tendo sido denominada integrina [Tamkun et al., Cell, 46:271-272 (1986). A sequência da integrina de galinha é semelhante à da GPIIIa [Fitzgerald et al., J. Biol. Chem., 262: 3936-3939 (1987)] e à subunidade beta da família de adesão de leucócitos [Kishimoto et al., Cell, 48:681-690 (1987)]. Além disso, sequências parciais de várias subunidades alfa indicam também algumas semelhanças. Ginsberg et al., J. Biol. Chem., 262:5437-5440 (1987); Suzuki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8614-8618 (1986); e Charo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:8351-8356 (1986).

Os sítios em GPIIb-IIIa, ou nas outras citoadesinas, que são requeridos para as suas funções como receptores de adesão não estão bem caracterizadas. Algumas observações sugerem que um sítio funcionalmente significativo na GPIIb-IIIa se encontra próximo do epitopo definido pelo anticorpo monoclonal PMI-1. Este anticorpo liga-se à cadeia pesada de GPIIb [Shadle et al., J. Cell Biol., 99:2056-2060 (1984)] e define uma região de GPIIb que está associada com várias actividades funcionais distintas. Primeiro, o PMI-1 inibe a adesão de plaquetas lavadas ao colagénio. Shadle et al., J. Cell Biol., 99:2056-2060 (1984). Segundo, a orientação de superfície desta região é regulada por catiões divalentes porque concentrações milimolares (mM) de cálcio ou magnésio suprimem a expressão do epitopo PMI-1. Ginsberg et al., J. Clin. Invest., 78:1103-1111 (1986). Terceiro, a regulação anormal por catiões divalentes da conformação deste sítio está associada com um estado funcional trombasténico. Ginsberg et al., J. Clin. Invest., 78:1103 1111 (1986). Quarto, a estimulação de plaquetas com adenosina-difosfato (ADP) até 100 micromolar ou epinefrina, 1 unidade por mililitro de trombina, ou 50 micrograma por mililitro de colagénio de pele de vitelo não aumenta substancialmente a ligação dos anticorpos PMI-1 ás plaquetas.

Estudos de reticulação química localizaram o sítio de ligação do ligando de GPIIb-IIIa à subunidade alfa num local próximo ao local de ligação do cálcio. D'Souza et al., J. Biol. Chem., 265:3440 (1990).

Adicionalmente, no caso de certas integrinas como GPIIb-IIIa, a ligação do ligando, como o fibrinogénio, altera a forma do receptor resultando na expressão de novos sítios de ligação a anticorpos referidos como sítios de ligação induzidos por ligando (LIBS). Veja-se por exemplo, Frelinger et al., J. Biol. Chem., 263:12397-12402 (1988) e Frelinger et al., J. Biol. Chem., 265:6346-6352 (1980). Os LIBS foram também detectados no receptor da vitronectina, sugerindo que esta propriedade é comum a todas as integrinas [Ginsberg et al., J. Biol. Chem., 262:5437-5440 (1987)].

Foi referido que a activação das plaquetas produz o aparecimento na superfície das plaquetas de locais antigénicos não existentes nas plaquetas não activadas, e pelo menos um destes locais induzidos foi localizado no complexo receptor GPIIb-IIIa. Shattil et al., J. biol. Chem. 260:11107-11114 (1985); Coller, B. S., J. Cell Biol., 103:451-456 (1986).

Breve sumário do invento

Verificou-se agora que pode ser preparada uma classe de anticorpos que activam a integrina imunorreagindo com a integrina e aumentando a afinidade da integrina para o seu ligando. Esta classe de anticorpos activadores da integrina possui a propriedade adicional de imunorreagir preferencialmente com um receptor da integrina da superfície celular quando o receptor está ligado especificamente ao (ocupado por) seu ligando, quando comparado com a imunorreacção com o receptor não ocupado ou um ligando não ligado. Isto é, o anticorpo também imunorreage com um sítio de ligação induzido por ligando (LIBS) presente na integrina quando ligado especificamente pelo ligando.

Assim, o invento contempla um anticorpo activador da integrina que imunorreage com uma integrina e que aumenta, após imunorreacção, a afinidade de ligação da integrina para a ligação a um ligando específico para a referida integrina e imunorreage com um sítio de ligação induzido por ligando, formado na referida integrina com afinidade aumentada quando a referida integrina está ligada especificamente ao referido ligando

específico.

Também contemplado está um processo para a activação de uma integrina que se liga a um ligando específico compreendendo contactar a integrina com uma solução contendo uma quantidade activadora de um anticorpo activador da integrina deste invento.

Numa concretização relacionada o invento descreve uma composição terapêutica para aumentar a adesão de células que expressam integrina de superfície celular compreendendo, num veículo farmacêutico aceitável, uma quantidade terapeuticamente eficaz dos anticorpos activadores da integrina deste invento.

Uma concretização relacionada contempla um penso para cicatrização de feridas compreendendo uma matriz suporte contendo um meio para reter e libertar uma composição terapêutica, em que o meio para a retenção e libertação contém uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição terapêutica para o aumento da adesão celular das plaquetas compreendendo um anticorpo activador da integrina deste invento num veículo farmaceuticamente aceitável.

Um processo de diagnóstico é também descrito para a determinação da competência de activação de células contendo integrina de superfície celular, compreendendo:

a) Mistura das referidas células num fluido fisiológico com uma quantidade activadora de anticorpos activadores da integrina deste invento para formar uma mistura de activação;

b) Manutenção da mistura activadora por um período de tempo suficiente para que a integrina da superfície celular imunorreaja com os anticorpos activadores da integrina e forme um imunocomplexo activado da integrina na superfície da superfície das células; e

c) Ensaio da presença do imunocomplexo activado da integrina formado no passo (b) e assim da competência de activação da referida célula.

Breve Descrição das Figuras

Nas figuras que constituem uma parte da descrição deste invento:

A Figura 1 ilustra a ligação do anti-LIBS1 às plaquetas na presença de fibrinogénio estimulado por ADP como descrito no Exemplo 4. Plaquetas filtradas por gel (1 x $10^8$ plaquetas/ml) foram incubadas com anti-LIBS1 marcado com $^{125}I$ e várias concentrações de fibrinogénio na presença (estimulado por ADP) ou ausência (controlo) de ADP (10 $\mu$M) durante 30 minutos a 37°C. A radioactividade ligada às plaquetas foi separada da que estava livre por centrifugação das plaquetas através de uma camada de sacarose. Os resultados são apresentados como a média de determinações em triplicado +/- um desvio padrão.

A Figura 2 ilustra a ligação do anti-LIBS1 a plaquetas que expressam um determinante antigénico críptico como descrito no Exemplo 5. Várias concentrações de anti-LIBS1-$^{125}I$ foram ligadas a 37 °C durante 30 minutos a plaquetas filtradas por gel na ausência de péptido (triângulo invertido), GRGESP 0,8 mM (quadrados), GRGDSP 0,8 mM (triângulos) ou GRGDSP e ADP 10$\mu$M (círculos). A radioactividade ligada foi separada da que estava livre por centrifugação das plaquetas através de uma camada de sacarose.

A Figura 3 ilustra a análise FACS do ensaio de ligação de PAC1 descrito no Exemplo 10, onde o fragmento Fab P41 foi usado para activar a integrina nas plaquetas, células A5 e células CHO. Para este ensaio, os fragmentos Fab do anticorpo activador da integrina, P41, foram preparados e misturados com suspensões separadas de células que ligam a integrina a uma concentração de anticorpo de cerca de 5 $\mu$M. As misturas foram mantidas em gelo durante 20 minutos, após o que foi adicionado FITC-PAC1. As células foram então submetidas a análise por FACS. Os perfis de FACS são apresentados com o número de células marcado no eixo dos YY e o aumento da intensidade de fluorescência marcado no eixo dos XX. Aumentos significativos na ligação do PAC1 pelo tratamento de células com o Fab P41 foram indicados por um desvio

na intensidade média da fluorescência celular (MCFI) superior a três vezes o valor da linha de base. O fragmento Fab P41 aumentou a ligação do PAC1 às plaquetas e células A5 mas não às células CHO.

A Figura 4 ilustra a ligação de equilíbrio entre o fibrinogénio solúvel (Fg) ao Ab-62 estimulado (activado) das células A5 quando medida como no Exemplo 10. As células A5 a uma concentração de $10^6$/ml foram misturadas com 6 $\mu$M de Ab-62 purificado por Sepharose e mantidas a 22 °C durante 30 minutos, para activar a integrina. O Fg iodado foi então misturado em várias concentrações desde 0,01 até 1 nM. Depois de um período de manutenção de 60 minutos, o ligando ligado foi separado do ligando livre por centrifugação através de 0,3 ml de sacarose a 20%. A quantidade de ligando marcado radioactivamente associado com a pelota celular foi determinado por detecção gama. A saturação da ligação foi medida em três experiências diferentes e representada versus a quantidade de concentração de Fg necessária para obter um perfil médio. Uma reapresentação de Scatchard dos dados de ligação foi efectuada e mostrada na inserção.

Descrição Detalhada do Invento

A. Definições

Aminoácido: Todos os resíduos de aminoácido aqui identificados estão na configuração natural L. Mantendo a nomenclatura polipeptídica padrão, J. Biol. Chem., 243:3557-59, (1969), as abreviaturas para os resíduos de aminoácido são apresentadas na seguinte Tabela de Correspondência:

(segue Tabela)

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

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

Deve ser notado que todas as sequências de resíduos de aminoácido são aqui representadas por fórmulas cuja orientação da esquerda para a direita, está na direcção convencional do terminal amino para o terminal carboxilo. Além disso deve ser notado que um travessão no início ou no fim de uma sequência de resíduos de aminoácido indica uma ligação a uma outra sequência de um ou mais resíduos de aminoácido até um total de cerca de 50 resíduos na cadeia polipeptídica.

Polipéptido e Péptido: polipéptido e péptido são termos aqui usados de forma intermutável para designar uma série linear de não mais do que cerca de 50 resíduos de aminoácido ligados uns

aos outros por ligações peptídicas entre os grupos amino alfa e carboxilo de resíduos adjacentes.

Proteína: proteína é um termo aqui utilizado para designar uma série linear maior do que 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros como num polipéptido.

Receptor: receptor e proteína receptora são termos aqui utilizados para indicar uma molécula proteica biologicamente activa que se liga especificamente a (ou com) outras moléculas.

Ligando e Ligando Relacionado: ligando refere-se a uma molécula que contém uma porção estrutural que se liga por interacção específica a um receptor proteico particular.

Sítio de Ligação Induzido por Ligando (LIBS): um LIBS é um neo-determinante antigénico que é expresso por um complexo ligando-receptor da superfície celular que é produzido por uma reacção de ligação não aleatória (específica) mas que não é expressa pelo receptor não ocupado ou pelo ligando não ligado. Um LIBS pode ser ou "conformacional" ou "sequencial". Um LIBS, como aqui é utilizado pode ser o resultado de alterações específicas do receptor induzidas pela ligação do ligando, isto é um "determinante antigénico críptico", ou pode ser formado pela combinação do receptor e resíduos de aminoácido do ligando num determinado sítio de contacto receptor-ligando.

Determinante Antigénico Críptico: Refere-se a um neo-determinante antigénico formado por alterações na conformação ou orientação na superfície da membrana de um receptor proteico após ligação não aleatória ao seu ligando relacionado (específico). As proteínas receptoras aqui descritas não expressam normalmente determinantes antigénico crípticos a menos que o receptor se tenha ligado especificamente a um ligando.

B. Anticorpos e Composição De Anticorpos O termo "anticorpo" nas suas várias formas gramaticais é aqui utilizado para referir moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente activas

de moléculas de imunoglobulina, isto é moléculas que contém um sítio de combinação de anticorpo ou paratopo. Moléculas de anticorpo ilustrativas são moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e aquelas porções de moléculas de imunoglobulina que contenham o paratopo, incluindo, as porções conhecidas nesta área como as Fab, Fab', $F(ab')_2$ e F(V).

O termo "sítio de combinação de anticorpo" refere-se à porção estrutural de uma molécula de anticorpo constituido por uma cadeia pesada e uma cadeia leve variáveis e regiões hipervariáveis que ligam especificamente (imunorreagem com) o antigénio. O termo "imunorreagir" nas suas várias formas, é utilizado aqui para referir a ligação entre uma molécula que contém um determinante antigénico e uma molécula que contém um sítio de combinação de anticorpo seja como uma molécula de anticorpo completa ou apenas uma porção dela.

O termo "determinante antigénico" refere-se à porção estrutural real do antigénio que é imunologicamente ligada por um sítio de combinação de anticorpo. O termo é também sinónimo de epitopo.

Como utilizado aqui, o termo "ligar especificamente" refere-se a uma reacção de ligação não aleatória entre duas moléculas, por exemplo entre uma molécula de anticorpo imunorreagindo com um antigénio ou entre um receptor de superfície celular para a integrina e uma molécula de ligando. Uma ilustração de um complexo receptor-ligando ligados especificamente é a ligação entre GPIIb-IIIa de plaquetas e o fibrinogénio na superfície das plaquetas. Outros ligandos que se sabe ligarem especificamente a GPIIb-IIIa e expressarem um LIBS no complexo receptor-ligando incluem o polipéptido GRGDSP, a cadeia polipeptídica gama dos resíduos aminoácidos 400 a 411 do fibrinogénio, e semelhantes.

Outras reacções de ligação específica entre uma integrina e um ligando específico são bem conhecidas e dependem da integrina

em particular e da especificidade de ligação ao ligando da integrina como a seguir se descreve.

O ligando a que uma integrina se liga especificamente é referido como um ligando específico e tem necessariamente que ser referido no contexto de uma integrina particular. Ligandos específicos para a ligação a integrinas estão bem caracterizados para muitas integrinas descritas até à data. Por exemplo, o fibrinogénio é um ligando específico para o receptor das plaquetas (GPIIb-IIIa); a vitronectina, o factor de von Willebrand e o fibrinogénio são ligandos específicos para o receptor da vitronectina (VnR); a fibronectina é um ligando específico para o receptor VLA-5; a laminina é um ligando específico para o receptor VLA-6; e o colagénio é um ligando específico para o receptor VLA-2. Não se pretende que a enumeração anterior de ligandos específicos seja limitante mas em vez disso identifica os ligandos específicos melhor caracterizados para integrinas particulares, ou seja identifica pares representativos integrina-ligando que participam na ligação específica. Outros ligandos e integrinas podem ser utilizados nas composições e processos aqui descritos.

Preferencialmente um anticorpo activador de integrina numa composição de anticorpo deste invento é um anticorpo monoclonal e assim a composição do anticorpo é referida como uma composição de anticorpo monoclonal. A frase "composição de anticorpo monoclonal", nas suas várias formas gramaticais refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém somente uma espécie de sítio de combinação de anticorpo, capaz de imunoreagir com um antigénio particular. Uma composição de anticorpo monoclonal apresenta, assim, tipicamente uma afinidade de ligação única para qualquer antigénio com que imunorreage. Uma composição de anticorpo monoclonal pode assim conter uma molécula de anticorpo que possua uma pluralidade de sítios de combinação de anticorpo, cada um deles imunoespecífico para um antigénio diferente, por exemplo um anticorpo monoclonal biespecífico.

Um anticorpo ou composição de anticorpo monoclonal do

presente invento é caracterizado por conter moléculas de anticorpo que imunorreagem com uma integrina e, dessa forma, aumentam a afinidade de ligação da integrina para a ligação ao ligando. Um anticorpo deste invento é referido como um anticorpo activador da integrina para indicar a propriedade activadora única para a integrina do anticorpo como aqui descrito. Um anticorpo activador da integrina é também caracterizado por imunorreagir com um sítio de ligação induzido pelo ligando (LIBS) que se forma no complexo integrina-ligando quando a integrina está especificamente ligada a um ligando específico (pré-determinado).

A afinidade de ligação entre uma integrina e um ligando ao qual se liga especificamente pode ser prontamente medida utilizando uma variedade de abordagens de ligação molecular bem conhecidas na arte, incluindo estudos de equlíbrio de ligação em conjunto com medidas de pontos de saturação e gráficos de Scatchard, como descrito no Exemplo 10. O aumento na afinidade de ligação do ligando pode assim ser prontamente detectado por comparação da afinidade da ligação do ligando em condições experimentais em que o anticorpo activador está presente ou ausente.

Um anticorpo é considerado um anticorpo activador da integrina se induz através de imunorreacção específica com a integrina, um aumento da afinidade de ligação medida entre a integrina e o ligando específico, isto é, um aumento na afinidade da ligação do ligando. Preferencialmente o aumento na afinidade é maior do que uma ordem de grandeza e mais preferivelmente maior do que duas ordens de grandeza na constante dissociação (Kd) medida, usada para expressar a afinidade de ligação. Particularmente preferidos são os anticorpos activadores da integrina que produzem uma afinidade de ligação específica para o ligando através de imunorreacção com a integrina que quando expressa como uma constante de dissociação é maior do que $10^{-5}$ M, e preferencialmente é maior do que $10^{-6}$ M. Um exemplo é a afinidade de Kd=110 nM para $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente nas células A5 quando medida para a ligação do fibrinogénio no Exemplo 10 após

activação pelo anticorpo monoclonal Ab-62.

Um ensaio alternativo para medida da actividade activadora da integrina detecta a imunorreacção de um anticorpo específico de activação com a integrina antes e depois da activação. Os anticorpos específicos para a activação foram descritos para a integrina GPIIb-IIIa e são exemplos do ensaio alternativo como descrito no Exemplo 10. Quando um anticorpo específico de activação está disponível o ensaio alternativo é preferido devido à relativa facilidade de medida da ligação de uma anticorpo específico de activação quando comparado com estudos de equilíbrio de ligação para detectar alterações nas constantes de dissociação.

Num ensaio de ligação de um anticorpo específico de activação um anticorpo activador da integrina é medido tipicamente por citometria de fluxo envolvendo selecção celular activada por fluorescência (FACS), como descrito no Exemplo 10. Um anticorpo é considerado activador da integrina se existir um aumento, após imunorreacção da integrina com o anticorpo activador, da intensidade da fluorescência celular média (MCFI) das células activadas em relação à população celular de base (não activada), numa quantidade de pelo menos três vezes no MCFI, e preferencialmente um aumento de cerca de dez vezes no MCFI.

Considera-se que um anticorpo imunoreage com um LIBS se o anticorpo se liga preferencialmente a uma integrina ocupada por um ligando quando comparada com a imunorreacção com uma integrina não ligada (não ocupada). A ligação preferencial reflecte uma afinidade de ligação relativa e pode ser medida como descrito acima por comparação da ligação do anticorpo com (imunorreacção com) a integrina na presença ou ausência de um ligando específico para essa integrina. As afinidades de ligação de imunorreacções comparativas são também convenientemente medidas experimentalmente como descrito no Exemplo 2, e são assim exemplos de um meio preferido para identificar um anticorpo anti-LIBS.

Um anticorpo é designado como preferencialmente ligado a um

LIBS numa integrina ocupada por um ligando quando existe uma diferença detectável na afinidade do anticorpo para a imunorreacção com a integrina quando presente como um complexo integrina-ligando comparado com uma integrina não ocupada de tal forma que a maior afinidade é para o complexo. Preferencialmente, a diferença na afinidade é pelo menos maior do que cerca de 20% quando medida como descrito no Exemplo 2 utilizando a razão ($B/B_0$) do produto da imunoreacção detectável na presença de (B) em relação à ausência ($B_0$) de integrinas que competem num ensaio de competição para determinar um aumento na relação quando o ligando específico da integrina é adicionado à mistura do ensaio de competição e induz a expressão do LIBS na integrina.

Numa concretização preferida, um anticorpo activador da integrina possui a propriedade adicional de imunorreagir com um epitopo LIBS numa integrina com afinidade aumentada. A afinidade aumentada é medida utilizando o mesmo ELISA de competição descrito no Exemplo 2 tal como para a identificação de um LIBS numa integrina, como exemplificado pelo painel de anticorpos caracterizados na Tabela 1.

Um anticorpo activador da integrina possui afinidade aumentada para a imunorreacção se a alteração percentual em $B/B_0$ após adição de ligando específico à mistura de imunorreacção da ELISA de competição é maior do que 25%, preferivelmente maior do que 30% e ainda mais preferivelmente, maior do que 40%. Os anticorpos activadores da integrina LIBSb, LIBSc e LIBSf são membros da classe de anticorpos activadores da integrina com afinidade aumentada, particularmente preferidos. A propriedade de afinidade aumentada para estes anticorpos pode ser vista na Tabela 1, e proporciona a vantagem da maior imunoespecificidade nos processos de diagnóstico e terapêuticos aqui descritos.

C. Processos para a Produção de Composições de Anticorpos Monoclonais

Uma composição de anticorpo monoclonal é tipicamente composta por anticorpos produzidos por clones de uma única célula, denominada um hibridoma, que segrega (produz) um único

tipo de molécula de anticorpo. Historicamente, a célula de hibridoma foi formada por fusão de uma célula produtora de anticorpo com um mieloma ou com outra linha celular de auto-perpetuação. Tais anticorpos foram descritos primeiro por Kohler e Milstein, Nature 256:495-497 (1975), cuja descrição é incorporada para referência, apesar de, depois disso, terem sido descritas numerosas variações para a produção de células de hibridoma, como é bem conhecido.

A preparação de anticorpos monoclonais envolve geralmente a imunização de um mamífero com um inóculo, contendo a integrina contra a qual o anticorpo deve imunorreagir, induzindo assim no mamífero moléculas de anticorpo tendo a imunoespecificidade aqui descrita. As células produtoras de anticorpo são então isoladas, clonadas e seleccionadas em termos da presença das moléculas de anticorpo de interesse.

Deste modo, o presente invento comtempla um método de formação de um anticorpo monoclonal activador da integrina, que imunorreage com uma integrina, e quando imunorreage aumenta a afinidade de ligação da integrina para se ligar a um ligando específico pré-seleccionado, e que imunorreage com um sítio de ligação induzido pelo ligando, expresso por um complexo integrina-ligando, onde o complexo contém a integrina ligada especificamente a um ligando específico (pré-seleccionado). O processo compreende os passos de:

a) Imunização de um animal com um inóculo compreendendo uma integrina. A integrina pode apresentar-se numa variedade de formas, tal como é aqui descrito, apesar de ser preferível que a integrina esteja apresente na forma de um complexo integrina-ligando. Formas representativas incluem, integrina purificada, integrina purificada misturada com um ligando específico, tal como é descrito no Exemplo 2, integrina parcialmente isolada na forma de membranas celulares contendo o receptor de integrina da superfície celular associado com as membranas, tal como é descrito em nota de rodapé e da Tabela 1 para o anticorpo PM1-2, e células completas contendo a integrina

associada com a membrana celular, tal como é descrito no Exemplo 10 para o anticorpo P41 utilizando plaquetas intactas.

Quando a integrina é $\alpha_{IIb}\beta_3$, é preferível que o imunogénio seja um complexo de GPIIb-IIIa e um ligando específico de GPIIb-IIIa, tal como o fibrinogéneo, GRGDSP, a cadeia gama de fibrinogéneo e semelhantes. A imunização é tipicamente efectuada por administração do inóculo, a um mamífero imunologicamente competente, numa quantidade imunologicamente eficaz, isto é uma quantidade suficiente para produzir uma resposta imunitária. Preferencialmente, o mamífero é um roedor tal como um coelho, ratazana ou ratinho. O mamífero é então mantido durante um período de tempo suficiente para o mamífero produzir células secretoras de moléculas de anticorpo que imunoreagem com o complexo receptor-ligando.

A palavra "inóculo", nas suas várias formas gramaticais, é aqui utilizada para descrever uma composição contendo uma integrina, numa das formas descritas acima, como um ingrediente activo utilizado para a preparação de anticorpos activadores de integrina.

O inóculo contém uma quantidade eficaz, imunogénica, de uma integrina, preferencialmente em combinação, como uma mistura, com um ligando específico. A quantidade eficaz de integrina por unidade de dose, suficiente para induzir uma resposta imunitária à integrina imunizante, depende, entre outras coisas, da espécie animal inoculada, do peso corporal do animal e do regime de inoculação escolhido, tal como é bem conhecido na arte. Tipicamente, os inóculos contêm concentrações proteicas de cerca de 10 microgramas a cerca de 500 miligramas por inoculação (dose), preferencialmente cerca de 50 microgramas a cerca de 50 miligramas por dose.

O termo "dose unitária" quando respeita aos inóculos, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o animal, cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de material activo, calculada para

produzir o efeito imunogénico desejado, em associação com o diluente requerido; isto é, o transportador do veículo. As especificações para a nova dose unitária de um inóculo deste invento são ditadas e directamente dependentes de (a) características únicas do material activo e do efeito imunológico particular a ser conseguido, e (b) limitações inerentes à arte da composição deste material activo para uso imunológico em animais, tal como é aqui descrito em detalhe, correspondendo estas a características do presente invento.

Os inóculos são tipicamente preparados a partir do imunogénio, por exemplo uma integrina isolada, através da dispersão do imunogénio num diluente fisiologicamente tolerável (aceitável), tal como a água, solução salina ou solução salina tamponada com fosfato, para formar uma composição aquosa.

Os inóculos podem também incluir um adjuvante, como parte do diluente. Os adjuvantes tal como o adjuvante de Freund completo (CFA), adjuvante de Freund incompleto (IFA) e alúmen são materiais bem conhecidos na arte e encontram-se disponíveis comercialmente a partir de várias fontes.

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

(c) As células produtoras de anticorpo em suspensão são tratadas com um agente transformador, capaz de produzir uma linha celular transformada ("imortalizada"). Agentes transformadores e a sua utilização para produzir linhas celulares imortalizadas (transformadas), são bem conhecidos na arte e incluem vírus de ADN, tal como o Vírus de Epstein Barr (EBV), O Vírus Símio 40 (SV40), o Vírus de Polioma e outros, vírus de ARN, tal como o Vírus de Leucemia Murina de Moloney (Mo-MuLV), Vírus do Sarcoma de Rous e outros, células de mieloma, tal como P3X63-Ag8.653,

Sp2/O-Ag14 e outros.

Em concretizações preferidas, o tratamento com o agente transformador resulta na produção de um hibridoma, por meio de fusão das células do baço suspensas com células de mieloma de ratinho de uma linha celular adequada, através da utilização de um promotor de fusão adequado. A razão preferida é cerca de 5 células de baço por célula de mieloma, numa suspensão contendo cerca de $10^8$ esplenócitos. Um promotor de fusão preferido é um polietilenoglicol, possuindo uma massa molecular média de cerca de 1000 a cerca de 4000 (disponível comercialmente como PEG 1000, etc.); no entanto, podem ser empregues outros promotores de fusão conhecidos na arte.

A linha celular utilizada deve preferencialmente ser do tipo denominado "resistente a drogas", de modo a que as células do mieloma não fundidas não sobrevivam num meio selectivo, enquanto que os híbridos sobrevivem. A classe mais comum são as linhas celulares resistentes a 8-azaguanina, que não possuem a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosilo-transferase e que portanto não proliferam em meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). É também geralmente preferível, que a linha celular de mieloma utlilizada seja do tipo denominado "não secretor", o qual por si só não produz qualquer anticorpo. No entanto, em alguns casos podem ser preferíveis linhas de mieloma secretoras.

(d) As células transformadas são então clonadas, preferencialmente até à monoclonalidade. A clonagem é preferencialmente efectuada num meio de cultura de tecidos que não permite a proliferação das células não transformadas. Quando as células transformadas são hibridomas, isto é tipicamente efectuado por diluição e cultura, em recipientes separados, de mistura de células de baço não fundidas, células de mieloma não fundidas e células fundidas (hibridomas), num meio selectivo que não permite a proliferação de células de mieloma não fundidas (células não transformadas). As células são cultivadas neste meio durante um período de tempo suficiente para permitir a morte das células não fundidas (cerca de uma semana). A diluição pode ser

uma diluição limitante, na qual o volume de diluente é estatisticamente calculado para isolar um certo número de células (e.g., 1-4) em cada recipiente separado (e.g., cada alvéolo de uma placa de microtitulação). O meio (e.g., meio HAT), é um dos que não permite a proliferação da linha celular de mieloma resistente a drogas (e.g., resistente a 8-azaguanina) não fundida.

(e) O meio de cultura de tecidos dos transformantes clonados é então ensaiado (avaliado), de modo a detectar a presença de moléculas de anticorpo segregadas contendo as propriedades imunorreactivas, tal como é aqui descrito utilizando as técnicas bem conhecidas de selecção imunológica conjuntamente com os ensaios aqui descritos para identificar anticorpos activadores de integrina.

Tal como é apresentado pelos vários protocolos de selecção no Exemplo 2 para identificar anticorpos activadores de integrina, vários ensaios em separado são tipicamente efectuados para identificar um anticorpo deste invento. Primeiro, a cultura é avaliada quanto a anticorpos imunorreactivos com o imunogénio. As culturas contendo anticorpos imunorreactivos para a integrina são então avaliados adicionalmente quanto à presença de anticorpos que exibem actividade activadora da integrina. Ensaios de activação representativa encontram-se descritos nos Exemplos 2 e 10. Apesar de não ser requerido, é preferível seleccionar primeiro os anticorpos reactivos ao imunogénio porque o ensaio de imunorreacção é mais conveniente do que o ensaio de activação, e serve para limitar os candidatos à análise de actividade activadora. No entanto, nada indica que a primeira selecção seja requerida; apenas que é preferível.

(f) Um transformante desejado é então seleccionado e cultivado num meio de cultura de tecidos apropriado, durante um período de tempo adequado, seguido de recuperação (colheita) do anticorpo desejado a partir do sobrenadante da cultura, através de técnicas bem conhecidas. O meio adequado e o período de cultura adequado são também bem conhecidos ou facilmente

determinados.

Descrevem-se no Exemplo 2 processos representativos e preferíveis para a produção de composições de anticorpo monoclonal activador da integrina.

Identificaram-se no Exemplo 2 anticorpos monoclonais activadores de integrina que imunorreagem com a integrina GPIIb-IIIa e, quando depois de imunorreagirem, verificou-se que activam a integrina. Anticorpos semelhantes activadores de integrina, que activam outras integrinas, podem ser isolados utilizando os procedimentos aqui descritos, desde que o ligando específico seja conhecido e esteja disponível para ser utilizado no processo de selecção e que uma fonte para utilização da integrina como imunogénico esteja disponível. Assim, o presente invento proporciona processos aplicáveis à produção de anticorpos que activam o receptor da vitronectina, o receptor da laminina VLA-6, o receptor da fibronectina VLA-5, o receptor do colagéneo VLA-2 e outras integrinas semelhantes.

Para produzir uma maior concentração de anticorpo monoclonal, relativamente menos puro, o hibridoma desejado pode ser transferido por injecção no ratinho, preferencialmente em ratinhos singénicos ou semi-singénicos. O hibridoma causará a formação de tumores produtores de anticorpo, após um tempo de incubação adequado, o qual resultará numa elevada concentração do anticorpo desejado (cerca de 5-20 mg/ml) na corrente sanguínea e no exudado peritoneal (ascites) do ratinho hospedeiro.

A composição de anticorpo monoclonal pode ser enriquecida, nas moléculas de anticorpo desejadas, através de métodos de isolamento adicionais, tais como a cromatografia de imunoafinidade utilizando os antigéneos fixos na fase sólida, tal como aqui é descrito, ou, por exemplo, através de DEAE Sephadex para obter a fracção de IgG, se tal for desejado.

Meios e animais úteis para a preparação destas composições são ambos bem conhecidos na arte e disponíveis comercialmente e

incluem meios de cultura sintéticos, ratinhos consanguíneos e semelhantes. Um exemplo de meio sintético é o meio essencial mínimo de Dulbecco [DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8:396 (1959)] suplementado com 4,5 g/l de glucose, glutamina 20 mM e 20% de soro fetal de vitelo. Um exemplo de estirpe de ratinho consanguíneo é o Balb/c.

Uma composição de anticorpo monoclonal pode também ser produzida por processos bem conhecidos dos peritos na arte de produzir anticorpos por métodos de ADN recombinante. Estes métodos incluem o isolamento, manipulação e expressão de ácido nucleico que codifica toda ou parte de uma região variável de imunoglobulina, incluindo a porção da região variável, compreendida pela região variável da cadeia leve da imunoglobulina, e a porção da região variável, compreendida pela região variável da cadeia pesada da imunoglobulina. Métodos de isolamento, manipulação e expressão de ácido nucleico codificador da região variável em hospedeiros procariotas e eucariotas são apresentados em Robinson et al., Publicação PCT Nº WO 89/0099; Winter et al., Publicação de Patente Europeia Nº. 0239400; Reading, Patente U.S. Nº. 4 714 681; Cabilly et al., Publicação de Patente Europeia Nº 0125023; Sorge et al., Mol. Cell. Biol. 4:1730-1737 (1984); Beher et al., Science, 240:1041-1043 (1988); Skerra et al., Science, 240:1030-1041 (1988); e Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 3833-3837 (1989). Tipicamente o ácido nucleico codifica toda ou parte de uma região variável da imunoglobulina, que se liga a um antigénio pré-seleccionado (ligando). Fontes de tais ácidos nucleicos são bem conhecidas dos peritos na arte e, por exemplo, podem ser obtidos a partir de um hibridoma produtor de um anticorpo monoclonal que se liga a um antigénio pré-seleccionado, ou o antigénio pré-seleccionado pode ser utilizado para seleccionar uma biblioteca de expressão codificadora de uma pluralidade de regiões variáveis de imunoglobulina, isolando deste modo o ácido nucleico.

Veja-se, por exemplo, o método de isolamento de anticorpos monoclonais a partir de um reportório imunológico, tal como é

descrito por Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Scr. 86:5728-5732 (1989); e Huse et al., Science, 246:1275-1281 (1989).

As composições de anticorpo monoclonal produzidas pelo método acima descrito podem ser utilizadas, por exemplo, em modalidades de diagnóstico e terapia onde seja desejada a activação de integrina, tal como será descrito a seguir.

D. Hibridomas

Os hibridomas do presente invento são aqueles que são caracterizados como tendo a capacidade de produzir uma composição de anticorpo monoclonal activador de integrina deste invento.

Um hibridoma preferido do presente invento é caracterizado como produtor de moléculas de anticorpo activador de integrina, que imunorreagem com uma integrina, e quando imunorreagem activam a afinidade da integrina para o seu ligando específico. O anticorpo também imunorreage com um LIBS, e preferencialmente imunorreage com um LIBS presente numa subunidade beta da integrina, e mais preferencialmente imunorreage com um LIBS da subunidade GPIIIa no complexo GPIIb-IIIa-fibrinogéneo associado a plaquetas.

Os hibridomas representativos preferidos são preparados e descritos no Exemplo 2. Particularmente preferíveis, são as culturas de hibridoma designadas LIBSb, LIBSc, LIBSf e PMI-2.

A cultura de hibridoma PMI-2 foi depositada obedecendo aos requisitos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD 20852, USA, em 22 de Dezembro de 1987, tendo-lhe sido atribuído o número de acesso HB 9615.

Este hibridoma foi depositado num depositário com capacidade para a permanência do depósito e pronta acessibilidade ao mesmo pelo público sob a garantia de patente, em condições que asseguram que o acesso ao hibridoma estará disponível durante o período em que o pedido de patente está pendente, aos que têm direito a esse acesso, e todas as restrições à disponibilidade

para o público, do hibridoma tal como depositado, serão irrevogavelmente removidas após a concessão da patente. O hibridoma depositado será mantido pela ATCC, e todos os custos de manutenção foram pagos até ao termo da patente ou até 30 anos a partir da data do depósito, o que quer que ocorra primeiro, e em qualquer dos casos pelo menos até cinco anos após a data do último pedido de acesso.

Os processos para a produção de hibridomas que produzem (segregam) moléculas de anticorpo que possuem uma imunoespecificidade desejada, isto é possuem a capacidade de imunorreagir com uma proteína particular, com um epitopo identificável de uma proteína particular e/ou com um polipéptido, são bem conhecidos na arte e encontram-se a seguir descritos. Particularmente aplicável é a tecnologia de hibridomas descrita por Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983), e por Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981), cujas descrições são aqui incorporadas para referência.

E. Processos terapêuticos e composições

Estão contemplados os processos terapêuticos e composições para activação de integrinas. Estes processos são úteis na promoção da adesão celular mediada pelas integrinas e encontram aplicação numa vasta variedade de tipos celulares, tecidos e sistemas em que a adesão celular é desejada.

Assim, em geral, o invento contempla um processo para activação de uma integrina que se liga a um ligando específico compreendendo o contacto da integrina com uma solução contendo uma quantidade activadora de um anticorpo activador da integrina, que é imunoespecífico para a integrina, como aqui descrito.

Tipicamente o processo é praticado em células que expressam a integrina na superfície celular, pelo que o contacto ocorre por mistura das células numa solução com os anticorpos activadores da integrina para formar uma mistura de activação. A mistura é preferencialmente fisiologicamente compatível com a viabilidade das células, preferencialmente estéril e mais preferencialmente

compatível com a mistura com sangue de forma a facilitar a adição da mistura ao sangue antes ou durante a activação da integrina.

Uma quantidade activadora de anticorpo activador da integrina é uma quantidade suficiente para produzir o resultado desejado, nomeadamente para activar a integrina a um grau suficiente para promover o grau desejado de adesão da célula que expressa a integrina e tipicamente depende da quantidade de integrina a ser contactada para activação.

Na medida em que a activação da integrina envolve o aumento da afinidade de ligação do ligando de uma integrina, uma quantidade activadora de anticorpo activador da integrina é uma quantidade que aumenta a afinidade para o ligando, e pode ser medida pela correlação de doses administradas para aumentar a afinidade do ligando medida pelos processos de afinidade de ligação descritos.

Em concretizações preferidas, seja o método praticado in vitro ou in vivo, uma quantidade activadora é uma quantidade suficiente para proporcionar pelo menos um equivalente molar de anticorpo activador da integrina por equivalente molar de integrina a ser activada. Esta quantidade é referida como a quantidade estequiométrica de anticorpo activador da integrina. Embora a afinidade do anticorpo para a imunoreacção seja tipicamente suficiente para um anticorpo activador da integrina imunorreagir estequiometricamente em soluções diluídas, prefere-se que a quantidade de activação esteja no intervalo de cerca de 100 nanomolar (nM) até 1 milimolar (mM), preferencialmente na gama de 1 a 100 micromolar ($\mu$M) e mais preferencialmente cerca de 5 a 10 $\mu$M.

Quando um processo de activação de integrina é praticado in vitro, uma amostra líquida contendo integrina, e preferencialmente um fluido fisiológico contendo células que expressam integrina na superfície celular são misturados com uma quantidade activadora de um anticorpo activador da integrina deste invento para formar uma mistura de activação. A mistura de

activação é mantida sob condições biológicas compatíveis com a formação de um produto de imunorreacção e também compatível com, se necessário, com a viabilidade celular durante um período de tempo suficiente para o anticorpo activador da integrina imunorreagir com a integrina e, quando imunorreagido, activar a integrina.

Quando o processo de activação da integrina é praticado in vivo, uma quantidade activadora de uma composição de anticorpo contendo um diluente fisiologicamente tolerável e moléculas de anticorpo activador da integrina como aqui descrito, é administrada intravenosamente a um mamífero, e o mamífero é mantido durante um período de tempo suficiente para permitir que as moléculas de anticorpo imunorreajam com qualquer integrina presente na forma de um complexo ligando-receptor que expressa LIBS e forma um produto activador de imunorreacção.

Em concretizações preferidas uma composição terapêutica para uso num processo de activação da integrina inclui moléculas de anticorpo activador da integrina que imunoreagem com a subunidade beta do heterodímero da integrina. Particularmente preferidos são os anticorpos activadores da integrina que imunoreagem com a subunidade GPIIIa da glicoproteína das plaquetas GPIIb-IIIa. Exemplos de composições compreendem um ou mais dos anticorpos monoclonais segregados pelos hibridomas LIBSb, LIBSc, LIBSf, PMI-2 ou P41.

Particularmente preferidas são as composições terapêuticas que incluem uma anticorpo activador da integrina com afinidade aumentada para a imunorreacção com LIBS como aqui descrito.

Numa concretização, o invento contempla um processo para promover a adesão das células que expressam integrina de superfície celular. A adesão das células a tecidos e superfícies específicas é promovida pela activação da integrina, aumentando assim a afinidade do ligando específico da integrina na superfície celular. Esta abordagem é particularmente adequada para aplicações em que a limitação da mobilidade celular é

desejada porque o resultado final consiste em a célula se tornar mais aderente para a selecção de alvos após activação da integrina.

Por exemplo, em casos de trauma vascular local, em que as superfícies dos vasos sanguíneos (vasculares) em contacto com o fluido vascular estão danificados ou em ruptura, é desejável uma activação rápida das plaquetas. Em doentes em que a activação das plaquetas é de algum modo atrasada, ou quando é desejado alvejamento e deposição acelerados de plaquetas em superfícies vasculares, a activação da integrina GPIIb-IIIa das plaquetas promoverá a adesão plaquetária.

Assim, um processo para promoção da adesão de células que expressam integrina da superfície celular, para a adesão a superfícies vasculares com fluido vascular em contacto com a superfície vascular, tal como a superfície interna de um vaso sanguíneo, compreende a mistura de uma quantidade activadora de um anticorpo activador da integrina deste invento com o referido fluido vascular que possui as células que devem aderir. Depois disto a mistura é mantida durante um período suficiente para que os anticorpos activadores imunorreajam com a integrina e formem uma integrina activada.

Numa concretização preferida, o processo é útil para promover a deposição de plaquetas em vasculatura traumatizada (vasos sanguíneos em ruptura ou danificados de alguma forma) em que o fibrinogénio é exposto ao fluido vascular. A administração de quantidades activadoras de anticorpos activadores anti-GPIIb-IIIa directamente na circulação, ou localmente na região danificada do vaso sanguíneo, proporciona um meio para misturar <u>in vivo</u> a quantidade activadora de integrina de anticorpo activador da integrina com a integrina presente nas plaquetas. As dosagens preferidas podem variar, mas incluem tipicamente uma quantidade suficiente para produzir uma concentração no sangue de cerca de 1 a 100 $\mu$M, preferencialmente cerca de 5 a 10 $\mu$M de um anticorpo activador da integrina. O passo de manutenção para a imunorreacção entre o anticorpo

misturado com o alvo integrina ocorre in vivo nesta concretização.

Numa concretização relacionada, a deposição de células endoteliais em superfícies vasculares tal como a superfície exposta ao fluido vascular de uma prótese, orgão artificial, desvio vascular ("vascular shunt") e superfícies sintéticas semelhantes em contacto directo com o sangue ou com o plasma é desejável para reduzir respostas trombogénicas indesejáveis à superfície sintética. Para dirigir as células endoteliais e promover a sua deposição na superfície exposta ao fluido vascular de uma prótese, um anticorpo activador da integrina é misturado de acordo com os presentes processos com as células endoteliais para activar uma das várias integrinas tipicamente encontradas nas células endoteliais.

A escolha da imunoespecificidade de um anticorpo num anticorpo activador da integrina para uso num processo que promova a adesão de células endoteliais, depende da superfície à qual se pretende a adesão das células endoteliais, e o ligando específico presente na superfície a que a integrina activada da célula endotelial adere.

Para materiais sintéticos de prótese que normalmente não contêm ligandos específicos para a integrina nas suas superfícies expostas ao fluido vascular, é conveniente revestir ou de alguma forma, fixar um ligando específico como alvo para a ligação da integrina à superfície de exposição ao fluido. Os ligandos específicos adequados incluem colagénio, fibronectina ou laminina em que as integrinas a serem activadas são os receptores VLA-2, VLA-5 ou VLA-6, respectivamente. No entanto, o mais preferido para promover a adesão de células endoteliais devido à abundância relativa de integrinas nas células endoteliais, é um ligando específico para o receptor da vitronectina, nomeadamente, vitronectina, fibrinogénio ou factor de von Willebrand.

Assim, em concretizações para promover a adesão de células endoteliais a superfícies prostéticas expostas ao fluido

vascular, o método envolve a mistura de um anticorpo activador da integrina imunoespecífico para uma integrina de uma célula endotelial com um fluido vascular contendo as células endoteliais. Preferencialmente o anticorpo activador é imunoespecífico para o receptor da vitronectina (VnR), mais preferencialmente imunoespecífico para a subunidade beta do VnR e ainda mais preferencialmente é um anticorpo activador da integrina que possui afinidade aumentada para um LIBS na subunidade beta de VnR.

Na prática do método para promoção da adesão das células endoteliais às superfícies prostéticas expostas ao fluido vascular, as células endoteliais podem ser misturadas in vivo por administração intravenosa de um anticorpo activador da integrina, ou podem ser misturadas ex vivo ou in vitro tal como um desvio extracorporal ("extracoporeal shunt") do fluido vascular contendo células endoteliais ou extracção de células endoteliais para uma mistura de activação como aqui descrito. A activação de células endoteliais pelos presentes processos utilizando anticorpos activadores da integrina aumenta a taxa e a extensão de aparecimento de células endoteliais sobre uma prótese, pelo menos com incrementos de 10 vezes no número de células aderentes por unidade de superfície de superfície exposta ao fluido vascular e na taxa de adesão celular.

Outra concretização contemplada para a promoção da adesão celular de acordo com os processos terapêuticos deste invento, envolve o direccionamento de células endoteliais para superfícies expostas ao fluido vascular, tais como paredes de vasos sanguíneos traumatizados em que a cicatrização da ferida é necessária e tecidos onde outras lesões, como danos tissulares mediados por inflamação ou infecção, podem beneficiar da deposição das células endoteliais. Os vasos danificados e outros tecidos lesionados contêm níveis elevados de fluido vascular exposto ao colagénio e são idealmente adequados para alvejar as células endoteliais portadoras de receptores de colagénio pelos processos de activação da integrina aqui descritos. Nesta concretização os anticorpos activadores do receptor do colagénio

imunoespecíficos para o receptor do colagénio são utilizados para activar as células endoteliais portadoras de integrina receptora do colagénio, tal como VLA-2, de acordo com o processo da promoção da adesão celular aqui descrito.

Noutra concretização para promover e dirigir a adesão celular, o invento proporciona um meio para inibir a mobilidade de células tumorais pelo aumento da aderência e, por isso, reduzir a probabilidade de livre circulação de células tumorais não ligadas, restringindo, por sua vez, a infestação em locais diferentes do local de origem da célula tumoral. Nesta concretização, aplicam-se as considerações gerais acima descritas, nomeadamente para seleccionar a imunoespecificidade do anticorpo activador da integrina com base na classe da integrina que predomina na célula tumoral, ou com base no tecido ao qual é desejada a adesão da célula tumoral.

Por exemplo, para células de melanoma, que expressam o receptor da vitronectina na superfície celular, anticorpos activadores anti-receptor da vitronectina são preferidos para o uso nos processos aqui descritos para promoção da adesão das células de melanoma. A aplicação do processo de imobilização e/ou direccionamento do tumor acima descrito é geralmente aplicável a outros tipos de células tumorais e pode ser facilmente adaptado por um perito na arte da biologia dos tumores.

O invento contempla também o uso de dispositivos de distribuição para fornecer as composições terapêuticas deste invento a locais específicos em que a activação de células produtoras da integrina e subsequente promoção da adesão celular é desejada.

Por exemplo, está contemplado um penso para a cicatrização de uma ferida concebido para a distribuição de anticorpos activadores da integrina ao local do trauma do tecido de forma a que quaisquer células que expressam a integrina nas suas superfícies possam ser induzidas localmente para aderirem a ligandos específicos na vizinhança da ferida. Assim, um penso

compreende uma matriz de suporte contendo um meio para reter e libertar uma composição terapêutica deste invento, e o meio de retenção e libertação contém uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição terapêutica num transportador farmaceuticamente aceitável.

Uma matriz de suporte para uso num penso pode ser qualquer um de uma variedade de materiais incluindo uma gaze estéril típica, uma película de rede contínua ou de rede fibrosa, polímeros de hidrogel constituídos por acrilato ou metacrilato de hidroxietilo lineares ou reticulados, ácido acrílico parcialmente neutralizado, linear ou reticulado, e copolímeros destes, de acrilamida ou ésteres de acrilato e semelhantes tal como são bem conhecidos na arte dos hidrocolóides.

Os meios para retenção e libertação de uma composição terapêutica podem ser quaisquer de uma variedade de estruturas ou de composições adaptadas para reter e libertar uma composição terapêutica deste invento na matriz suporte do penso. Estes meios estão bem desenvolvidos na arte da distribuição de drogas e podem ser adaptados para libertação rápida ou lenta do ingrediente activo como desejado, por ajuste de factores tais como a porosidade ou estabilidade da estrutura de retenção, revestimentos e semelhantes. Além disso, os meios podem envolver ligadores, composições de libertação lenta ou rápida tais como vesículas lipossómicas e outros meios hidratados incluindo geles, películas e semelhantes.

As composições terapêuticas preferidas para uso num penso são aquelas que contêm anticorpos activadores da integrina que imunorreagem com a integrina GPIIb-IIIa das plaquetas ou integrinas das células endoteliais aqui descritas.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição terapêutica deste invento no contexto de um penso para feridas depende da aplicação para a qual está adaptada, mas tipicamente é uma quantidade destinada para a distribuição de cerca de 5 nanomoles a 1 micromole de anticorpo por centímetro quadrado de

pele, tecido ou superfície sobre o qual o penso vai ser aplicado.

Tal como usado aqui, os termos "farmaceuticamente aceitável", "fisiologicamente tolerável" e as suas variações gramaticais como as que se referem a composições, transportadores, diluentes e reagentes, são usados como sinónimos e representam os materiais capazes de administração em mamíferos sem a produção de efeitos fisiológicos prejudiciais tais como náusea, tonturas, perturbações gástricas e semelhantes.

Preferencialmente para os processos, in vivo e in vitro, as moléculas de anticorpo estão presentes como uma composição de anticorpo monoclonal e, mais preferencialmente são aqueles produzidos por um dos hibridomas LIBSb, LIBSc, LIBSf ou PMI-2.

As composições contendo moléculas de anticorpo quando formuladas para composições terapêuticas são composições fisiologicamente administráveis e podem tomar a forma de soluções ou suspensões.

O termo "composição fisiologicamente administrável" tal como aqui utilizado refere-se a soluções, suspensões e misturas capazes de vir a ser facilmente proporcionadas ao corpo de um mamífero por administração parenteral, oral ou rectal e inclui soluções injectáveis, emulsões e semelhantes.

A preparação de uma composição terapêutica que contém moléculas de anticorpo como ingredientes activos está bem compreendida na arte. Tipicamente, tais composições são preparadas como injectáveis, seja como soluções líquidas ou suspensões, no entanto também podem ser preparadas formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injecção. A preparação pode ser também emulsionada. O ingrediente terapêutico activo é frequentemente misturado com excipientes que são farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo como é bem conhecido na arte. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Adicionalmente, se desejado, a

composição pode conter quantidades mínimas de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tampão de pH e semelhantes que aumentam a eficiência do ingrediente activo.

Uma composição de uma molécula de anticorpo activador da integrina pode ser formulada numa composição terapêutica em forma de sal neutralizado farmaceuticamente aceitável. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácidos (formados com os grupos amino livres da molécula de anticorpo) que são formados com ácidos inorgânicos tais como por exemplo, ácidos clorídico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tais como acético, tartárico, mandélico e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico, e bases orgânicas, tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína e semelhantes.

As composições terapêuticas contendo moléculas de anticorpo são convencionalmente administradas intravenosamente, tal como por injecção de uma dose unitária, por exemplo. O termo "dose unitária" quando usado com referência a uma composição terapêutica do presente invento refere-se às unidades fisicamente discretas adequadas tais como as dosagens unitárias para humanos, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada de material activo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente requerido, isto é, o transportador ou veículo.

As composições são administradas numa forma compatível com a formulação da dosagem e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada depende do sujeito a ser tratado, e da capacidade do sujeito utilizar o ingrediente activo. As quantidades exactas do ingrediente activo requerido a ser administrado depende do julgamento do médico e são particulares para cada indivíduo. No entanto, as gamas adequadas de dosagem estão na ordem de um a vários miligramas de ingrediente activo

por indivíduo por dia e depende da via de administração. Regimes adequados para administração inicial e injecções de reforço são também variáveis, mas são tipificados por uma administração inicial seguida por doses repetidas em intervalos de uma ou mais horas, por uma injecção subsequente ou outra administração. Alternativamente, está contemplada a infusão intravenosa contínua suficiente para manter concentrações terapeuticamente eficaz no sangue. Concentrações terapeuticamente eficazes no sangue de moléculas de anticorpo do presente invento estão preferencialmente na gama de cerca de 1,0 $\mu$M a cerca de 100 $\mu$M, e mais preferencialmente de cerca de 5 a 10 $\mu$M.

F. Sistemas de Diagnóstico

Um sistema de diagnóstico na forma de conjunto do presente invento, inclui numa quantidade suficiente para pelo menos um ensaio, uma composição contendo moléculas de anticorpo monoclonal ou seus fragmentos do presente invento, como um reagente empacotado separadamente, em conjunto com um marcador que indica a presença de um produto de imunorreacção. As instruções para uso do reagente empacotado são também tipicamente incluídas.

"Instruções para uso" incluem tipicamente uma expressão tangível descrevendo a concentração do reagente ou pelo menos um parâmetro do processo de ensaio tal como as quantidades relativas de reagente e de amostra a serem misturados, os períodos de tempo de manutenção para misturas reagente/amostra, temperatura, condições de tampão e semelhantes.

Numa concretização, um sistema de diagnóstico está contemplado para a determinação da presença e preferencialmente a quantidade, da competência de activação numa integrina e preferencialmente numa integrina quando presente na superfície de uma célula presente numa amostra de fluido vascular, tal como sangue ou plasma. O sistema de diagnóstico compreende uma embalagem contendo moléculas de anticorpo activador da integrina que imunoreagem com uma integrina presente nas referidas células. Preferencialmente as moléculas de anticorpo activador da integrina imunoreagem com a subunidade beta de uma integrina.

Numa concretização preferida para a determinação da competência de activação das plaquetas, as moléculas de anticorpo activador da integrina imunoreagem com a subunidade GPIIIa da proteína de plaquetas GPIIb-IIIa.

Um sistema de diagnóstico do presente invento inclui preferencialmente um marcador ou meios de indicação capazes de sinalizar a formação de um complexo especificamente ligado contendo uma molécula de anticorpo do presente invento.

Tal como usado aqui, os termos "marcador" e "meios de indicação" nas suas várias formas gramaticais referem-se aos átomos simples e moléculas que estejam directa ou indirectamente envolvidos na produção de um sinal detectável que indique a presença de um complexo. Marcadores "in vivo" ou meios de indicação são aqueles que são úteis no âmbito de um sujeito humano e incluem $^{111}In$, $^{99}Tc$, $^{67}Ga$, $^{186}Re$, e $^{132}I$. Qualquer marcador ou meio de indicação pode ser ligado a, ou incorporado numa molécula de anticorpo que é parte de uma composição de anticorpo ou anticorpo monoclonal do presente invento, ou usado separadamente, e esses átomos ou moléculas podem ser utilizadas isoladamente ou em conjunto com reagentes adicionais. Esses marcadores são eles próprios bem conhecidos na química de diagnóstico clínico e constituem uma parte deste invento unicamente na medida em que são utilizados com outros processos e/ou sistemas novos.

A ligação de marcadores, isto é a marcação de polipéptidos e proteínas, é bem conhecida na área. Por exemplo, moléculas de anticorpo produzidas por um hibridoma podem ser marcados por incorporação metabólica de aminoácidos contendo radio-isótopos proporcionados como um componente do meio de cultura. Veja-se por exemplo, Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). As técnicas de conjugação proteica ou acoplamento através de grupos funcionais activados são particularmente aplicáveis. Veja-se por exemplo, Aurameas, et al., Scand. J. Imunol., Vol. 8, supl. 7:7-23 (1978), Rodwell et al., Biotec., 3:889-894 (1984), e Patente U.S. nº 4,493,795.

Os sistemas de diagnóstico incluem, preferencialmente como uma embalagem separada, um agente de ligação específica. Um "agente de ligação específica" é uma entidade molecular capaz de ligar selectivamente uma espécie reagente do presente invento, não sendo por si uma molécula de anticorpo do presente invento. Exemplos de agentes de ligação específica são moléculas de anticorpo, proteínas do complemento ou seus fragmentos, proteína A e semelhantes. Preferencialmente, o agente de ligação específica pode ligar a molécula de anticorpo deste invento quando esta está presente como parte de um complexo activado por integrina.

Em concretizações preferidas o agente de ligação específica é marcado. No entanto, quando o sistema de diagnóstico inclui um agente de ligação específica que não está marcado, o agente é tipicamente utilizado como meio de amplificação ou reagente. Nestas concretizações, o agente de ligação específica marcado é capaz de ligar especificamente o meio de amplificação quando o meio de amplificação está ligado a um complexo contendo uma espécie reagente.

Os conjuntos de diagnóstico do presente invento podem ser utilizados num formato de "ELISA" para detectar, por exemplo, a presença ou quantidade de células competentes para a activação da integrina numa amostra de fluido corporal como soro, plasma ou urina. "ELISA" refere-se a um ensaio de imunosorpção com enzima ligada que emprega um anticorpo ou antigénio ligado a uma fase sólida e um conjugado enzima-antigénio ou enzima-anticorpo para detectar e quantificar a quantidade de um antigénio ou anticorpo presente numa amostra. A descrição da técnica ELISA encontra-se no capítulo 22 da 4ª edição de Basic and Clinical Immunology por D.P. Sites et al., publicado por Lange Medical Publications of Los Altos, CA em 1982 e nas Patentes U.S. nº 3 654 090; nº 3 850 752; e nº 4 016 043, que estão todos aqui incorporados para referência.

Assim, em concretizações preferidas, componente de reagente de anticorpo ou antigénio pode ser fixado a uma matriz sólida

para formar um suporte sólido que é empacotado separadamente nos presentes sistemas de diagnóstico.

O reagente é tipicamente fixado à matriz sólida por adsorção de um meio aquoso, muito embora outros modos de fixação, bem conhecidos pelos peritos na arte, possam ser usados.

As matrizes sólidas úteis são bem conhecidas na arte. Tais materiais incluem o dextrano reticulado disponível sob a marca registada SEPHADEX da Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ); agarose; esferas de poliestireno de cerca de 1 micron até 5 milímetros de diâmetro disponíveis em Abbott Laboratories of North Chicago, IL; poli(cloreto de vinilo), poliestireno, poliacrilamida reticulada, teias com base em nitrocelulose ou nylon, tais como, folhas, tiras, ou pás; ou tubos, placas ou os alvéolos de uma microplaca como aquelas fabricadas com poliestireno ou poli(cloreto de vinilo).

A espécie reagente, agente de ligação específico marcado ou reagente de amplificação de qualquer sistema de diagnóstico aqui descrito pode ser fornecido em solução, como uma dispersão líquida ou como um pó substancialmente seco, por exemplo na forma liofilizada. Quando o meio indicador é uma enzima, o substrato da enzima pode também ser fornecido numa embalagem separada de um sistema. Um suporte sólido como a placa de microtitulação anteriormente descrita e um ou mais tampões podem também ser incluídos como elementos embalados em separado neste sistema de ensaio de diagnóstico.

As embalagens aqui discutidas em relação aos sistemas de diagnóstico são aquelas normalmente utilizadas em sistemas de diagnóstico. Tais embalagens incluem garrafas, frascos de vidro ou de plástico (por exemplo, polietileno, polipropileno e policarbonato) e envelopes de plástico e laminados de plástico com folha metálica e semelhantes.

F. <u>Processos de Ensaio</u>

O presente invento contempla qualquer processo que resulte

na determinação da competência de activação em células com integrinas de superfície celular. Preferencialmente o processo permite a determinação da presença, e se desejado, do grau de competência, de forma que a competência de activação de uma célula completa fornece dados comparativos significativos em relação a células controlo relacionadas. O grau de competência é medido pela determinação da quantidade de integrina activada na célula a ser ensaiada pelos processos de diagnóstico.

Células que expressam integrinas de superfície participam numa varieddade de processos celulares dependendo da capacidade da integrina da superfície celular se tornar activada, isto é, de exibir afinidade de ligação aumentada para o ligando. Os presentes processos são úteis para detectar eficiências na competência de activação medindo directamente a capacidade da proteína da integrina para se tornar activada.

Os processos para determinar a competência de activação de células contendo integrina de superfície celular envolvem, geralmente, a mistura de uma amostra de células num fluido fisiológico com uma quantidade activadora de anticorpos activadores da integrina deste invento para formar uma mistura de activação. Seguidamente, a mistura de activação é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período suficiente para permitir que a referida integrina de superfície celular imunorreaja com os anticorpos misturados e forme um imunocomplexo de integrina activada na superfície das células. A presença, e preferencialmente a quantidade, do imunocomplexo de integrina activada formado é então determinado para indicar a presença, e preferencialmente o grau de competência de activação na célula.

Uma variedade de processos para detectar o imunocomplexo de integrina activada pode ser empregue para determinar o produto formado, se algum se tiver formado. Exemplo disso são os processos descritos no Exemplo 10 envolvendo a ligação de um ligando específico para a activação. Um ligando específico para a activação pode ser um ligando marcado que normalmente liga a integrina quando activado mas não liga substancialmente ligandos

não activados (em repouso). Exemplo disso é o $^{125}$I-fibrinogénio utilizado no Exemplo 10 para medir a activação de plaquetas. Alternativamente, um ligando específico para a activação pode ser uma molécula de anticorpo que imunorreage com a integrina quando activada mas não imunorreage substancialmente quando se encontra presente em estado de repouso.

No ensaio de diagnóstico acima citado, um processo preferido de ensaio para a presença do imunocomplexo da integrina activada compreende os passos de mistura do imunocomplexo de integrina activada com um ligando específico para a activação para formar uma mistura de ligação, manutenção da mistura de ligação durante um período de tempo pré-determinado suficiente para se ligar ao imunocomplexo e formar um produto de reacção de ligação e detecção do produto de ligação formado e assim da presença do imunocomplexo de integrina activada.

Em concretizações preferidas, as células a ensaiar são plaquetas, e o anticorpo activador da integrina imunorreage com a proteína plaquetária GPIIb-IIIa. Um processo particularmente preferido mede a competência de activação das plaquetas usando um anticorpo activador da integrina anti-subunidade beta imunorreactivo com a subunidade GPIIIa como descrito no Exemplo 10.

Os peritos na arte compreenderão que existem numerosos processos químicos de diagnóstico clínico bem conhecidos que podem ser utilizados para formar imunocomplexos detectáveis. Assim, embora alguns métodos de ensaio sejam aqui descritos a título de exemplo, o invento não está a eles limitado.

As condições de ensaio biológico são aquelas que mantêm a actividade biológica das moléculas de anticorpo deste invento e as células que expressam integrina na sua superfície que são suscptíveis de serem ensaiadas. Estas condições incluem um leque de temperaturas de cerca de 4 graus (4°C) até cerca de 45°C, preferencialmente cerca de 37°C, a uma gama de valores de pH de cerca de 5 até cerca de 9, preferencialmente a cerca de 7, e uma

força iónica variando desde a da água destilada até à de cloreto de sódio um molar, preferencialmente próxima da da solução salina fisiológica. Os processos para optimização destas condições são bem conhecidos na arte.

Exemplos

Os exemplos que se seguem são dados apenas para fins ilustrativos e não limitam de forma alguma o âmbito do invento.

1. Isolamento de GPIIb-IIIa

A. Isolamento de plaquetas

Sessenta mililitros (ml) de sangue humano completo foram colhidos em 5 ml de ACD (ácido cítrico 0,065M, citrato de sódio 0,085 M, 2% de dextrose) contendo hirudina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a uma concentração final de 0,06 unidades por mililitro (U/ml) e foram centrifugados durante 15 minutos a 120 x g. O sobrenadante resultante, designado plasma rico em plaquetas (PRP), foi recuperado, isolado e posteriormente centrifugado durante 15 minutos a 120 x g de modo a formar um precipitado de plaquetas isoladas. O sobrenadante formado é recolhido e utilizado em outros ensaios como plasma empobrecido em plaquetas.

B. Isolamento de GPIIb-IIIa a partir de plaquetas

Uma pelota de plaquetas preparada como no Exemplo 1A, foi ressuspensa em 5 ml de TBS (NaCl 0,15 M, Tris 0,2 M, pH 7,4, $CaCl_2$ 0,5 mM, leupeptina 0,01 mM) e sonicado em gelo durante 10 minutos na posição máxima utilizando um sonicador Modelo W-375 (Heat Systems Ultrasonics, Plainview, NY). A suspenssão sonicada foi congelada e descongelada por duas vezes utilizando um banho de gelo seco-metanol e armazenada a menos 20°C. O sonicado de plaquetas congelado-descongelado foi colocado no topo de 5 ml de uma solução de sacarose (40% v/v em TBS) e centrifugado a 4°C, durante uma hora, a 38000 rotações por minuto (RPM), num rotor de centrífuga SW41 (Beckman Instruments, Fullerton, CA), de modo a formar um infranadante de cor leitosa. O infranadante leitoso foi então recuperado e centrifugado a 43000 RPM num rotor de centrífuga SW50.1 (Beckman) a 4°C durante uma hora. A pelota resultante foi ressuspensa tipicamente em 1-2 ml de TBS de modo a

formar uma solução de membranas de plaquetas, da qual foi determinada a concentração proteica que se encontrava no intervalo de 10-25 mg/ml, utilizando o conjunto de doseamento proteico de Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

A solução de membranas de plaquetas foi novamente centrifugada num rotor de centrífuga SW50,1 tal como anteriormente, e a pelota resultante foi ressuspensa em 2 ml de tampão de extracção ( Tris 0,03M, pH 7,4, leupeptina 0,01 mM, n-octil-beta-D-glucopiranosido 200mM; Calbiochem-Behring, La Jolla, CA). O extracto de membranas de plaquetas assim formado foi bem misturado por vórtex e depois mantido a temperatura ambiente durante 30 minutos. O extracto foi, depois, centrifugado a 45000 RPM num rotor de centrifuga SW50.1, durante uma hora a 4°C e o sobrenadante do extracto de membranas de plaquetas assim formado foi recuperado.

O sobrenadante recuperado foi aplicado a uma coluna de filtração em gel Ultrogel Aca 34 da LKB (3 x 97 cm, LKB Instruments, Gaithersburg, MD), que tinha sido equilibrada com um litro de tampão de coluna (Tris 0,03M, pH 7,4, $CaCl_2$ 0,1 mM, 0,1% de n-octil-beta-D-glucopiranosido), e foram recolhidas fracções de 5 ml a partir do efluente resultante da coluna. A densidade óptica de cada fracção a 280 nanometros foi determinada e as fracções próximas dos vários picos foram combinadas de modo a formar uma mistura para cada pico. Amostras de cada mistura foram analisadas por electroforese em placas de geles de poliacrilamida a 6%, utilizando os tampões redutores e os procedimentos descritos por Laemmli, Nature (London), 227: 680-685 (1970), e padrões proteicos de baixa massa molecular com dimensões que variam entre 14,4 kilodaltons (KDa) e 92,5 KDa (Bio-Rad, Richmond, CA). A mistura contendo predominantemente duas espécies proteicas com massas moleculares correspondentes a GPIIb e GPIIIa, i.e. 120 KDa e 100 KDa respectivamente, foi recuperada. A concentração proteica da preparação de GPIIb-IIIa isolada assim preparada foi determinada tipicamente utilizando os conjuntos Bio-Rad Protein Assay Kit, como estando na gama de 0,3 a 0,8 mg/ml.

C. Isolamento por afinidade polipeptídica de GPIIb-IIIa

A síntese do péptido com a fórmula Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro--Lys foi efectuada utilizando a técnica de Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-54 (1963) ou foi adquirido a Peninsula Laboratories (Belmont, CA). Todos os péptidos possuíam mais que 90% de homogeneidade quando analisados por cromatografia líquida de elevado rendimento (HPLC), utilizando uma coluna bondapak $C_{18}$ e um gradiente linear de 0-60% de acetonitrilo em ácido trifluoroacético a 0,1%. As matrizes de afinidade contendo o péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys imobilizado foram preparadas por acoplamento do péptido a Sepharose 4B (Pharmacia P-L Biochemicals, Piscataway, NJ) activada com brometo de cianogénio, de acordo com as instruções do fabricante. A matriz de afinidade contendo o péptido imobilizado foi empacotada nas colunas (0,7 x 15 cm) e equilibrada com PBS a pH 7,5 contendo octilglucósido 50 mM, fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF) 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM e $MgCl_2$ 1 mM, a 4°C. O sobrenadante do extracto de membranas de plaquetas preparado de acordo com o Exemplo 1B foi aplicado à matriz de afinidade contendo Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys. As proteínas que não se ligaram foram eluídas com 100 ml de PBS a pH 7,5, contendo octilglucosido 25 mM, PMSF 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM e $MgCl_2$ 1 mM (tampão de coluna). A GPIIb-IIIa ligada foi então eluída por lavagem da coluna com 10 ml de tampão de coluna contendo o péptido designado numa concentração de 1,7 mM, seguida por outra com 10 ml de tampão de coluna. Recolheram-se fracções de 2,5 ml e as proteínas de cada fracção foram analisadas por electroforese em geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (7,5%), após redução com 2-mercaptoetanol a 10%. As bandas proteicas foram visualizadas por coloração com azul de Coomassie, de acordo com os métodos descritos em Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, NY, 1987.

D. Isolamento por Imunoafinidade de GPIIb-IIIa

Uma coluna de imunoafinidade foi preparada por acoplamento do anticorpo PMI-1 (que se liga a GPIIb, ATCC, Rockville, MD) a Affi-Gel 10 (Biorad, Richmond, CA), a 4 mg de anticorpo por ml de resina, utilizando as instruções fornecidas pelo fabricante da

resina activada. As plaquetas preparadas de acordo com o Exemplo 1A ($6 \times 10^{10}$) foram lisadas em 1 ml de octilglucósido 50 mM num tampão de coluna consistindo em N-[2-hidroxietil] piperazina-N-[ácido 2'etanosulfónico] 10 mM (HEPES), $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 0,15M, 1 mg/ml de fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF), 1,25 mg/ml de N-etil-maleimida e 0,1 mg/ml de leupeptina. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 45000 RPM, num rotor SW 50.1, durante uma hora a 4 °C. O sobrenadante, designado como lisado de plaquetas, foi recolhido, o péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (GRGDSP) foi adicionado para 1 mM, e depois foi misturado com 2 ml de anticorpo-Affi-Gel 10 e mantido durante 12 a 18 horas a 4 °C. Esta mistura foi então colocada numa coluna e lavada com 10 volumes da coluna de tampão de coluna contendo o péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro 1 mM e octilglucósido 25 mM, e eluída com cinco volumes da coluna de tampão de coluna a pH 5 contendo octilglucósido 25 mM, e sem péptido. As fracções eluídas foram imediatamente neutralizadas a pH 7,2, misturadas e dialisadas contra tampão de coluna contendo octilglucósido 5 mM. A concentração proteica da preparação de GPIIb-IIIa isolada assim preparada foi determinada utilizando o conjunto Bio-Rad Protein Assay Kit.

2. Preparação de Composições de Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais que activam GPIIb-IIIa e imunorreagem com um local de ligação induzido por ligando em GPIIb-IIIa foram produzidos utilizando a usual tecnologia do hibridoma, com as excepções referidas. Resumidamente, dois ratinhos Balb/c foram cada um, imunizados intraperitonealmente quatro vezes, com intervalos de uma semana, com doses crescentes (1 μg, 10 μg, 25 μg, 50 μg e 100 μg, respectivamente) de imunogénio consistindo no complexo receptor-ligando compreendendo GPIIb-IIIa isolado por afinidade, tal como preparado no Exemplo 1C (1,25 mg/ml) e o péptido Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro a 3 mg/ml. O imunogénio foi diluído 1:1 em adjuvante de Freund completo para a primeira imunização, em adjuvante de Freund incompleto para a segunda e terceira imunização e em solução salina normal para a quarta. Três dias após a quarta imunização cerca de $1 \times 10^8$ linfócitos foram isolados a partir do baço de ambos os ratinhos,

misturados numa suspensão e fundidos com 5 x $10^7$ células de mieloma de ratinho P3X63AG8.053, utilizando 50% de PEG 1500 como o promotor da fusão celular. As células transformadas (fundidas) resultantes produtoras de anticorpo (hibridomas) foram inicialmente transferidas para placas de microtitulação de 96 alvéolos a uma densidade de cerca de 1 x $10^6$ células por alvéolo e cultivadas em meio HAT selectivo.

Os sobrenadantes da cultura de tecidos de cerca de 2000 alvéolos, parecendo conter células viáveis de hibridoma resistentes a HAT após 8 dias de cultura, foram seleccionados num ensaio de ELISA descrito no Exemplo 3A para a presença de moléculas de anticorpo que imunorreagem com GPIIb-IIIa imobilizado em plástico. Foram identificadas cerca de 44 culturas de hibridoma que produziam moléculas de anticorpo que imunorreagem com GPIIb-IIIa. Os hibridomas isolados foram então subclonados duas vezes a diluições limitantes, de modo a proporcionar cerca de uma célula por alvéolo. Vinte e quatro das culturas de hibridoma resultantes mostraram ser de origem monoclonal com base em três critérios: (1) cada sobrenadante resultou de um único foco celular e imunorreagiu com GPIIb-IIIa num ensaio de ELISA, (2) cada sobrenadante apresentou uma única banda homogénea quando analisado por electroforese em gel de acetato de celulose de acordo com o método descrito em Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, J. W. Goding, ed., Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 1983, e (3) cada sobrenadante continha apenas um único isotipo de imunoglobulina quando analisado utilizando o conjunto de selecção e determinação de isotipos de Ig de ratinho, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, Boehringer-Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana. Os resultados da análise de isotipos de alguns dos sobrenadantes de hibridomas caracterizados são apresentados na Tabela 1.

(segue Tabela 1)

TABELA 1

Modulação Pelo GRGDSP da Expressão de Epitopos de LIBS em ELISA Para Identificação de Anticorpos Monoclonais Anti-LIBS

| Mab | Especificidade de subunidade[a] | Isotipo | $B/B_0$[b] - | $B/B_0$[b] + | % de Decréscimo[c] |
|---|---|---|---|---|---|
| LIBSa | GPIIIa | $G_1K$ | 0,61 | 0,32 | 48 |
| LIBSb | GPIIIa | $G_{2a}K$ | 0,62 | 0,35 | 44 |
| LIBSc | GPIIIa | $G_1K$ | 0,45 | 0,21 | 53 |
| LIBSd | GPIIIa | $G_{2b}K$ | 0,79 | 0,62 | 22 |
| LIBSe | GPIIIa | $G_1K$ | 0,82 | 0,52 | 37 |
| LIBSf | GPIIIa | ND[d] | 0,29 | 0,17 | 41 |
| LIBSg | GPIIIa | ND | 0,64 | 0,51 | 20 |
| LIBSh | GPIIIa | $G_{2a}K$ | 0,38 | 0,28 | 26 |
| LIBSi | GPIIIa | $G_{2a}K$ | 0,22 | 0,17 | 23 |
| PMI-2[e] | GPIIIa | $G_{2a}K$ | 0,58 | 0,46 | 21 |
| Mab15 | GPIIIa | $G_1K$ | 0,25 | 0,23 | 8 |
| Mab19 | GPIIIa | MK | 0,32 | 0,32 | 0 |
| Mab23 | GPIIIa | $G_{2a}K$ | 0,17 | 0,15 | 12 |
| LIBSj | hGPIIb | MK | 0,90 | 0,70 | 22 |
| PMI-1[e] | hGPIIb | $G_{2b}K$ | 0,98 | 0,36 | 63 |
| Mab13 | hGPIIb | $G_1K$ | 0,61 | 0,51 | 16 |
| Mab10 | hGPIIb | $G_1K$ | 0,84 | 0,79 | 6 |
| Mab18 | lGPIIb | MK | 0,40 | 0,34 | 15 |
| Mab16 | lGPIIb | MK | 0,54 | 0,47 | 13 |
| Mab5 | lGPIIb | MK | 0,66 | 0,64 | 3 |
| LIBSk | | $G_1K$ | 0,80 | 0,59 | 26 |
| Mab38 | | $G_1K$ | 0,82 | 0,69 | 16 |
| Mab51 | | ND | 0,76 | 0,73 | 4 |
| LIBSm | | MK | 0,39 | 0,54 | -38 |

[a] A especificidade de subunidade foi determinada por transferência de Western tal como descrito no Exemplo 2.

[b] $B/B_0$ indica a razão entre absorvância medida a A490 na presença de lisado de plaquetas (B) (equivalente a $5 \times 10^8$ plaquetas/ml) e a absorvância medida a A490 na ausência de lisado ($B_0$). A razão $B/B_0$ foi determinada tanto na presença (+) de GRGDSP (1 mM) como na ausência (-) de GRGDSP.

[c] A alteração em $B/B_0$ após adição de GRGDSP indica a presença de um LIBS. Os anticorpos foram considerados como sendo anti-LIBS se a percentagem de alteração em $B/B_0$ era superior a 20%.

[d] ND = Não determinado

[e] PMI-1 e PMI-2 foram produzidos em imunizações e fusões separadas, utilizando membranas de plaquetas como imunogénio, tal como é descrito por Shadle et al., J. Cell Biol., 99:2056-60 (1984), e foram seleccionados quanto à actividade anti-LIBBS tal como é aqui descrito.

O procedimento de selecção acima descrito resultou na identificação de 22 hibridomas que produzem moléculas de anticorpo que imunoreagem com GPIIb-IIIa imobilizada em plástico.

Para identificar os hibridomas que produzem moléculas de anticorpo que imunoreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando (LIBS) em GPIIb-IIIa (i.e., um LIBS de GPIIb-GPIIIa), foi efectuada uma selecção com base num ensaio de ELISA de competição, tal como é descrita no Exemplo 3B aqui discutido, na qual a mistura de imunoreacção foi mantida na presença e na ausência de de um ligando específico de GPIIb-GPIIIa para expressar um LIBS de GPIIb-IIIa. Moléculas de anticorpo anti-LIBS de GPIIb-IIIa são aquelas que exibem uma maior afinidade de imunoreacção com GPIIb-IIIa, quando medida na presença de um ligando específico de GPIIb-IIIa em comparação com a medida na ausência do ligando específico, de tal modo que o aumento de afinidade representa uma alteração na razão de absorvância a 490 nm ($B/B_0$) maior do que 20% quando medida na presença (em comparação com a ausência) do ligando específico de GPIIb-IIIa.

Doze hibridomas foram identificados a partir do grupo de vinte e dois hibridomas da Tabela 1, que produzem moléculas de anticorpo que imunoreagem com LIBS de GPIIb-IIIa, e os hibridomas são aqui designados como LIBSa-LIBSm, tal como na Tabela 1.

Adicionalmente, observa-se que outras moléculas de anticorpo anti-LIBS foram isoladas por métodos descritos, tal como é mostrado na Tabela 1, que imunoreagem com outros epitopos LIBS presentes nas subunidades GPIIb ou GPIIIa do receptor das plaquetas.

Para identificar os hibridomas que produzem anticorpos monoclonais activadores da integrina, que imunoreagem com a integrina GPIIb-IIIa e activam a integrina de tal modo que a afinidade para o ligando é aumentada, um ensaio de activação foi utilizado tal como para a selecção dos Mabs na Tabela 1. Duas permutações do ensaio de activação são descritas no Exemplo 10 e envolvem a medida da capacidade de um anticorpo activador putativo para aumentar a capacidade de ligação do GPIIb-IIIa a PAC1, um anticorpo de activação específico, ou a fibrinogéneo, respectivamente.

Anticorpos monoclonais de activação foram inicialmente identificados utilizando o ensaio de ligação a PAC1, e incluem LIBSb (também referido como Ab62), LIBSc, LIBSf e PMI-2. Estes anticorpos foram considerados como tendo actividade de activação da integrina, devido a aumentarem a ligação FITC-PAC1 a plaquetas e induzirem um desvio na intensidade média de fluorescência celular média (MCFI) maior do que três vezes a MCFI, quando expressa em unidades arbitrárias de intensidade de fluorescência.

Todos os anticorpos de activação aqui identificados, incluindo o P41 descrito no Exemplo 10, mostraram também possuir imunoreactividade anti-LIBS.

Particularmente preferidos são os anticorpos que exibem uma afinidade aumentada para a imunoreacção com um epitopo LIBS, tal como é detectado na Tabela 1. Estes são os anticorpos que exibem

uma alteração em $B/B_0$ maior do que 25%, preferencialmente 30% e mais preferencialmente 40%, após a adição do ligando específico.

As localizações do LIBS particular de GPIIb-IIIa, detectadas pelos anticorpos monoclonais apresentados na Tabela 1, foram mapeadas em regiões das subunidades do receptor das plaquetas por imunotransferência de Western, de acordo com os métodos gerais descritos por Tobwin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76:4350-54, (1979). Resumidamente, a GPIIb-IIIa isolada no Exemplo 1B foi submetida a electroforese em geles de SDS-poliacrilamida a 7,5% (SDS-PAGE), em condições de redução, transferida para uma membrana e feita imunorreagir com sobrenadantes dos hibridomas apresentados na Tabela 1. Os produtos de imunorreacção, formados entre os anticorpos monoclonais presentes nos sobrenadantes dos hibridomas e as subunidades da proteína GPIIb-IIIa nas membranas, foram detectados utilizando um segundo anticorpo biotinado e peroxidase conjugada com avidina, de acordo com as instruções do fabricante (Vectastain ABC Method, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Os resultados do mapeamento por imunotransferência de Western mostraram que a maioria dos sobrenadantes dos hibridomas continha moléculas de anticorpo que imunorreagiam com uma proteína que possuía uma massa molecular aparente em SDS-PAGE de 120 kilodaltons (KDa), 20 KDa ou 100 KDa, correspondendo à cadeia pesada de GPIIb (hGPIIb), à cadeia leve de GPIIb (lGPIIb) ou à GPIIIa, respectivamente. Em alguns casos, as moléculas de anticorpo não reagiram com nenhuma das subunidades de GPIIb-IIIa isoladas, deixando a sua especificidade de subunidade por caracterizar. As especificidades de subunidade determinadas são apresentadas na Tabela 1.

É assim observado, por exemplo, que a molécula de anticorpo produzida pelo hibridoma LIBSa, cuja molécula de anticorpo é também aqui referida como LIBSa, imunorreage com a subunidade GPIIIa do receptor GPIIb-IIIa das plaquetas. Adicionalmente, a molécula de anticorpo LIBSa imunorreage com o epitopo LIBS1 presente num complexo receptor-ligando compreendendo GPIIb-IIIa e um

um ligando específico de GPIIb-IIIa.

Foram também preparadas composições de anticorpo monoclonal, constituídas por moléculas de anticorpo isoladas, por isolamento de moléculas de anticorpo a partir de fluido ascítico de um ratinho contendo uma das linhas celulares de hibridoma apresentadas na Tabela 1, utilizando proteína A-Sepharose, obtida tipicamente em Pharmacia Inc. (Piscataway, NJ) e utilizada de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração proteica das composições de moléculas de anticorpo isoladas foi determinada utilizando o conjunto Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Richmond, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

Para preparar uma composição de anticorpo monoclonal contendo moléculas de anticorpo marcadas com $^{125}I$, 350 microlitros ($\mu$l) de PBS (NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01M, pH 7,09) contendo 1 miligrama por mililitro (mg/ml) das moléculas de anticorpo isoladas acima, foram misturados com 40 microgramas ($\mu$g) de cloramina-T e 1 miliCurie (mCi) de $Na^{125}I$ isento de transportador (Amersham, Arlington Heights, IL). A mistura resultante foi mantida durante 5 minutos a cerca de 20 °C e depois misturada com 20 $\mu$l de uma solução de metabissulfito de sódio (2 mg/ml) e 20 $\mu$l de uma solução de iodeto de potássio. De seguida, 800 $\mu$l de PBS contendo 1% de BSA foram misturados, seguindo-se uma nova mistura com diisopropilfluorfosfato para uma concentração final de 10 mM. A mistura resultante foi mantida durante 60 minutos a 22°C e depois dialisada contra PBS. A actividade específica das moléculas de anticorpo marcadas com $^{125}I$ resultantes era de cerca de 4,5 microCurie ($\mu$Ci) por $\mu$g.

Foram preparadas composições contendo fragmentos Fab das moléculas de anticorpo isoladas acima por digestão com papaína (200:1, peso por peso de Ig para papaína), durante 6 horas a 37 °C, seguindo os métodos de Mage et al., Methods in Enzymology, 70:142-150 (1980). Os fragmentos Fc e Ig não digeridos foram removidos por cromatografia em proteína

A-Sepharose. As composições resultantes contendo os fragmentos Fab estavam então prontas para ser utilizadas ou para serem marcadas com $^{125}I$, se necessário, utilizando os mesmos procedimentos descritos acima para as composições de anticorpos monoclonais.

3. Ensaios de ELISA

A. ELISA Para Seleccionar Anticorpos Monoclonais As moléculas de anticorpo contidas nos sobrenadantes das culturas de hibridomas foram examinadas quanto à sua capacidade para imunorreagirem com GPIIb-IIIa imobilizadas em plástico. Cinquenta microlitros (ul) da solução de revestimento ( $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,0, 0,1% de $NaN_3$) contendo 10 µg/ml de GPIIb-IIIa isolada, preparada como no Exemplo 1B, foram misturadas nos alvéolos de fundo plano de placas de microtitulação de 96 alvéolos (Immulon 2; Dynatech Laboratories, Chantilly, VA). As placas foram então mantidas durante 60 minutos, a 37°C, de modo a permitir a adsorção de GPIIb-IIIa nas paredes dos alvéolos. A solução de revestimento foi removida por agitação, os alvéolos foram lavados por duas vezes com tampão de lavagem (Tris 10 mM a pH 7,4, 0,05% (v/v) de TWEEN-20, NaCl 0,15 M e 200 mg/ml de mertiolato) e 200 µl de solução de bloqueamento [5% de albumina de soro bovino (BSA; p/v) na solução de revestimento] foram misturados em cada alvéolo (suporte sólido) para bloquear o excesso de locais proteicos.

Os alvéolos foram mantidos durante 60 minutos a cerca de 37°C e depois a solução de bloqeamento foi removida. Adicionou-se a cada alvéolo cerca de 50 µl do sobrenadante da cultura de hibridoma, diluído 1:1 no tampão de diluição consistindo em 0,1% (p/v) de BSA em tampão de lavagem de modo a formar uma mistura de imunorreacção. As misturas de imunorreacção de fase sólida/líquida resultantes foram mantidas à temperatura ambiente durante 60 minutos, para permitir a formação de um primeiro produto de imunorreacção, ligado à fase sólida, entre o complexo GPIIb-IIIa-ligando ligado a fase sólida e os anticorpos misturados. As fases sólida e líquida foram, então, separadas, os alvéolos lavados por duas vezes com tampão de lavagem e o líquido

em excesso removido por agitação.

Adicionaram-se a cada alvéolo cinquenta µl de uma solução contendo um IgG de cabra anti-ratinho marcada com peroxidase de rábano (Tago Inc., Burlingame, CA), diluído 1:1000 em tampão de diluição, de modo a formar uma segunda mistura de imunorreacção de fase sólida/líquida (mistura de imunorreacção marcadora). Os alvéolos foram mantidos durante 60 minutos à temperatura ambiente, para permitir a formação de um segundo produto de imunorreacção entre o anticorpo marcado e qualquer anticorpo da primeira imunorreacção ligado à fase sólida, e foram depois lavados por duas vezes com tampão de lavagem para isolar os produtos de imunorreacção marcados ligados à fase sólida. O líquido em excesso foi então removido dos alvéolos.

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

Consideram-se que as composições de moléculas de anticorpo continham moléculas de anticorpo imunorreactivo anti-GPIIb-IIIa se a absorvância medida a 490 nm (A490) era pelo menos seis vezes superior à absorvância do fundo, isto é, acima de cerca de 0,3 unidades de densidade óptica quando medida a A490.

B. ELISA De Competição Para Detectar Anticorpos Anti--LIBS

As moléculas de anticorpo contidas em composições de anticorpo foram examinadas quanto à sua capacidade para

imunorreagirem com LIBS de GPIIb-IIIa num ELISA de competição, efectuado de um modo semelhante ao ELISA descrito no Exemplo 3A com as seguintes excepções.

Antes de uma composição de anticorpo ser adicionada a alvéolos de microtitulação revestidos com GPIIb-IIIa, adicionou-se a cada alvéolo 20 µl de tampão de ensaio de ELISA consistindo em Tris-HCl 10 mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, 0,05% (v/v) de TWEEN-20, 0,02% (p/v) de mertiolato de sódio, $CaCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM e 0,1% (p/v) de BSA. Seguidamente foram adicionados 10 µl de uma solução contendo lisado de plaquetas a 2 x $10^7$ plaquetas por ml, preparadas como no Exemplo 1D, a um conjunto de alvéolos e o lisado de plaquetas foi omitido num segundo conjunto de alvéolos. A ambos os conjuntos, com e sem lisado de plaquetas, foram adicionados 10 µl de uma segunda solução que continha 0 ou 5 mM do ligando polipeptídico GRGDSP contendo RGD no tampão de ensaio de ELISA. De seguida, foram adicionados 10 µl de uma composição de anticorpo a 0,3 µg/ml a ambos os conjuntos de alvéolos, numa concentração de anticorpo diluída em tampão de ensaio de ELISA de modo a este ser o componente limitante na mistura de imunoreacção de ELISA. As concentrações de anticorpo apresentam-se como um componente limitante quando foram diluidos em tampão de ensaio de ELISA de modo a produzir uma densidade óptica a A490 de cerca de 1,0, quando medidos utilizando o ensaio de ELISA do Exemplo 3A, com a excepção de que é utilizado o tampão de ensaio de ELISA em vez do tampão de diluição.

Os resultados obtidos em cada mistura de imunorreacção foram medidos quanto à presença de uma reacção de desenvolvimento de cor como acima referido. A absorvância medida nos alvéolos que não continham lisado de plaquetas é referida como $B_0$, e a absorvância medida nos alvéolos que continham lisado de plaquetas é referida como B. A razão das absorvâncias é calculada para $B/B_0$ e expressa como medida na presença (+) ou na ausência (-) de ligando contendo RGD (GRGDSP). A expressão de uma determinante antigénica críptica de LIBS é determinada através do cálculo da diminuição da percentagem observada em $B/B_0$ quando o ligando é adicionado a GPIIb-IIIa contida no lisado de plaquetas na mistura

de imunorreacção. Uma diminuição em $B/B_0$ que exceda os 20% após a adição do ligando, indica uma molécula de anticorpo que imunorreage com um epitopo de LIBS. A Tabela 1 apresenta os resultados de ELISA de competição para moléculas de anticorpo monoclonais, preparadas no Exemplo 2, que imunorreagem com GPIIb-IIIa.

4. Expressão das Determinantes Crípticas de GPIIIa por Plaquetas Ligadas a Fibrinogénio

Preparou-se plasma rico em plaquetas (PRP) como no Exemplo 1A e dividiu-se em duas alíquotas. Numa das alíquotas, as plaquetas foram estimuladas para expressar GPIIb-IIIa funcional (receptores de fibrinogénio), por mistura de adenosina-difosfato (ADP) a uma concentração final de 10 $\mu$M, de modo a produzir plaquetas estimuladas por ADP. Como controlo negativo, a segunda alíquota de PRP não recebeu estímulo de modo a produzir plaquetas não estimuladas.

Fragmentos Fab de LIBSa (anti-Libs1) marcado com $^{125}I$, preparados através das técnicas usuais a partir de anticorpos marcados com $^{125}I$, descritas no Exemplo 2, foram então misturados para uma concentração final de 0,8 $\mu$M com várias amostras de cada uma das alíquotas de PRP, na presença de várias concentrações de fibrinogénio. As misturas de imunorreacção assim formadas foram mantidas a 37°C durante 30 minutos, de modo a permitir a formação de produtos de imunorreacção marcados, isto é, complexos plaquetas ligadas a fibrinogénio $^{125}I$anti-LIBS1. Os produtos de imunorreacção marcados foram então separados dos anti-LIBS1 marcados com $^{125}I$ não ligados, por centrifugação das plaquetas através de uma almofada de sacarose 0,3 ml de sacarose a 20%, numa centrífuga Beckman Microfuge B (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA), de modo a formar uma pelota de plaquetas. A quantidade de anti-LIBS1 marcado com $^{125}I$ associado ao precipitado foi então determinada por contagem gama.

A Figura 1 ilustra os resultados deste estudo e põe em evidência que as moléculas de anticorpo anti-LIBS1 imunorreagem com plaquetas estimuladas, ligadas a fibrinogénio, mas não

imunorreagem substancialmente com plaquetas não estimuladas. Pensa-se que os anti-LIBS1 marcados com $^{125}I$, observados como "ligados" na alíquota PRP não estimulada, sejam devidos a uma ligação não-específica ("colagem") e/ou à presença de um nível de fundo de ocorrência natural de plaquetas estimuladas, ligadas a fibrinogénio, ou a plaquetas estimuladas e ligadas como resultado do manuseamento. A concentração de fibrinogéneo, requerida para o aumento para metade do máximo de ligação de anti-LIBS1, foi cerca de 0,7 $\mu$M, que é aproximadamente o $K_d$ para a ligação do fibrinogénio ás plaquetas. Deste modo, estes resultados indicam que a ligação de fibrinogénio, um ligando contendo a sequência de resíduos de aminoácido Arg-Gly-Asp (RGD), pela citoadesina GPIIb-IIIa resulta na expressão de uma outra determinante antigénica críptica. Assim, as moléculas de anticorpo anti-LIBS1 e as moléculas de anticorpo de imunoespecificidade semelhante, podem ser utilizadas para ensaiar a presença e quantidade de plaquetas estimuladas, ligadas a fibrinogénio, numa amostra de fluido vascular.

5. Expressão de Determinantes Antigénicos Crípticos GPIIb-IIIa por Ligação ao Ligando

A. Ensaio Para a Ligação de Anticorpos a Plaquetas que Expressam Determinantes Antigénicos Crípticos por Mistura

Isolaram-se plaquetas lavadas tal como é descrito no Exemplo 1A e ressuspenderam-se em 2 ml de tampão Tyrode sem cálcio (NaCl 0,13 M, KCl 0,0026M, $MgCl_2.6H_2O$ 0,002 M, Hepes 5 mM, $NaHCO_3$ 0,012 M, pH 7,2), que foi previamente tratado por mistura com Chelex 100 (forma sódio 200-400 mesh Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), mantido para complexar qualquer catião divalente presente no tampão Tyrode e filtrado para remover do tampão os catiões divalentes complexados. A suspensão de plaquetas foi então aplicada a uma coluna de Sepharose CL2B (40 ml de volume total de leito, Pharmacia, Inc., Piscataway, NJ) equilibrada com o mesmo tampão Tyrode. As plaquetas foram recuperadas no volume de vazios da coluna em 4 a 5 ml. As plaquetas lavadas foram, então, ressuspensas a uma concentração de 1 x $10^8$ por ml, no mesmo tampão Tyrode. A solução de plaquetas lavadas, acima preparadas,

foi então dividida em alíquotas. As composições de anticorpo monoclonal, contendo várias concentrações de moléculas de anticorpo de LIBSa marcados com $^{125}I$ (anti-LIBS1) em tampão Tyrode preparadas como descrito no Exemplo 2, foram misturadas primeiro com 1) polipéptido GRGESP (0,8 mM), 2) polipéptido GRGDSP (0,8 mM) ou 3) polipéptido GRGDSP (0,8 mM) mais ADP (10 mM). As misturas de anticorpo marcado com $^{125}I$/péptido foram então misturadas com as alíquotas de plaquetas contendo cerca de 1 x $10^8$ plaquetas/ml. As misturas de imunorreacção resultantes foram então mantidas por 30 minutos a 37°C, para permitir a expressão da determinante antigénica críptica e para permitir a formação de produtos de imunorreacção marcados com $^{125}I$, i.e., complexos de plaquetas ligadas ao ligando/anticorpos marcados com $^{125}I$. Os produtos de imunorreacção marcados foram então separados dos anticorpos não ligados, marcados com $^{125}I$, por centrifugação da alíquota de plaquetas através de uma almofada de sacarose, tal como é descrito no Exemplo 4, e a radioactividade associada às plaquetas foi determinada tal como anteriormente.

Os resultados são mostrados na Figura 2, e são expressos como um gráfico da quantidade de anti-LIBS1, adicionada à mistura de imunorreação versus a quantidade de anti-LIBS1 ligado a plaquetas detectáveis depois da imunorreação. Os resultados indicam que ambas as plaquetas, estimuladas e não-estimuladas, expressarão um determinante antigénico críptico LIBS1 na presença de ligando GRGDSP contendo RGD. Adicionalmente, os resultados indicaram cerca de 30-35 x $10^3$ sítios LIBS1 por plaqueta, que foram detectados utilizando moléculas de anticorpo monoclonal específicas de LIBS1.

Adicionalmente, os resultados também indicam a especificidade estrutural do ligando, contendo RGD, para GPIIb-IIIa. Uma substituição conservativa trocando um ácido glutâmico (E) em vez do resíduo de ácido aspártico (D) normalmente encontrado, resulta num péptido que é consideravelmente menos eficaz como um ligando indutor de uma determinante antigénica críptica.

B. Ensaio Para a Ligação de Anticorpo a GPIIb-IIIa Solúvel Purificada que Expressa Determinantes Antigénicas Crípticas

A capacidade para vários ligandos polipeptídicos induzirem a expressão de determinantes antigénicas crípticas foi estudada utilizando GPIIb-IIIa solúvel isolada.

Para esse fim, o ELISA de competição foi efectuado como descrito no Exemplo 3B com as seguintes excepções. As placas de microtitulação foram revestidas utilizando uma solução de revestimento contendo GPIIb-IIIa isolada, preparada como descrito no Exemplo 1B, a uma concentração de 10 μg por ml. Após o bloqueamento, todas as soluções utilizadas foram tratadas com Chelex 100 antes de serem utilizadas, tal como é descrito para o tampão Tyrode no Exemplo 5A.

Antes de uma composição de anticorpo ser adicionada a um alvéolo de microtitulação revestido com GPIIb-IIIa, adicionou-se a cada alvéolo 30 μl de uma solução de tampão de diluição contendo (1) $CaCl_2$ 2 mM; (2) GPIIb-IIIa isolada por imunoafinidade ou GPIIb-IIIa isolada por afinidade peptídica, preparada como descrito no Exemplo 1 e a uma concentração de cerca de 40 μg/ml; e (3) polipéptido GRGDSP, ou GRGESP, a uma concentração final de 1 mM, ou sem polipéptido. De seguida, misturaram-se em cada alvéolo 10 μl de uma solução de tampão de diluição contendo moléculas de anticorpo LIBSa como Mab15, diluídas a uma concentração limitante como descrito no Exemplo 3B para se formar uma mistura de imunorreacção. O Mab15 é uma molécula de anticorpo de controlo que imunorreage com GPIIb-IIIa, mas não é um anticorpo anti-LIBS. As misturas de imunorreacção foram mantidas a 22°C durante 16-20 horas, para permitir a formação de um primeiro produto de imunorreacção ligado à fase sólida entre a GPIIb-IIIa ligada à fase sólida e os anticorpos adicionados. De seguida, a quantidade de produto de imunorreacção formado foi medida através da formação de um produto de reacção de desenvolvimento de cor e da detecção da quantidade de produto corado formado, tal como anteriormente. Os resultados da imunorreacção medida são expressos como uma concentração aparente

de GPIIb-IIIa (µg por ml) da GPIIb-IIIa solúvel na mistura de imunorreacção e é calculada como se segue. O ELISA de competição foi primeiro efectuado utilizando concentrações de GPIIb-IIIa conhecidas, na ausência de polipéptido, de modo a preparar uma curva padrão de resultados de imunorreacção, para obter medições a A490 utilizando uma quantidade limitante de molécula de anticorpo (i.e., uma quantidade de 1,0 O.D.). A partir da curva padrão, qualquer medição particular a A490 pode ser extrapolada para determinar a concentração aparente de GPIIb-IIIa presente na mistura de imunorreacção. A partir das anteriores medições a A490, obtidas na presença dos polipéptidos indicados, anticorpos e preparações de GPIIb-IIIa, foram calculadas as concentrações aparentes de GPIIb-IIIa e são mostradas na Tabela 2.

TABELA 2
A Expressão do Epitopo de LIBS1 em GPIIb-IIIa
Purificada é Aumentada pelo Ligando

| | Aparente [GPIIb-IIIa] µg/ml | |
|---|---|---|
| | LIBSa | Mab 15 |
| GPIIb-IIIa purificada por imunoafinidade | | |
| Sem péptido | 7,1 ± 0,8 | 52,2 ± 1,4 |
| GRGDSP (1 mM) | 35,7 ± 5,8 | 56,1 ± 0,2 |
| GRGESP (1 mM) | 12,9 ± 1,9 | 47,7 ± 1,4 |
| GPIIb-IIIa purificada por afinidade a RGD | | |
| Sem péptido | 23,9 ± 0,4 | 90,5 ± 2,7 |
| GRGDSP (1 mM) | 56,7 ± 1,0 | 95,5 ± 10,7 |
| GRGESP (1 mM) | 30,9 ± 3,2 | 101,7 ± 5,7 |

Os resultados na Tabela 2 mostram que os ligandos polipeptídicos contendo RGD induzem a expressão de uma determinante antigénica críptica em GPIIb-IIIa numa maneira análoga àquela observada utilizando plaquetas intactas (ver, por exemplo, a Figura 2). A especificidade de expressão induzida pelo ligando foi verificada por utilização de um polipéptido contendo uma substituição conservativa (GRGESP), sendo ainda verificada pela observação de que não há influência significativa de ligando na ligação ao anticorpo monoclonal Mab15. Estes resultados indicam que a expressão induzida pelo ligando de determinantes antigénicas crípticas (i.e., LIBS), reconhecida por um anticorpo monoclonal anti-LIBS1 (LIBSa) é uma propriedade intrínseca de GPIIb-IIIa e não é dependente da associação de GPIIb-IIIa com plaquetas.

6. Preparação de Linhas Celulares Transfectadas que Expressam Integrinas Beta$_3$ ($B_3$)

De modo a analisar a base de modulação de afinidade da função da integrina, foram preparados clones estáveis de linhas celulares de ovário de hamster Chinês (CHO), que expressam integrinas recombinantes da família $\beta_3$, nomeadamente $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) e $\alpha_v\beta_3$ (receptor da vitronectina).

As células CHO foram cotransfectadas com quantidades iguais de construções de expressão de $\beta_3$ e $\alpha_{IIb}$ ou $\alpha_v$ [O'Toole et al., Blood, 74:14-18 (1989)], e um vector CDM8 contendo um gene de resistência à neomicina (CDNeo), numa razão de 30:1. A transfecção foi realizada pelo método de fosfato de cálcio [Graham et al, Virol., 52:456 (1973)], seguido por choque de glicerol a 15%, durante 4 minutos. Quarenta e oito horas depois do choque, as células foram ressuspensas em meio de selecção contendo 700 µg/ml de G418 e as colónias resistentes foram isoladas após 2 semanas em cultura. Os clones positivos foram identificados por citometria de fluxo, descrita no Exemplo 7, utilizando anticorpos específicos para as subunidades específicas da integrina $\beta_3$, $\alpha_{IIb}$ e $\alpha_v$. Clones de linhas celulares foram estabelecidos por agrupamento de células isoladas num FACStar (Becton-Dickinson, San Jose, CA) e mantidos em meio sem G418.

Foram assim isoladas as linhas celulares A5 e VNRC3, as quais exibem uma coloração brilhante e uniforme com os anticorpos Ab15 ou Tab e com Ab15 ou LM142, respectivamente, tendo sido mantidas para estudos posteriores.

7. Citometria de Fluxo Para Caracterizar as Integrinas $\beta_3$ Humanas na Superfície Celular

A ligação de anticorpo a células foi analisada através de citometria de fluxo, também referida como selecção de células activadas por fluorescência (FACS). As células para a análise de citometria de fluxo foram colhidas com EDTA 3,5 mM e pelotizou-se uma alíquota de 5 x $10^5$ células, ressuspendeu-se em meios ou tampão Tyrodes, contendo um primeiro anticorpo específico e incubou-se durante 20 minutos em gelo, com ou sem ligandos peptídicos. As células foram pelotizadas, lavadas uma vez e incubadas durante 20 minutos com um segundo anticorpo, IgG de cabra anti-ratinho conjugada com FITC (Tago, Burlingame, CA). As células foram então pelotizadas, ressuspensas em 0,5 ml de meio ou tampão Tyrodes e analisadas num analisador FACS IV (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Os anticorpos monoclonais de especificidade conhecida foram utilizados em análise por FACS, para identificar as subunidades de integrina nas superfícies celulares. Os anticorpos monoclonais (Mab) 4F10 e 2G12, específicos para o complexo da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, foram fornecidos por Virgil Woods (University of California, San Diego, CA). O Mab 10E5, específico para o complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$, foram fornecidos por Barry Coller (State University of New York, Stony Brook, NY). O Mab específico para $\alpha_{IIb}$, designado Tab, foi fornecido por Roger McEver (University of Texas, San Antonio, TX). LM142, um Mab específico com a subunidade alfa do receptor de vitronectina, $\alpha_v$, foi fornecido por David Cheresh (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA). O PAC1, um Mab específico activador de GPIIb-IIIa, foi fornecido por Sanford Shattil (University of Pennsylvania, PA). O Ab15 é um Mab específico de $\beta_3$ preparado no laboratório dos inventores utilizando GPIIb-IIIa purificada como imunogénio.

Utilizando o FACS, as linhas celulares A5 e VNRC3 produzidas no Exemplo 6 foram caracterizadas quanto à presença de subunidades de integrinas humanas. Os resultados da análise de FACS são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3

Reactividade de Transfectantes CHO VNRC3 ($\alpha_v\beta_3$) e A5 ($\alpha_{IIb}\beta_3$) com Anticorpos Monoclonais[a]

| | Tipo Celular Anticorpo | | |
|---|---|---|---|
| (Especificidade) | A5 | VNRC3 | CHO |
| Tab ($\alpha_{IIb}$) | 265,3 | 5,2 | 4,5 |
| Ab15 ($\beta_3$) | 280,7 | 29,9 | 4,4 |
| 10E5 ($\alpha_{IIb}\beta_3$) | 269,5 | 4,1 | 4,9 |
| LM142 ($\alpha_v$) | 7,0 | 33,1 | 4,5 |
| Nenhum | 6,2 | 4,3 | 4,5 |

[a] Linhas celulares CHO clonadas, estáveis transfectadas com subunidades $\beta_3$ e $\alpha_v$ ou $\alpha_{IIb}$ foram corados com os anticorpos indicados e analisados por FACS. Os resultados são expressos como intensidade de fluorescência média, em unidades arbitrárias. A linha celular VNRC3 expressava aproximadamente 1/9 da subunidade $\beta_3$, em relação à linha celular A5.

Os resultados na Tabela 3 mostram que as linhas celulares expressavam determinantes antigénicas de superfície apropriadas para as subunidades de integrina transfectadas. A linha A5 era fortemente positiva para $\alpha_{IIb}$ (Tab), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (4F10) e $\beta_3$ (Ab15), mas não para $\alpha_v\beta_3$ (LM142). Comparativamente a linha VNRC3, a qual expressa $\alpha_v\beta_3$, era fortemente positiva com LM142 e Ab15, mas negativa com 4F10 e Tab. Adicionalmente, através da utilização de uma imunoprecipitação convencional da superfície celular das células A5 ou VNRC3 radio-iodadas, de acordo com Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6002-6006 (1986), as subunidades

$\alpha_{IIb}$ das células A5 e as subunidades $\alpha_v$ das células VNRC3 eram imunoprecipitáveis com um anticorpo anti-$\beta_3$ humano (Ab15), indicando que ambas estavam complexadas com a subunidade $\beta_3$ comum transfectada. Estes dados indicam que as células A5 expressam integrina heterodimérica, compreendendo as subunidades $\alpha_{IIb}$ e $\beta_3$, enquanto que as células VNRC3 expressam integrina heterodimérica, compreendendo as subunidades $\alpha_v$ e $\beta_3$.

8. Integrinas Recombinantes Ligam Fibrinogénio Imobilizado

A capacidade das células A5 contendo $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante se ligarem a fibrinogénio imobilizado (Fg) foi avaliada por análise de FACS.

Preparou-se Fg imobilizado por revestimento de 0,8 $\mu$M de microesferas de latéx fluorescente (Fluoricon Fluorescent Particles, Baxter, McGraw Par, IL). Estas microesferas foram preparadas por incubação de 1 mg de Fg purificado com 650 $\mu$l de microesferas Fluoricon, durante 1 hora à temperatura ambiente. As microesferas foram precipitadas, ressuspensas em 1 ml de Tris 30 mM, pH 7,4, NaCl 170 mM e 1% de BSA, e armazenadas a 4°C até à sua utilização. A ligação destas particulas às células transfectadas foi avaliada por incubação de 5 x $10^5$ células com 25 $\mu$l de microesferas, na presença ou ausência de inibidores de polipéptidos, durante 30 minutos à temperatura ambiente. A solução foi colocada em camada numa almofada de 6% de BSA, centrifugada durante 5 minutos numa microcentrífuga e as células pelotizadas foram ressuspensas em 500 $\mu$l de tampão Tyrodes e sujeitas a análise de FACS, tal como descrito no Exemplo 7.

A linha celular A5 aderiu às microesferas revestidas com Fg e a aderência foi inibida com péptido GRGDSP 2 mM. Em contraste, a linha celular CHO progenitora não aderiu. Assim, tal como nas plaquetas em repouso [Coller, Blood, 55:169-178 (1980)], $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante medeia a ligação celular a Fg imobilizado.

9. $\alpha_{IIb}\beta_3$ Recombinante é Expressa como uma Integrina Inactiva

Os $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas requerem activação celular para ligar ligandos macromoleculares em fase fluida, tal como o Fg, com

elevada afinidade [Coller, J. Cell Biol., 103:451-456 (1986); Shattil et al., J. Biol. Chem., 262:992-1000 (1987)]. Para determinar se $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante foi expresso nas células A5 numa forma activa, o anticorpo monoclonal anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$, PAC1, o qual é reactivo com plaquetas activas mas não com plaquetas em repouso [Shattil et al., J. Biol. Chem., 260:11107-11114 (1985)], foi utilizado num ensaio de FACS.

Com esse fim, o anticorpo PAC1 foi fluoresceinizado com FICT, tal como é descrito por Taub et al., J. Biol. Chem., 264:259-265 (1989), para formar FITC-PAC1 e utilizado directamente na citometria de fluxo. Resumidamente, 5 x $10^5$ células foram recolhidas e ressuspensas em 50 µl de tampão Tyrodes [Frelinger et al., J. Biol. Chem., 265:6346-6352 (1990)] contendo 10 µg/ml de FITC-PAC1 na presençaou ausência de agonistas adicionais. Após uma incubação de 30 minutos a 37 graus, as amostras foram diluídas a 0,5 ml com tampão Tyrodes e analisadas por citometria de fluxo, tal como é descrito no Exemplo 7.

O anticorpo monoclonal específico activador PAC1 não reagiu com $\alpha_{IIb}\beta_3$ na linha celular A5 ou com as plaquetas em repouso, apesar do receptor estar presente em ambas as células A5 e plaquetas em repouso, tal como é evidenciado por coloração com o anticorpo específico para o complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$ 4F10, utilizando o ensaio de FACS. Em contraste, as plaquetas activadas por ADP coraram brilhantemente com PAC1 através do ensaio de FACS. Agonistas de plaquetas, tal como o ADP (10 a 50 µM), trombina (1 a 5 unidades/ml), epinefrina (4 a 200 µM), acetatomiristato de forbol (5 a 500 nM) e ionomicina (5 a 200 nM), não estimularam a ligação de PAC1 às células A5. Três possíveis explicações para este resultado são: 1) o $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante não possui o epitopo de PAC1, 2) o $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante não pode ser activada ou 3) as células CHO não possuem receptores e/ou sistemas de transdução requeridos para a activação mediada por agonistas.

10. Activação de Integrina Utilizando Anticorpos Activadores Anti-integrina

De modo a avaliar a capacidade de um anticorpo monoclonal

para activar (i.e., aumentar a afinidade de ligação de ligandos específicos) a integrina GPIIb-IIIa, foi desenvolvido um ensaio que mede a ligação de PAC1 a células contendo GPIIb-IIIa, utilizando a análise de FACS, tal como é descrito no Exemplo 7.

No ensaio de ligação de PAC1 para anticorpos activadores de integrina, o anticorpo activador foi misturado com uma integrina de ligação à célula, a uma concentração de anticorpo de cerca de 5 μM. Para GPIIb-IIIa, a suspensão de células foi preparada como no Exemplo 9, o anticorpo activador foi misturado a 5 μM e a mistura foi mantida durante 20 minutos em gelo. De seguida, FITC-PAC1 foi adicionado como descrito no Exemplo 9 e o protocolo de FACS seguido como no Exemplo 9, para medir a ligação de PAC1.

Preparam-se anticorpos monoclonais (Mabs) essencialmente como descrito no Exemplo 2, excepto na utilização de plaquetas intactas como imunogénio. Ruggeri et al., S. Clin. Invest., 76:1950-58 (1985). Dos 46 Mabs isolados, que imunorreagem com plaquetas imunizadoras, foram encontrados 6 que aumentavam a ligação de PAC1 a plaquetas, quando medida através do ensaio de ligação de PAC1, e foram designadas como anticorpos activadores de integrina, devido ao desvio na intensidade média de fluorescência celular (MCFI) era maior do que um aumento de três vezes em relação ao fundo.

No conjunto de Mabs isolados por imunização com plaquetas intactas, foi seleccionado o P41 a partir dos 6 Mabs identificados, para estudos posteriores.

Vários Mabs anti-LIBS, preparados no Exemplo 2 e identificados na Tabela 1, foram igualmente testados para actividade activadora de integrina, tal como é acima descrito, através da medida de aumento de ligação de PAC1 no ensaio de ligação de PAC1. Através deste ensaio, os anticorpos anti-LIBS LIBSb, LIBSc e LIBSf descritos na Tabela 1 foram identificados como estimuladores da ligação de PAC1.

Os fragmentos Fab foram preparados a partir dos anticorpos

activadores de integrina P41 ou Ab62, utilizando o procedimento de preparação de Fab descrito no Exemplo 2. Os fragmentos Fab de P41 ou fragmentos Fab de Ab62 aumentam a ligação de PAC1 a plaquetas e a células A5, mas não a células CHO, quando medida através do ensaio de ligação de PAC1. A Figura 3 mostra os resultados de FACS do ensaio de ligação de PAC1, utilizando o fragmento Fab de P41 para activar a integrina nas células. Os fragmentos de Fab de LIBSb activam igualmente a ligação de PAC1 a plaquetas ou a células A5, no ensaio de ligação de PAC1.

Uma medida independente da activação de integrina foi efectuada por detecção da capacidade de uma célula contendo a integrina ligar fibrinogénio (Fg) solúvel, que foi marcado com $^{125}I$. O Fg foi isolado e marcado com $^{125}I$, pelos métodos usuais tal como é descrito por Marguerie et al., J. Biol. Chem., 255:154-161 (1980), para formar $^{125}I$-Fg. De seguida, a ligação de $^{125}I$-Fg a células transfectadas foi ensaiada, tal como foi anteriormente descrito para plaquetas [Marguerie et al., J. Biol. Chem., 255:154-161 (1980)]. A ligação foi iniciada pela adição de células a Fg marcado radioactivamente e incubação a 37 graus, durante 30 minutos. O ligando ligado foi separado do ligando livre por centrifugação através de 0,3 ml de sacarose a 20% e a quantidade de ligando marcado radioactivamente associado com a pelota celular foi determinada por detecção gama.

Quando os fragmentos Fab dos Mabs P41 ou LIBSb (também referidos como Ab-62) foram misturados separadamente a 5 $\mu$M com as células A5, para activar a integrina antes do ensaio de ligação de $^{125}I$-Fg, observou-se que cada Fab estimulava um aumento de três vezes no número de moléculas $^{125}I$-Fg que se ligavam às células A5. Células A5 não estimuladas ou células CHO não exibiam aumento na ligação a $^{125}I$-Fg acima do fundo. Neste ensaio, a ligação de fundo detectou cerca de 30.000 moléculas de Fg ligadas por célula contendo integrina, enquanto que as células A5 estimuladas ao máximo com Ab-62 ligaram cerca de 95.000 moléculas de Fg por célula. Adicionalmente, a ligação de $^{125}I$-Fg solúvel foi inibida com o polipéptido GRGDSP e foi inibida com o anticorpo monoclonal anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ 2G12, mas não foi inibida com o

polipéptido GRGESP inactivo.

Os péptidos RGDF, GRGDSP, GRGESP e LGGAKQAGDV (L10) foram preparados através de uma síntese de fase sólida num sintetizador de péptidos Applied Biosystems modelo 430 (Foster City, CA), utilizando resinas de fenilacetamidometilo e aminoácidos t-butoxicarbonilo, adquiridos à Applied Biosystems.

O equilíbrio de ligação de Fg solúvel a células A5 estimuladas (activadas) com Ab-62 foi efectuado para caracterizar melhor a ligação a Fg. Análises ao longo do tempo mostraram que a ligação a Fg alcançava um estado estacionário após uma incubação de 30 minutos e era >75% reversível. Incubaram-se células A5 ($10^6$ por ml) com 6 $\mu$M de Ab-62, purificado por Sepharose, durante 30 minutos a 22 °C, de modo a activar a integrina. De seguida, $^{125}$I-Fg foi misturado a concentrações variando desde 0,01 a 1 nM. Após 60 minutos, o Fg ligado foi medido, como descrito acima, após centrifugação das células através de sacarose.

A saturação de ligação foi medida em três experiências diferentes e representada num gráfico, em função da concentração de Fg de entrada, de modo a se obterem dados médios, que são mostrados na Figura 4. Foi também efectuada uma nova apresentação gráfica de Scatchard dos dados de ligação e que é apresentada na inserção da Figura 4. A ligação das várias concentrações de Fg às células A5 activadas em estado estacionário foi analisada através do uso do programa de computador "Ligand". Os resultados foram consistentes com a ligação a uma classe única de sítios com $K_a$ = = 9,1 x $10^6$ ± 1,5 x $10^6$ $M^{-1}$ (Kd = 110 nM), concentração do receptor = 2,3 ± 0,3 nM (138 000 sítios/célula), e de ligação não saturável = 2,2 ± 0,4 x $10^{-3}$. Verificou-se uma variação diária na quantidade de $\alpha_{IIb}\beta_3$ expressa como medido pela ligação do anticorpo 2G12 (150 000 a 440 000 sítios/célula) bem como no número de receptores Fg (138 000 a 360 000 sítios/célula). A razão de receptores Fg para $\alpha_{IIb}\beta_3$ expressa por célula num determinado dia foi de 0,83 ± 0,05, sendo assim virtualmente todos os recombinantes $\alpha_{IIb}\beta_3$ funcionais no que diz respeito à ligação a Fg.

Estes resultados mostram que o recombinante $\alpha_{IIb}\beta_3$ está presente na superfície das células CHO e num estado não estimulado e não possui a capacidade de ligar Fg solúvel ou PAC1, mas pode ser activado para o fazer utilizando um anticorpo activador deste invento. Os resultados também mostram que a falta de afinidade de ligação destes ligandos às plaquetas em repouso não é devida a uma propriedade única da superfície das plaquetas.

11. Imunoprecipitação da integrina

Para o aprofundamento da caracterização do modo de acção dos anticorpos activadores da integrina, o alvo antigénico do anticorpo foi identificado por imunoprecipitação. As células A5, plaquetas ou células CHO foram primeiro marcadas com $^{125}I$ na sua superfície e os lisados celulares foram então preparados e imunoprecipitados, tal como descrito por Plow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6002-6006 (1986). Os lisados foram imunoprecipitados utilizando P41, Ab15 ou soro normal de ratinho (NMS) e os imunoprecipitados foram analisados em geles de poliacrilamida a 7%, em condições não redutoras. As proteínas marcadas assim analisadas foram então visualizadas por autorradiografia.

A imunoprecipitação de células A5 marcadas na superfície, mas não de células CHO, com qualquer dos anticorpos resultou no isolamento de proteínas de superfície com mobilidades idênticas a $\alpha_{IIb}\beta_3$. Isto indica que ambos os anticorpos se ligam a $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante em vez de a um constituinte celular endógeno de CHO.

De modo a determinar qual a subunidade que foi reconhecida, extractos de plaquetas e $\alpha_{IIb}\beta_3$ purificada preparada no Exemplo 1C, foram imunotransferidos com os mesmos anticorpos P41 ou Ab15. Para as experiências de imunotransferência, lisados de plaquetas ou $\alpha_{IIb}\beta_3$ purificada foram resolvidos em geis de poliacrilamida a 7,5%, em condições não redutoras, e transferidos para nitrocelulose. Os transferidos foram sondados com o primeiro anticorpo específico e desenvolvidos utilizando o método de Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Em ambos os casos a subunidade $\beta_3$ foi reconhecida. Assim, ambos os anticorpos

monoclonais activam o receptor por ligação à subunidade $\beta_3$.

12. A Activação da Integrina Ocorre na Ausência da membrana Celular.

Os dados descritos nos Exemplos 10 e 11 estabeleceram que os fragmentos Fab dos anticorpos activadores P41 ou Ab62 activam células A5 e plaquetas para expressar receptores dependentes de $\alpha_{IIb}\beta_3$, para Fg e PAC1 de fase fluida. De modo a determinar se esta activação requer acontecimentos de transdução de sinal intracelular, foi medida a capacidade destes Fabs para induzir a ligação de PAC1 às plaquetas fixadas por formaldeído.

Para fixar as plaquetas, sangue de um dador normal foi centrifugado a 1000 rpm durante 20 minutos e o plasma rico em plaquetas resultante foi incubado com 2 μg/ml de PGE1 e 1 mM de tiofilina, durante 15 minutos à temperatura ambiente, seguida de uma incubação com 0,1% de paraformaldeído durante 15 minutos à temperatura ambiente. As plaquetas fixadas ou normais foram então analisadas por ligação de FITC-PAC1, tal como descrito acima no Exemplo 9, na presença de agonistas de plaquetas ou anticorpo activador P41.

A fixação de plaquetas aboliu completamente a resposta de PAC1 a agonistas fortes, tais como 50 nM de acetatomiristato de forbol (PMA) ou uma unidade/ml de trombina. Em evidente contraste, a resposta da P41 não foi prejudicada quando as plaquetas foram fixadas. Ambas as plaquetas, vivas e fixadas, ligaram PAC1 após estimulação por P41. Assim, a viabilidade de plaquetas não era um pré-requisito para a resposta de activação do anticorpo activador.

De modo a determinar se os anticorpos activadores podem activar $\alpha_{IIb}\beta_3$ longe do meio membranar, a capacidade activadora de estimulação da ligação de Fg em fase de solução, foi ensaiada. Neste ensaio, $\alpha_{IIb}\beta_3$ foi solubilizada a partir das plaquetas, incubada na presença ou ausência de anticorpos monoclonais activadores e depois ligada a microplacas revestidas com um anticorpo anti $\beta_3$ monoclonal não activador.

As plaquetas foram isoladas, tal como descrito no Exemplo 1A, e lavadas duas vezes em tampão Tyrodes livre de cálcio e magnésio ( NaCl 0,13 M, KCl 0,0026 M, $MgCl_2.6H_2O$ 0,002 M, Hepes 5 mM, $NaHCO_3$ 0,012 M, pH 6,5) para formar uma pelota lavada. O precipitado de plaquetas foi ressuspenso e solubilizado em Hepes 10 mM, gelado, contendo NaCl 150 mM, octil-$\beta$-D-glucopiranósido 50 mM (Calbiochem, La Jolla, CA), PMSF 1 mM, 50 ng/ml de PGE, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, leupeptina 50 $\mu$M e 1 mg/ml de N-etilmaleimida (Sigma, St. Louis, MO) e centrifugada a 100.000 g durante 30 minutos. O lisado de plaquetas foi incubado, durante 15 minutos a 4°C, com 5 $\mu$M de anticorpo monoclonal activador e posteriormente adicionado a alvéolos de microtitulação (Immunlon 2 "removawell strips", Dynatech Labs, Chantilly, VA), pré-revestidos com 15 $\mu$g/ml do anticorpo monoclonal específico de $\beta_3$, Mab15. Os alvéolos de microtitulação foram incubados a 4°C durante a noite, lavados duas vezes com um tampão Tyrodes-Hepes modificado (Hepes 2,5 mM, NaCl 150 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, D-glucose 5,5 mM e 1 mg/ml de BSA, pH 7,4) contendo octil-$\beta$-D-glucopiranósido 50 mM e anticorpo monoclonal de activação 0,1 $\mu$M e posteriormente duas vezes com tampão Tyrodes-Hepes apenas para formar com $\alpha_{IIb}\beta_3$ ligado alvéolos de microtitulação. O $\alpha_{IIb}\beta_3$ ligado a alvéolos de microtitulação foram então incubados com 50 $\mu$l de Fg marcado com $^{125}I$ 50 nM (preparado como no Exemplo 10) na presença ou ausência de péptidos ou inibidores de anticorpo à temperatura ambiente durante 4 horas. A radioactividade ligada foi contada após duas lavagens com tampão Tyrodes-Hepes. Em experiências controlo o lisado de plaquetas foi incubado em alvéolos de microtitulação revestidos com um anticorpo irrelevante, TIB115, ou alvéolos de microtitulação revestidos com Mab15 que foram incubados com tampão Tyrodes-Hepes sem lisado de plaquetas.

Os resultados do ensaio da fase em solução para a activação do receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ solubilizado foram os de que o receptor capturado estimulado quer com P41 ou com Ab62 era capaz de ligar Fg solúvel. Enquanto que cerca de 2 000 cpm de $^{125}I$-Fg se ligou por poço na ausência de estimulação, representando a ligação de fundo, cerca de 11 000 cpm ou 19 000 cpm de Fg se ligou após

estimulação com P41 ou Ab62, respectivamente. A especificidade da ligação Fg foi verificada por inibição com Fg gelado, péptido GRGDSP, e um complexo monoclonal específico, 2G12. Estes resultados indicam que a activação de $\alpha_{IIb}\beta_3$, e de integrinas em geral, pode prosseguir na ausência do microambiente da menbrana celular.

Discussão

As principais conclusões que se tiram dos dados anteriores são: 1) duas subunidades $\alpha$ diferentes ($\alpha_{IIb}$ e $\alpha_v$) da integrina formam complexos funcionais com subunidades $\beta$ codificadas pelo mesmo ARNm e a subunidade $\alpha$ regula o reconhecimento específico dos ligandos peptídicos; 2) embora estáveis, os transfectantes $\alpha_{IIb}\beta_3$ são incapazes de ligar avidamente Fg solúvel ou o monoclonal específico de activação, PAC1, quando estimulados com certos anticorpos monoclonais anti-$\beta_3$, nomeadamente anticorpos monoclonais anti-$\beta_3$ activadores, eles expressam estas funções de ligação; 3) a activação de $\alpha_{IIb}\beta_3$ com estes anticorpos pode prosseguir na ausência de acontecimentos de transducção de sinal ou de uma membrana celular. Assim, a activação de $\alpha_{IIb}\beta_3$ não é uma propriedade inerente às plaquetas ou ao seu microambiente, mas é uma propriedade intrínseca do próprio receptor.

Com base na identidade sequencial parcial, reactividade imunológica cruzada e migração electroforética semelhante [Ginsberg et al. J. Biol. Chem., 262:5437-5440 (1987)], tem-se assumido que as subunidades $\beta$ associadas com $\alpha_{IIb}$ e $\alpha_v$ são idênticas ou de elevada semelhança. O clone $\beta_3$ aqui utilizado foi isolado de uma biblioteca de células endoteliais. É provavelmente a subunidade $\beta$ de $\alpha_v\beta_3$, e forma heterodímeros com $\alpha_v$ ou $\alpha_{IIb}$. Cada recombinante heterodimérico retinha a sua especificidade antigénica característica e possuía afinidades relativas para péptidos sintéticos semelhantes aos do receptor nativo mas diferindo de cada um deles. Uma vez que partilham uma subunidade $\beta$ codificada pelo mesmo ARNm as diferentes especificidades de reconhecimento do péptido das integrinas $\beta_3$ recombinantes, são atribuídas à subunidade $\alpha$. Em particular o péptido do fibrinogénio $gama_{402-411}$ (L10) foi melhor reconhecido por $\alpha_{IIb}\beta_3$

do que por $\alpha_v\beta_3$. Os 21 resíduos que constituem $\alpha_{IIb}$ 294-314 estão próximos de, ou fazem parte, do sítio de ligação para um péptido contendo $gama_{402-411}$ e mostram uma divergência significativa de sequência da região semelhante de $\alpha_v$ [D'Sousa et al., J. Biol. Chem., 265:3440-3446 (1990)]. Assim, esta região da subunidade $\alpha$ contribui para a diferença de especificidade de reconhecimento do ligando peptídico.

A $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante, expressa de modo estável em células CHO, é funcionalmente semelhante à das plaquetas em repouso, no que diz respeito às propriedades de ligação antigénicas, peptídicas e de macromolécula insolúvel do ligando de $\alpha_{IIb}\beta_3$. A $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante é expressa num estado inactivo na medida em que falha na avidez de ligação a Fg e ao PAC1 monoclonal específico de activação, enquanto sustenta a adesão celular a Fg imobilizado. A $\alpha_{IIb}\beta_3$ recombinante possui a capacidade potencial para ligar macromoléculas de fase fluida uma vez que a estimulação com anticorpos monoclonais anti $\beta_3$ activadores resulta na ligação específica de PAC1 ou Fg. Estes anticorpos activadores são eficazes nas $\alpha_{IIb}\beta_3$ nativa e recombinante e exercem o seu efeito por actuação directa no receptor, com base em 3 linhas de evidência. Primeiro, os fragmentos Fab de P41 e Ab62 eram activadores eficazes. Assim, estes anticorpos não dependem do seu fragmento Fc para mediar este efeito. Isto está em contraste com a activação das plaquetas por certos anticorpos anti CD9 que utilizam a região Fc do anticorpo activador. Veja-se por exemplo, Jennings et al., J. Biol. Chem., 265:3815-3822 (1990); Worthington et al., Br. J. Haematol., 74:216-222 (1990); Boucheix et al., FEBS Lett., 161:289-295 (1983). A eficácia dos fragmentos Fab na activação sugere também que a ligação cruzada do receptor com um anticorpo não é crítica no mecanismo de activação. Segundo, estes anticorpos estimulam a ligação de PAC1 em condições em que agonistas fortes são incapazes de activar plaquetas. Assim, a activação por estes anticorpos parece não requerer acontecimentos de transdução de sinal ou células vivas. Isto está em contraste com outros agonistas, que geralmente requerem células vivas e metabolicamente activas. Finalmente P41 e Ab62 são capazes de estimular a ligação de Fg solúvel a $\alpha_{IIb}\beta_3$

solubilizada isolada a partir de membranas de plaquetas. A activação é desta forma, uma propriedade inerente ao próprio receptor e não requer invariavelmente transducção de sinal ou membrana celular. A explicação mais provável do efeito do anticorpo é a alteração da conformação do receptor, permitindo-lhe que ele se ligue com maior afinidade a macromoléculas de fase fluida.

A $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas é um protótipo do papel que a activação desempenha na modulação da afinidade das integrinas. É óbvio que outras subfamílias de integrina requerem também a activação para a competência funcional total. A estimulação de Mac-I ($\alpha_M\beta_2$) e LFA1 ($\alpha_L\beta_2$) com agentes como ésteres de forbol, ADP ou N-formil-péptidos promovem a agregação de neutrófilos ou a adesão de linfócitos in vitro [Wright et al., J. Immunol., 136:1759-1764 (1986); Detmers et al., J. Cell Biol., 105:1137-1145 (1987)], assim como a elevada afinidade de ligação de Fg de fase fluida [Altieri et al., J. Cell Biol., 107:1893-1900 (1988)]. A activação destes receptores parece não requerer o recrutamento de novos receptores de superfície, mas envolvem em vez disso uma modificação dos receptores existentes [Phillips et al., J. Clin. Invest., 82:495-501 (1988); Buyon et al., J. Immunol., 140:3156-3160 (1988)].

Os dados acima mencionados mostram que a modulação da afinidade controla a actividade funcional das integrinas. Uma vez que a afinidade das integrinas para ligandos específicos controla a migração, capacidade de invasão, organização do citoesqueleto e adesão celular [Hynes, Cell, 48:549-554 (1987)], os anticorpos activadores anti $\beta_3$ aqui descritos são úteis para modular estas funções celulares numa integrina e de forma específica de ligando.

A descrição anterior, incluindo as concretizações específicas e Exemplos, pretende ilustrar o presente invento e não deve ser considerada como limitante. Outras numerosas variações e modificações podem ser efectuadas sem haver afastamento do verdadeiro espírito e âmbito do presente invento.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para activar uma integrina que se liga a um ligando específico, caracterizado por compreender o contacto da referida integrina com uma solução contendo uma quantidade activadora de anticorpos activadores de integrina que:

(a) imunorreagem com a referida integrina e que quando imunorreagidos aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação ao referido ligando específico; e

(b) imunorreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando formado na referida integrina quando a referida integrina está especificamente ligada ao referido ligando específico.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida quantidade activadora ser uma quantidade suficiente para proporcionar pelo menos um equivalente molar dos referidos anticorpos activadores de integrina, por equivalente molar de integrina.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida quantidade activadora ser de 1 a 100 micromolar.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida integrina ser constituída por uma subunidade alfa e uma subunidade beta e por os referidos anticorpos activadores de integrina imunorreagirem com a subunidade beta da referida integrina.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a referida integrina ser a proteína GPIIb-IIIa das plaquetas e os referidos anticorpos activadores de integrina imunorreagirem com a subunidade GPIIIa.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a imunorreacção dos referidos anticorpos activadores de integrina com a referida integrina aumentar a afinidade de ligação para o referido ligando especifico em pelo menos ordem de

grandeza.

7 - Processo de determinação da competência de activação de células possuindo integrina na sua superfície celular, caracterizado por compreender:

(a) misturar as referidas células num fluido fisiológico, com uma quantidade activadora de anticorpos activadores de integrina que

(i) imunorreagem com a referida integrina e que quando imunorreagidos aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação ao referido ligando específico; e

(ii) imunorreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando formado na referida integrina, quando a referida integrina está especificamente ligada ao referido ligando específico, para formar uma mistura activadora;

(b) manter as referida mistura activadora durante um período de tempo suficiente para que a referida integrina da superfície celular imunorreaja com os referidos anticorpos activadores de integrina e forme um imunocomplexo de integrina activada na superfície da superfície das referidas células; e

(c) pesquisar a presença do referido imunocomplexo de integrina activada, formado no passo (b) e, deste modo, a competência de activação da referida célula.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por a referida presença do referido imunocomplexo de integrina activada ser pesquisado por:

(i) mistura do referido imunocomplexo de integrina activada com um ligando específico de activação, que se liga com integrina activada mas não se liga substancialmente com a integrina não activada, para formar uma mistura de ligação;

(ii) manter a referida mistura de ligação durante um período

de tempo predeterminado e suficiente para que o referido ligando específico para activação se ligue ao referido imunocomplexo de integrina activada que está presente na referida mistura de ligação e forme um produto de reacção de ligação; e

(iii) detectar o referido produto de reacção de ligação formado no passo (ii) e deste modo a presença do imunocomplexo de integrina activada.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por as referidas células serem plaquetas e a referida integrina ser a GPIIb-IIIa.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por os referidos anticorpos activadores de integrina imunorreagirem com a subunidade GPIIIa.

11 - Processo de preparação de um penso para cicatrização de feridas, caracterizado por se aplicar a uma matriz de suporte contendo um meio para reter e libertar uma composição terapêutica contendo, o referido meio para reter e libertar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição terapêutica, para aumentar a adesão celular das plaquetas, a qual compreende, num veículo farmaceuticamente aceitável, anticorpos activadores de integrina que:

(a) imunorreagem com a referida integrina GPIIb-IIIa e que quando imunorreagidos aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação ao fibrinogénio; e

(b) imunorreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando formado na referida integrina quando a integrina está especificamente ligada a um ligando específico.

12 - Processo de preparação de uma composição terapêutica para aumentar a adesão de células que expressam integrina na superfície celular, caracterizado por compreender associar uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpos activadores de

integrina que:

(a) imunorreagem com a referida integrina e que quando imunorreagidos aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação a um ligando específico; e

(b) imunorreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando formado na referida integrina com afinidade aumentada quando a referida integrina está especificamente ligada ao referido ligando específico.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por a referida integrina ser constituída por uma subunidade alfa e uma subunidade beta e por os referidos anticorpos activadores de integrina imunorreagirem com a subunidade beta da referida integrina.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida integrina ser a proteína GPIIb-IIIa das plaquetas e os referidos anticorpos activadores de integrina imunorreagirem com a subunidade GPIIIa.

15 - Processo de produção de um conjunto de diagnóstico, para a determinação da presença de competência de activação da integrina em células possuindo integrina na superfície celular, caracterizado por se embalar, separadamente:

(A) como reagente, uma quantidade suficiente para pelo menos um ensaio de uma composição compreendendo anticorpos monoclonais activadores de integrina, na qual as referidas moléculas de anticorpos monoclonais activadores de integrina:

(a) imunorreagem com uma integrina e que quando imunorreagidos aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação a um ligando específico para a referida integrina; e

(b) imunorreagem com um sítio de ligação induzido pelo ligando formado na referida integrina com afinidade aumentada

quando a referida integrina está especificamente ligada ao referido ligando específico;

(B) um marcador que indica a presença de um produto de imunorreacção; e

(C) opcionalmente, um agente de ligação específica.

16 - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por as referidas moléculas de anticorpos monoclonais activadores de integrina imunorreagirem com a integrina GPIIb-IIIa das plaquetas e as referidas células serem plaquetas.

17 - Processo de formação de um anticorpo monoclonal que imunorreage com uma integrina e que quando imunorreagido aumenta a afinidade de ligação da integrina para a ligação a um ligando pré-seleccionado, e que imunorreage com um sítio de ligação induzido pelo ligando expresso por um complexo integrina-ligando, contendo o referido complexo a referida integrina e um ligando específico que estão especificamente ligados, caracterizado por compreender:

(a) fazer uma suspensão de células produtoras de anticorpos, provenientes de um animal previamente imunizado com o referido complexo;

(b) tratar as referidas células com um agente transformante para produzir células produtoras de anticorpos transformadas;

(c) clonar por diluição limitante, num meio de cultura de tecidos que não suporte células não transformadas, as células tratadas no passo (b), para produzir transformantes clonados;

(d) pesquisar o meio de cultura de tecidos dos transformantes clonados quanto à presença de moléculas de anticorpo segregadas que imunorreagem com a referida integrina e que quando imunorreagidas aumentam a afinidade de ligação da integrina para ligação ao referido ligando pré-seleccionado;

(e) seleccionar e cultivar num meio de cultura de tecidos um transformante clonado que produz as referidas moléculas de anticorpo segregadas no referido meio de cultura; e

(f) recolher, do meio de cultura do referido transformante clonado seleccionado, as referidas moléculas de anticorpo segregadas.

Lisboa, 15 NOV 1991

Por THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
=O AGENTE OFICIAL=

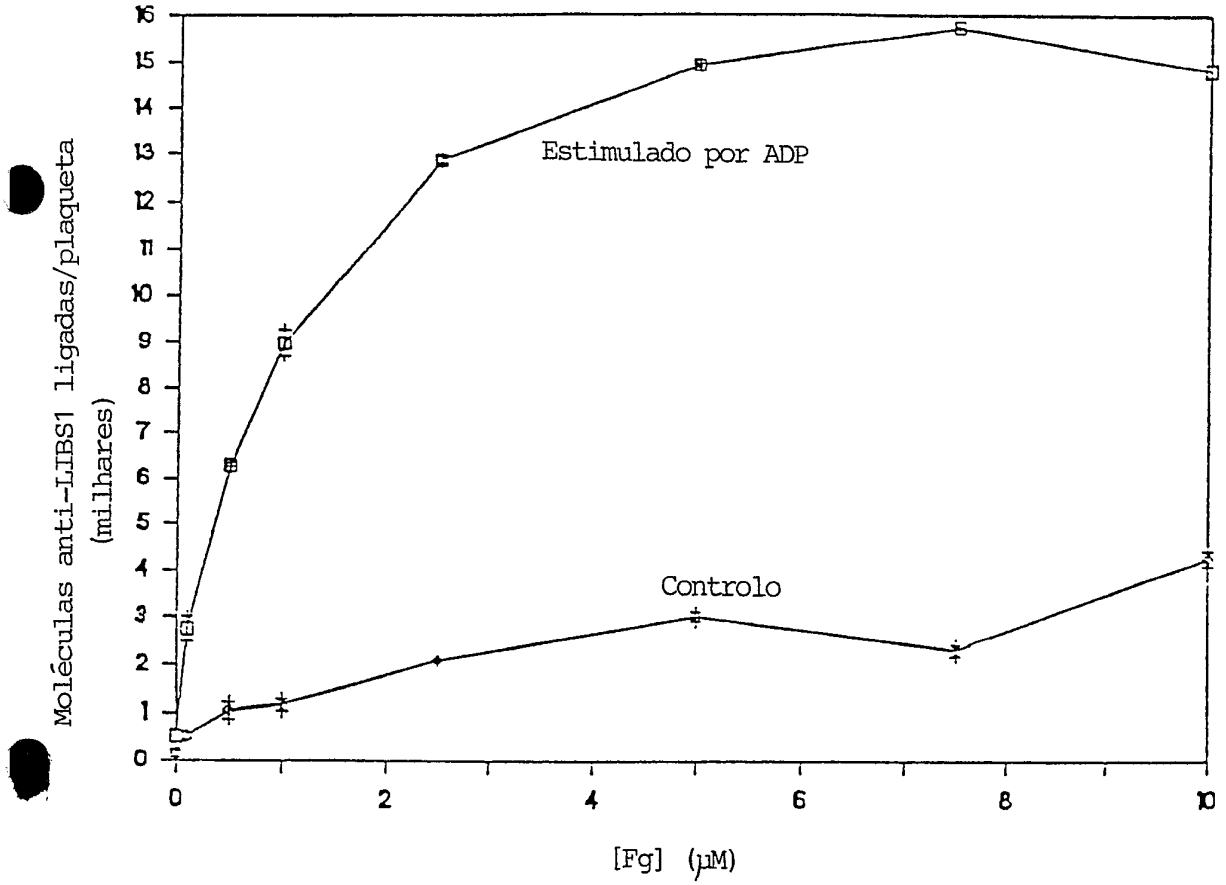

Moléculas anti-LIBS1 ligadas/plaqueta
(milhares)
Estimulado por ADP
Controlo
[Fg] (µM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
0
2
4
6
8
10

FIGURA 1

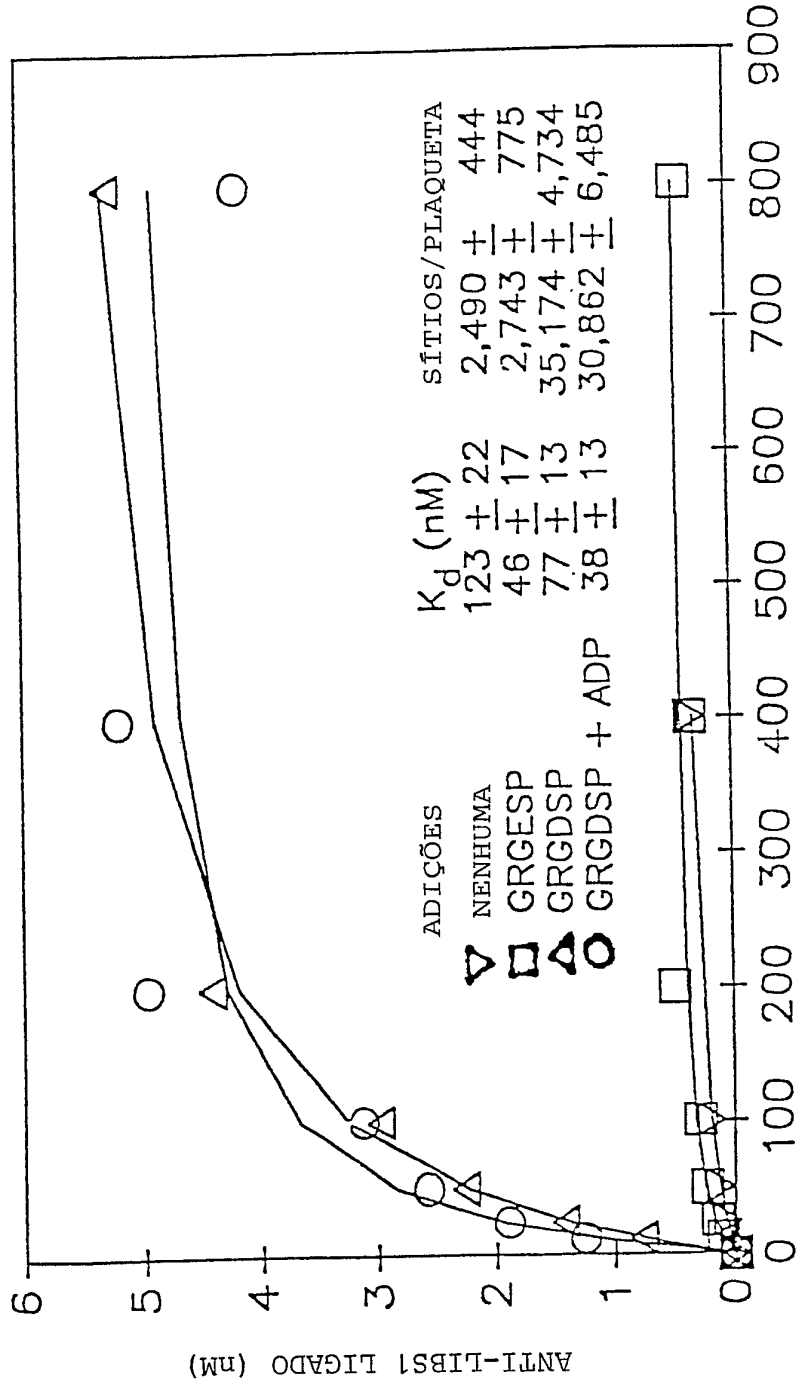

ANTI-LIBS1 LIGADO (nM)
0
1
2
3
4
5
6
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
ANTI-LIBS1 ADICIONADO (nM)
ADIÇÕES
NENHUMA
GRGESP
GRGDSP
GRGDSP + ADP
$K_d$ (nM)
123 ± 22
46 ± 17
77 ± 13
38 ± 13
SÍTIOS/PLAQUETA
2,490 ± 444
2,743 ± 775
35,174 ± 4,734
30,862 ± 6,485

FIGURA 2

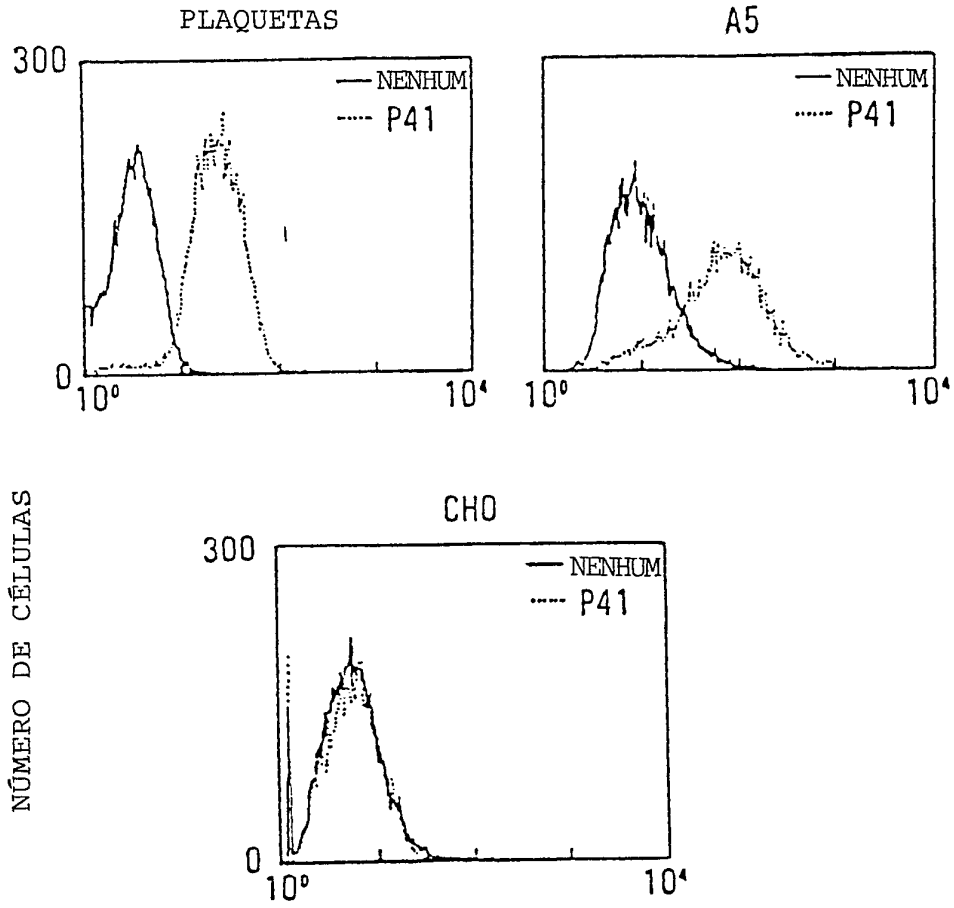

PLAQUETAS
A5
CHO
300
0
NENHUM
P41
$10^0$
$10^4$
NÚMERO DE CÉLULAS
INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA

FIGURA 3

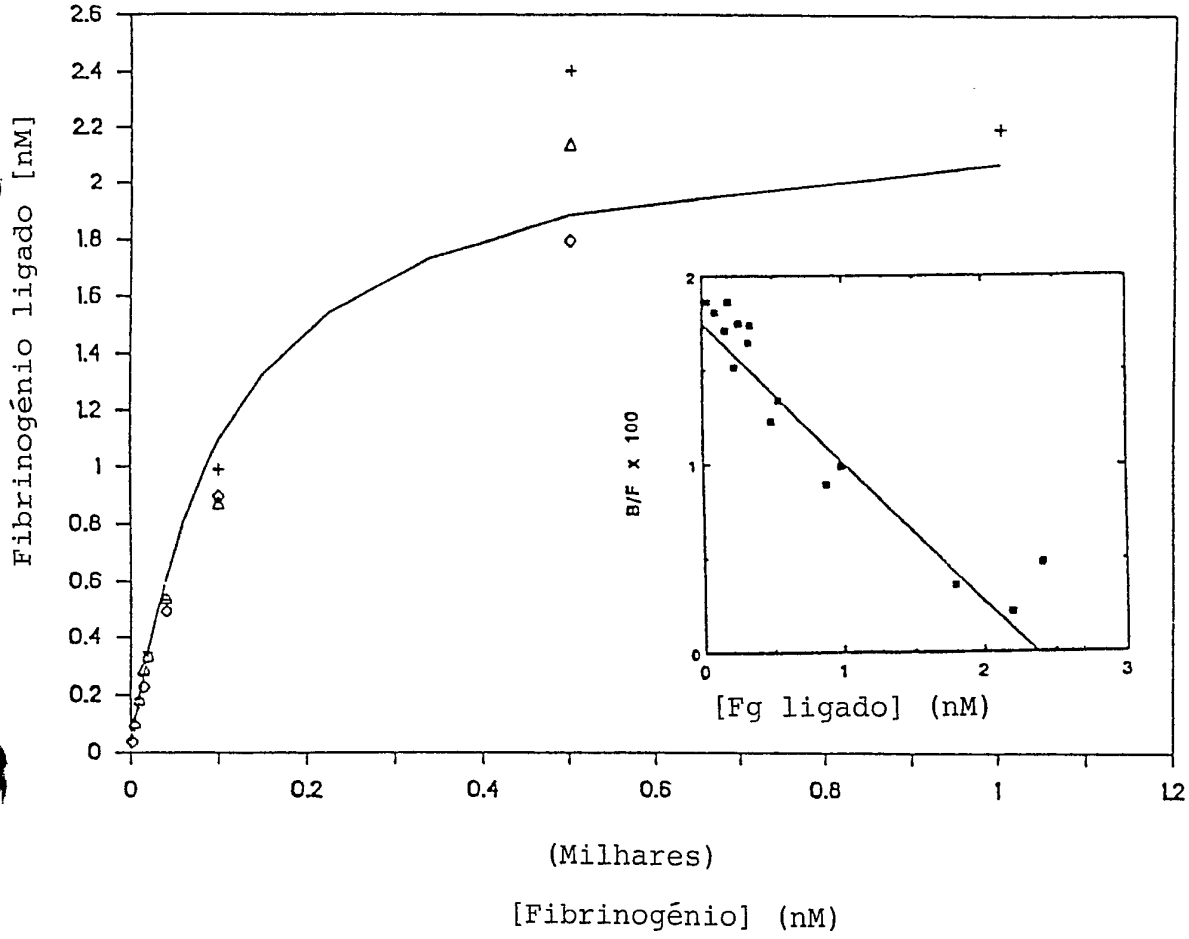

Fibrinogénio ligado [nM]
2.6
2.4
2.2
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
(Milhares)
[Fibrinogénio] (nM)
B/F x 100
2
1
0
0
1
2
3
[Fg ligado] (nM)

FIGURA 4