

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99 754

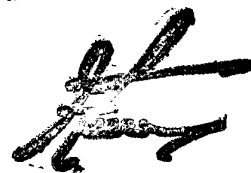
REQUERENTE: THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, norte-americana, com sede em 10666 North Torrey Pines Road La Jolla, California 92037, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de análogos polipeptídicos de apolipoproteína E e de composições farmacêuticas e processo de determinação da quantidade de apo E numa amostra de fluido vascular"

INVENTORES: Cheryl A. Dyer, Linda K. Curtiss e Richard Smith

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 10 de Dezembro de 1990 sob o nº 07/625 093, em 30 de Setembro de 1991 sob o nº 07/769 629 e em 9 de Dezembro de 1991 sob o nº 07/805 193



PATENTE Nº 99 754

"Processo de preparação de análogos polipeptídicos de apolipoproteína E e de composições farmacêuticas e processo de determinação da quantidade de apo E numa amostra de fluido vascular"

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de um polipéptido compreendendo uma pluralidade de segmentos, tendo o referido polipéptido a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos e/ou a secreção de androgénios ováricos e possuindo cada segmento uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Leu-Arg-Xaa-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Xbb,

onde Xaa é Lys ou Ala, e Xbb é Arg ou Ala, caracterizado por se proceder a uma síntese por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes ou por adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia polipeptídica em crescimento.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de composições farmacêuticas e ao processo de determinação da quantidade de apo E numa amostra de fluido vascular.

MEMÓRIA DESCRITIVACampo Técnico

O presente invento refere-se a polipéptidos capazes de mimetizarem a capacidade da apolipoproteína (apo) E para induzir a função celular diferenciada. Mais particularmente, o presente invento refere-se a análogos da Apo E úteis para inibir a proliferação de linfócitos e/ou a secreção de androgénios ováricos. O presente invento também se refere ao aumento da clearance do colesterol mediada por estes polipéptidos de ligação ao receptor (competentes para o receptor). A esse respeito, o presente invento refere-se à utilização de péptidos em tandem sintéticos para modular a absorção pelas células hepáticas de proteínas contendo colesterol e a processos de diagnóstico utilizando estes péptidos e os seus anticorpos para avaliar a eficácia destas medidas terapêuticas.

Antecedentes

As lipoproteínas são os transportadores primários do colesterol plasmático. Elas são complexos micelares de lípido-proteína (partículas), possuindo uma película superficial composta por uma ou mais proteínas associadas com lípidos polares, que rodeia um núcleo contendo colesterol. A classificação original das lipoproteínas foi baseada nas suas densidades de flutuação medidas por ultracentrifugação. Assim, foram reconhecidas quatro classes principais de densidades, existindo sub-classes dentro destas.

A primeira classe compreende as quilomicra. São as lipoproteínas maiores e são ricas em triglicéridos. O local de origem das quilomicra é o intestino. Quando as quilomicra são expostos in vitro ao plasma ou a lipoproteína de alta densidade (HDL), a maior parte do seu complemento de apolipoproteínas A é perdida e são adquiridas as apolipoproteínas C e E. As quilomicra também contêm a apolipoproteína B-48.

A segunda classe de lipoproteínas, as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), é constituída por partículas

formadas no fígado e envolvidas no metabolismo dos triglicéridos e no seu transporte a partir do fígado. As apolipoproteínas, apo B-100 e apo E, são os constituintes principais da partícula de VLDL.

A terceira classe de lipoproteínas, compreendendo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), é um produto específico do catabolismo das VLDL. A apolipoproteína predominante nas partículas de LDL é a apolipoproteína B-100 ou apo B-100.

A quarta classe, lipoproteína de alta densidade (HDL), contém duas apolipoproteínas principais, a apo A-I e a apo A-II. Uma função da apo A-I é a activação da enzima plasmática, lecitina-colesterol-aciltransferase que é necessária para a esterificação do colesterol livre nas HDL para o transporte para o fígado.

O colesterol plasmático é regulado em parte pelo receptor de LDL e em parte pela capacidade da lipoproteína para transportar colesterol e ligar o receptor de LDL. Hofmann, e colab., Science, 239:1277 (1988). Este receptor é encontrado na superfície de todas as células onde medeia a ligação e internalização das lipoproteínas ricas em colesterol que proporcionam o colesterol de membrana; Brown, e colab., J. Clin. Invest., 55:783 (1975); Goldstein, e colab., Methods Enzymol., 98:241 (1983); e em algumas células especializadas, colesterol substrato para a produção de ácidos biliares ou hormonas esteróides; Gwynne, e colab., Endocr. Rev., 3:299 (1982). A expressão do receptor de LDL nas células é inversamente regulada pela concentração circulante de LDL, isto é, quanto mais elevada a concentração de LDL circulante menos são os receptores de LDL na superfície celular; Hofmann, e colab., Science, 239:1277 (1988). A ligação da LDL ao receptor de LDL tem sido o foco de muitas pesquisas dada a sua importância na regulação do nível de colesterol plasmático, o qual é considerado um factor principal de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronária; Brown, e colab., Scient. Amer., 251:58 (1984).

Acredita-se que a ligação da LDL ao receptor de LDL esteja dependente da espécie de apolipoproteína presente na partícula de lipoproteína.

Quando comparada com as apolipoproteínas A-1 ou B, a concentração relativa da apo E no plasma é baixa. Contudo, a apo E é, de várias formas, um instrumento no metabolismo das lipoproteínas. Mahley, e colab., J. Lipid Res., 25:1277-1294 (1984). É o local de reconhecimento para vários receptores de lipoproteínas celulares, incluindo receptores de hepatócito para quilomicra e VLDL residuais [Hui, e colab., J. Biol. Chem., 259:860-869 (1984); Shelburne, e colab., J. Clin. Invest., 65:652-658 (1980)], receptores para LDL em células hepáticas e extra-hepáticas [Hui, e colab., J. Biol. Chem., 256:5646-5655 (1981)], e receptores para VLDL em macrófagos [Wang-Iverson e colab., Biochem. Biophys. Res. Commun., 126:578-586 (1985)].

As lipoproteínas são eliminadas do plasma por ligação a receptores de alta afinidade nas células do fígado e nos tecidos extra-hepáticos, tais como glândulas supra-renais e ovários. Kowal, R.C. e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5810-5814, (1989). O receptor de LDL liga especificamente a apo E e as lipoproteínas portadoras de apo B, R. W. Mahley, Science, 240:622 (1988). Assim, a apo E tem importância clínica devido ao seu papel na ligação do receptor de LDL em facilitar a clearance do colesterol.

A região de ligação ao receptor de LDL da apo E foi mapeada até uma sequência interna que inclui os resíduos de aminoácido 140 a 160. Weisgraber, e colab., J. Biol. Chem., 258:12348 (1983). Adicionalmente, a apo E liga o receptor de LDL apenas quando está associada com uma lipoproteína ou fosfolípido [Innerarity, e colab., J. Biol. Chem., 254:4186 (1979)], e 4 moléculas de apo E ligam o receptor de LDL com uma afinidade que é 10 a 25 vezes maior do que a ligação de uma molécula única de apo B. R. W. Mahley, Science, 240:622 (1988).

Dois conjuntos distintos de receptores ligam as

lipoproteínas contendo apo E. Os receptores de LDL [Yamamoto e colab., Cell, 39:27-38 (1984)], 70% dos quais se pensa estarem localizados nas células hepáticas, ligam VLDL e resíduos de quilomicra contendo apo E. A existência de um segundo conjunto de receptores de LDL, denominada "receptores residuais", é inferida de estudos que mostram que a clearance plasmática dos resíduos de quilomicra contendo apo E ocorre a taxas normais em animais com receptores de LDL geneticamente defeituosos.

Recentemente, uma proteína relacionada com o receptor de LDL (LRP) foi encontrada na superfície de células hepáticas. Herz e colab., EMBO, 7:4119-4127 (1988). A LRP partilha sequências de repetição de cisteína com a LDL e mostrou-se que liga e medeia a clearance extracelular de lipoproteínas contendo apo E. Kowal, R.C. e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5810-5814 (1989).

Também foi descrito que lipoproteínas enriquecidas em apo E apresentam uma função no sistema imunitário por inibição, in vitro e in vivo, da proliferação de linfócitos estimulada por antigénio ou mitogénio. No ovário, a apo E inibe a produção de androgénios pelas células intersticiais e da teca cultivadas, estimuladas por LH; Dyer, e colab., J. Biol. Chem., 263:10965 (1988).

Em 1976 foi descrito que uma fracção lipoproteica discreta isolada a partir do plasma humano normal, inibia a proliferação in vitro de linfócitos humanos estimulada por células alogénicas e mitogénios in vitro (Curtiss e colab., J. Immunol., 116:1452, (1976)). Esta lipoproteína inibidora plasmática foi designada LDL-In de Lipoproteína de Baixa Densidade Inibidora, porque a fracção activa está localizada numa sub-fracção menos densa da LDL total de densidade 1,006-1,063 g/ml. As características da inibição in vitro mediada pela LDL-In são as seguintes: a LDL-In possui actividade inibidora comparável para a proliferação de linfócitos humanos estimulada por células alogénicas, mitogénio de pokeweed (PWM), e fito-hemaglutinina (PHA). A actividade inibidora da LDL-In é não tóxica e independente da concentração

de mitogénio. A supressão pela LDL-In é dependente do tempo e são necessárias aproximadamente 18 horas de exposição da lipoproteína aos linfócitos antes da estimulação para indução máxima de um estado suprimido estável. A LDL-In não inibe a incorporação de ^3H -timidina quando é adicionada às culturas 18-20 horas após a estimulação, sugerindo que esta lipoproteína influencia os acontecimentos metabólicos associados com uma fase indutiva precoce da activação dos linfócitos.

A actividade imunossupressora da LDL-In foi estudada num certo número de sistemas in vitro e in vivo. Resumindo, as actividades in vitro da LDL-In incluem a supressão de: a) absorção de ^3H -timidina estimulada por mitogénio, Curtiss e colab., J. Immunol., 116:1452, (1976), b) incorporação de ^3H -timidina estimulada por células alogénicas (Curtiss e colab., J. Immunol., 116:1452, (1976), Curtiss e colab., J. Immunol., 118:1966, (1977)), c) a geração primária de células T citotóxicas (Edgington e colab., Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation : Proceedings of the Eleventh Leukocyte Culture Conference., D.O. Lucas, ed. Academic Press, Nova Iorque, pág. 736, (1977)), d) a síntese de imunoglobulina estimulada por mitogénio pokeweed (Curtiss e colab., J. Clin. Invest., 63:193, (1979)), e e) transformação de células B por vírus de Epstein Barr (Chisari e colab., J. Clin. Invest., 68:329, (1981)). In vivo mostrou-se que a LDL-In inibe: a) a resposta imunitária humoral primária a eritrócitos de carneiro (Curtiss e colab., J. Immunol., 118:648, (1977), DeHeer e colab., Immunopharmacology, 2:9, (1979), Curtiss e colab., Cell. Immunol., 49:1, (1980)), b) a geração primária de células T citotóxicas (Edgington e colab., Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation : Proceedings of the Eleventh Leukocyte Culture Conference., D.O. Lucas, ed. Academic Press, Nova Iorque, pag. 736, (1977)), e c) a atenção imunológica do crescimento tumoral (Edgington e colab., Cancer Res., 41:3786, (1981), Edgington e colab., Dietary Fats and Health., Monografia de ACOS N°. 10, Perkins e Visek, ed., pág. 901, (1981)).

Os efeitos, in vivo, das lipoproteínas sobre a função

celular imunitária são extremamente complexos. Um resultado importante da investigação das implicações fisiológicas da imunossupressão, in vivo, pela LDL-In é a de que o resultado funcional observado é notavelmente dependente da dose. Este conceito importante é melhor ilustrado pela descrição detalhada de estudos dos efeitos da LDL-In sobre a sobrevivência de animais experimentais desafiados com tumores singénicos (Edgington e colab., Cancer Res., 41:3786, (1981), Edgington e colab., Dietary Fats and Health., Monografia de ACOS N°. 10, Perkins e Visek, ed., pág. 901, (1981)). Observam-se, efeitos aparentemente divergentes da LDL-In sobre o crescimento do fibrossarcoma SaD2 singénico em ratinhos DBA/2. O crescimento de 1×10^5 células tumorais viáveis em ratinhos de controlo sem imunoprotecção (isto é, 10 dias antes da imunização com 10^6 células tumorais irradiadas) é detectado ao dia 25 e prossegue rapidamente até à morte cerca do dia 43. Em contraste, o crescimento tumoral é mais lento em ratinhos imunoprotectidos. Este crescimento tumoral é caracterizado por uma redução na massa tumoral em pelo menos metade, e em nenhuma morte pelo dia 60. A administração intravenosa de doses elevadas de LDL-In 24 horas antes da imunoprotecção com células tumorais mortas anula o efeito protector da imunização. Esta dose corresponde a uma dose que é necessária para anular as funções celulares efectoras das células B e das células T. A administração de uma dose intermédia de LDL-In antes da imunoprotecção com as células tumorais mortas não apresenta efeito perceptível sobre o crescimento subsequente das células tumorais viáveis de desafio. Em contraste, a administração intravenosa de doses ainda menores de LDL-In 24 horas antes da imunoprotecção com células tumorais mortas origina o aumento da rejeição tumoral e da sobrevivência do hospedeiro. Esta dose de LDL-In é concordante com a dose necessária para a inibição selectiva in vitro da função celular supressora (Curtiss e colab., J. Clin. Invest., 63:193, (1979)). Assim, dependendo da quantidade de lipoproteína imunorreguladora a que uma população de linfócitos particular é exposta in vivo, surgirão resultados funcionais muito diferentes.

A comprovação adicional de que as lipoproteínas contendo apo E e apo B são reguladores importantes da função dos linfócitos surgiu de estudos das propriedades inibidoras das lipoproteínas plasmáticas do sangue do cordão fetal (Curtiss e colab., J. Immunol., 133:1379, (1984)). Nestes estudos, foi estabelecida uma correlação directa entre a apo E e a inibição.

Cardin e colab., Biochem. Biophys. Res. Comm., 154:741-745 (1988) descreveram que uma porção polipeptídica da apo E possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido idêntica à dos resíduos 141-155 da apo E inibe a proliferação de linfócitos quando acoplada à albumina de soro de bovino (BSA). Contudo, do estudo de Cardin e colab. encontra-se manifestamente ausente qualquer controlo para a viabilidade celular permitindo determinar se a inibição observada foi devida ou não à citotoxicidade do conjugado péptido-BSA.

Como antecedentes adicionais, Dyer e colab., J. Biol. Chem., 263:10965-10973 (1988), descreveram que a Apo de ratazana, isenta de lípidos, isolada, inibe a produção de androgénios pelas células intersticiais e da teca ováricas induzida pela gonadotropina, hormona luteinizante (LH).

Mais recentemente, Dyer e colab., J. Biol. Chem., 266:15009-15015, (1991), mostraram que apenas os multímeros e não os monómeros, do polipéptido p141-155 da apo E exibem a actividade biológica da apo E

Breve Sumário do Invento

Verificou-se agora que a sequência de resíduos de aminoácido correspondente aos resíduos 141-150 da apo E madura define o local da apo E envolvido na ligação ao receptor de LDL. Os polipéptidos derivados da região 141-150 da apo E podem mimetizar a actividade biológica da apo E quando presentes como um péptido multimérico ou como um auto-conjugado. Um polipéptido de apo E multimérico é útil para a preparação de anticorpos e em processos de diagnóstico para monitorizar as quantidades de antígenos de apo E num fluido corporal vascular.

Assim, o presente invento contempla um análogo polipeptídico da apo E caracterizado por uma pluralidade de segmentos, cada um deles incluindo uma sequência de resíduos de aminoácido relacionada com a sequência correspondente aos resíduos 141-150 de apo E, por exemplo, (LRKLRKRLLR)_a, onde a é um número inteiro de pelo menos 2, indicando o número de vezes que a sequência dentro de parênteses está presente na estrutura primária do polipéptido.

Noutra concretização, o presente invento abrange um auto-conjugado do polipéptido anterior, isto é, possuindo múltiplos polipéptidos operativamente ligados uns aos outros por uma ligação diferente de uma ligação peptídica entre o grupo alfa-amino e o grupo carboxilo de resíduos de aminoácido contíguos.

Os polipéptidos e conjugados do presente invento são agentes úteis para modular a função celular diferenciada, como a proliferação de linfócitos, a produção de androgénios ováricos, a ligação e degradação de LDL e semelhantes. Também são contempladas composições terapêuticas contendo um polipéptido ou conjugado deste invento num excipiente farmacologicamente aceitável, tipicamente sob a forma de dose unitária, para modular a função celular diferenciada.

Outro aspecto contemplado por este invento é uma composição compreendendo moléculas de anticorpo que imunorreagem com um polipéptido deste invento e com apo E/VLDL, mas não imunorreagem com o polipéptido p93-112 ou p172-182 e, preferivelmente, não imunorreagem com um polipéptido contendo apenas um monómero de p141-150.

É ainda contemplado um processo para a detecção de antigénios de apo E numa amostra de fluido vascular pela mistura da amostra com um anticorpo anti-apo E deste invento para formar uma mistura de imunorreacção, sendo o anticorpo preferivelmente operativamente ligado a um suporte sólido, de modo que a mistura de imunorreacção possui uma fase líquida e

uma fase sólida. Esta mistura de imunorreacção é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção de apo E. Em seguida, a quantidade de produto de imunorreacção assim formado é detectada e consequentemente é determinada a quantidade de antigénio apo E presente na amostra de fluido vascular.

É ainda contemplado um sistema de diagnóstico, sob a forma de conjunto, compreendendo uma composição de anticorpo deste invento numa quantidade suficiente para executar pelo menos um ensaio.

É também contemplado um processo para monitorizar a eficácia de um regime terapêutico para facilitar a clearance do colesterol. Este processo compreende (i) a determinação da quantidade total de componentes de apo E num fluido vascular, e (ii) a determinação da quantidade de apo E eficaz associada com partículas lipoproteicas contendo colesterol num fluido vascular. Assim, é determinada a razão de receptor de apo E total/apo E competente, e a razão resultante é relacionada com níveis de concentração predeterminados que foram previamente correlacionados com o grau de eficiência da clearance do colesterol.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 ilustra que o péptido de apo E em tandem p(141-155)₂ afecta a ligação e degradação da LDL de forma bifásica, dependente da dose, tal como determinado no Exemplo 9. Na Figura 1A, concentrações crescentes de competidor compreendendo o péptido em tandem p(141-155)₂, LDL, monómero p141-155 de controlo e p74-105 de controlo derivado da apolipoproteína AI (AI 74-105) foram adicionadas a culturas de células THP-1, simultaneamente com a adição de ¹²⁵I-LDL.

A Figura 1B mostra a especificidade da ligação do péptido em tandem aos receptores de LDL. As células THP-1 foram estimuladas com PMA durante 4 dias. A LDL foi acetilada, radiomarcada, e foi usada ¹²⁵I-aLDL no estudo de ligação, na

presença de concentrações variáveis dos competidores indicados. Após 5 horas a 37°C, as razões B/B_0 foram analisadas e expressas como na figura 1A. Nem a LDL nem o péptido em tandem inibiram a degradação da ^{125}I -aLDL (Figura 1B), mas o péptido em tandem provocou uma inibição de 80% na degradação da ^{125}I -LDL (Figura 1A).

A Figura 2 ilustra que as substituições de aminoácidos específicos no péptido em tandem $p(141-155)_2$ alteram a sua capacidade para inibir a ligação da ^{125}I -LDL aos fibroblastos, quando medida como descrito no Exemplo 10. Cada ponto é a média de 3 réplicas por tratamento com o SEM<10%. Estão representados: o péptido em tandem nativo $p(141-155)_2$, e o péptido em tandem apresentando as substituições Lys 143→Ala; Leu 144→Pro; e Arg 150→Ala.

A Figura 3 ilustra que o péptido trimérico $p(141-155)_3$ é um inibidor mais potente da degradação da LDL de fibroblasto do que o péptido em tandem $p(141-155)_2$, quando ensaiado como descrito no exemplo 11. Cada ponto é a média de 5 réplicas por tratamento com SEM<10% e os resultados são expressos como B/B_0 , como descrito na legenda da Figura 1. Estão representados o péptido trimérico $p(141-155)_3$, o péptido em tandem $p(141-155)_2$, o péptido monomérico $p(141-155)$ e um péptido de apo AI de controlo (AI 74-105).

A Figura 4 ilustra os efeitos sobre a proliferação de linfócitos de monómeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros de apo E (141-155), como descrito no Exemplo 17. (círculo a branco = monómero; círculo a cheio = dímero; triângulo a branco = trímero; triângulo a cheio = tetrâmero; quadrado a branco = solução salina tamponada com fosfato).

A Figura 5 ilustra os efeitos sobre a proliferação de linfócitos de substituições de aminoácidos simples em ambas as posições do péptido em tandem $p(141-155)_2$. Os ensaios foram executados como no Exemplo 2, e as substituições foram idênticas às do Exemplo 10. (círculo a cheio = $p(141-155)_2$ em tandem não

substituído; quadrado a branco = péptido em tandem com substituição Leu 144 → Pro; triângulo a branco = péptido em tandem com substituição Arg 150 → Ala; triângulo a cheio = péptido em tandem com substituição Lys 143 → Ala).

A Figura 6 ilustra os efeitos sobre a proliferação de linfócitos de vários polipéptidos derivados da sequência de apo E e descritos no Exemplo 19. (círculo a cheio = p(141-155)₂; quadrado a branco = p(144-150)₂; círculo a branco = p(145-155)₂; triângulo a cheio = p(141-150)₂.

A Figura 7 ilustra os efeitos sobre a proliferação de linfócitos de vários polipéptidos derivados da sequência de apo E e descritos no Exemplo 19. (quadrado a branco = dímero p(141-155)₂; triângulo a cheio = p(LLRK)₄; triângulo a cheio = p(LLRK)₈; quadrado a cheio = controlo de tampão Tris.

Descrição Detalhada do Invento

A. Definições

Resíduo de Aminoácido: Os resíduos de aminoácido aqui descritos encontram-se preferivelmente sob a forma isomérica "L". Contudo, qualquer resíduo de L-aminoácido pode ser substituído pela forma isomérica "D", desde que a propriedade funcional desejada seja mantida pelo polipéptido. NH₂ refere-se ao grupo amino livre presente no terminal amino de um polipéptido. COOH refere-se ao grupo carboxilo livre presente no terminal carboxilo de um polipéptido. De acordo com a nomenclatura comum dos polipéptidos, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), as abreviaturas para os resíduos de aminoácido estão representadas na Tabela de Correspondência seguinte:

(segue Tabela)

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

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

Deve referir-se que todas as sequências de resíduos de aminoácido são aqui representadas por fórmulas cuja orientação da esquerda para a direita se encontra na direcção convencional do terminal amino para o terminal carboxilo. Além disso, deve referir-se que um travessão no início ou no fim de uma sequência de resíduos de aminoácido indica uma ligação peptídica a uma sequência adicional de um ou mais resíduos de aminoácido.

Polipéptido: refere-se a uma série linear de resíduos de aminoácido ligados uns aos outros por ligações peptídicas entre

o grupo amino alfa e o grupo carboxilo de resíduos de aminoácido contíguos.

Péptido: tal como aqui usado, refere-se a uma série linear de não mais do que cerca de 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros como num polipéptido.

Proteína: refere-se a uma série linear de mais de 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros como num polipéptido.

Péptido Sintético: refere-se a uma cadeia produzida quimicamente de resíduos de aminoácido ligados uns aos outros por ligações peptídicas e que está isenta de proteínas e que ocorrem naturalmente e de seus fragmentos.

B. Polipéptido de Apo E

O presente invento contempla um polipéptido capaz de mimetizar substancialmente a capacidade da apo E para induzir função celular diferenciada, como a degradação de LDL hepática, a proliferação de linfócitos, a secreção de androgénios pelas células intersticiais e da teca ováricas e semelhantes. Isto é, um polipéptido objecto que actua como um análogo da apo E pelo menos no que diz respeito à capacidade da apo E para inibir a proliferação de linfócitos e/ou a secreção de androgénios ováricos e ao aumento da absorção de LDL pelos hepatócitos.

Um polipéptido objecto é ainda caracterizado por compreender uma pluralidade de segmentos derivados da apo E (regiões) na estrutura primária do polipéptido, sendo cada um dos segmentos definido por uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Leu-Arg-Xaa-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Xbb,

onde Xaa é Lys ou Ala e Xbb é Arg ou Ala.

Preferivelmente, o polipéptido compreende uma pluralidade

de segmentos, cada um deles possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Leu-Arg-Xaa-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Xbb-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu,

onde Xaa é Lys ou Ala e Xbb é Arg ou Ala.

Numa concretização, um segmento incluído num polipéptido possui uma sequência de resíduos de aminoácido que corresponde à sequência de resíduos de aminoácido da apolipoproteína E. Contudo, são descritas certas substituições de aminoácidos pelo que a sequência polipeptídica pode diferir de uma sequência de apo E. Os polipéptidos preferidos podem incluir as substituições descritas na fórmula anterior nos resíduos Xaa e Xbb, correspondendo às posições 143 e 150, respectivamente, da apo E.

Assim, numa concretização preferida, os polipéptidos preferidos compreendem uma pluralidade de segmentos em que, pelo menos, um dos segmentos possui uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente a uma fórmula seleccionada de entre o grupo constituído por:

- (1) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg,
- (2) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg,
- (3) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala,
- (4) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala,
- (5) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu,
- (6) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu,
- (7) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu,
- e
- (8) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu.

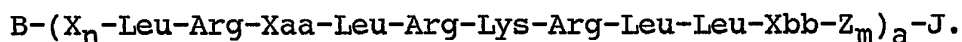
Os segmentos derivados da apo E são capazes de se ligarem ao receptor de LDL e/ou à proteína relacionada com o receptor de LDL [Herz e colab., EMBO Journal, 7:4119-4129 (1988)], como é evidenciado pela capacidade da ligação ser competitivamente inibida como aqui é mostrado.

Os segmentos derivados da apo E podem ser adjacentes e/ou contíguos dentro da cadeia polipeptídica, sendo os segmentos adjacentes separados na sequência de resíduos de aminoácido do polipéptido por um ou mais resíduos espaçadores. Preferivelmente, os resíduos espaçadores originam um segmento espaçador na gama de cerca de 1 a cerca de 20, preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 15 e mais habitualmente cerca de 10, resíduos de aminoácido de comprimento.

Além disso, um polipéptido objecto pode conter um segmento de comando de 1, convenientemente, até cerca de 33, tal como cerca de 11, cerca de 18 ou cerca de 22 resíduos de aminoácido, localizados no sentido do terminal amino em relação ao terminal amino do segmento espaçador ou derivado da apo E.

Duma forma semelhante, um polipéptido objecto não precisa terminar com o resíduo do terminal carboxilo de um segmento derivado de apo E ou de um segmento espaçador. Pode estar presente um segmento de cauda do terminal carboxilo contendo de 1, convenientemente, até cerca de 33, tal como cerca de 11, cerca de 18 ou cerca de 22, resíduos de aminoácido.

Os polipéptidos preferidos do presente invento podem ser definidos pela fórmula I:



Na fórmula anterior, B é um grupo NH_2 amino terminal ou um segmento de comando anteriormente discutido; J é um grupo COOH carboxi terminal ou um segmento de cauda previamente discutido; X e Z são, respectivamente, os primeiro e segundo segmentos espaçadores cujas sequências de resíduos de aminoácido podem ser iguais ou diferentes; n é 1 ou 0, de modo que quando n é 1, X está presente, e quando n é 0, X não está presente; m é 1 ou 0 de modo que quando m é 1, Z está presente, e quando m é 0, Z não está presente; quando Xaa é Lys ou Ala, Xbb é Arg ou Ala; e a é um número inteiro de 2 a cerca de 10, mais preferivelmente de 2 a cerca de 5 e usualmente 2 a 3, indicando o número de vezes que

a sequência de resíduos de aminoácido entre parentêses está presente (repetida) na estrutura primária polipeptídica. Preferivelmente, a sequência entre parênteses corresponde na sua totalidade, e preferivelmente é idêntica, a uma porção da sequência de resíduos de aminoácido da apo E.

Em polipéptidos preferidos de acordo com a fórmula I, n é 0 e m é 0. Noutra concretização, B é um grupo NH_2 amino terminal, J é um grupo COOH carboxi terminal, n é 0, e m é 0. Mais preferivelmente, B é um grupo NH_2 amino terminal, J é um grupo COOH carboxi terminal, n é 0, m é 0, e a é 2, 3 ou 4.

Com base na presente descrição, também se verificou que o elemento funcional de um polipéptido análogo da apo E deste invento que transmite as propriedades de um mimético da apo E envolve a alternância de resíduos de aminoácido hidrofóbicos e básicos para mimetizar o elemento (segmento) de repetição de um polipéptido do invento. Esta concretização tem por base a verificação de que a porção activa de ligação ao receptor de LDL da apo E reside na região p141-150 e na verificação adicional de que análogos com as repetições em tandem contendo dois resíduos básicos tais como arginina e lisina e espaçadores hidrofóbicos tais como leucina-leucina, podem formar um análogo activo.

Assim, numa concretização relacionada, o presente invento contempla um análogo polipeptídico de apo E possuindo as propriedades de um polipéptido objecto, o qual pode ser representado de acordo com a fórmula II:



na qual Z é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, B é um resíduo de aminoácido básico, n é 2 a 100, preferivelmente 2 a 20 e, mais preferivelmente, 2 a 3, m é 2 a 4, preferivelmente 2, e a é 2 a 100, preferivelmente 2 a 50, e mais preferivelmente 2 a 8. Em concretizações preferidas, Z é isoleucina, leucina ou valina. Em concretizações preferidas, B é arginina, lisina ou histidina,

e mais preferivelmente é arginina ou lisina.

Nesta concretização, análogos polipeptídicos ilustrativos e preferidos possuem a fórmula $p(\text{LLRK})_4$ e $p(\text{LLRK})_8$.

Polipéptidos particularmente preferidos deste invento são aqueles cujas fórmulas estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1

<u>Designação¹</u>	<u>Sequências de Resíduos de Aminoácido</u>
$p(141-150)_2$	LRKLRKRLRLRKLRKRLR
$p(141-155)_2$	LRKLRKRLLRDADDLLRKLRKRLRDADD
$p(K_{143}-A)_2$	LRALRKRLLRDADDLLRALRKRLRDADD
$p(K_{150}-A)_2$	LRKLRKRLLDADDLLRKLRKRLLDADD
$p(141-155)_3$	LRKLRKRLLRDADDLLRKLRKRLRDADD- LRKLRKRLLRDADDL
$p(141-155)_4$	LRKLRKRLLRDADDLLRKLRKRLRDADD- LRKLRKRLLRDADDLLRKLRKRLRDADD
$p(129-163)_2$	STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ- STEELRVRLASHLRKLRKRLLRDADDLQKRLAVYQ
$p(\text{LLRK})_4$	LLRKLLRKLLRKLLRK
$p(\text{LLRK})_8$	LLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRK

¹ A designação de cada péptido indica a posição dentro da sequência de resíduos de aminoácido da proteína de apo E madura à qual a sequência peptídica corresponde, isto é, da qual é derivada, ou indica uma fórmula representativa da sequência mostrada. $p(K_{143}-A)_2$ refere-se a $p(141-155)_2$ excepto que uma lisina (K) na posição 143 é substituída por uma alanina (A) em ambas as cópias do segmento 141-155, e $p(K_{150}-A)_2$ refere-se a $p(141-155)_2$ excepto que uma arginina (R) na posição 150 é substituída por uma alanina (A) em ambas as cópias do segmento 141-155.

Deve referir-se que $p(129-163)_2$ contém um segmento de comando de 12 resíduos STEELRVRLASSH (resíduos 1-12), um segmento espaçador de 20 resíduos QKRLAVYQSTEELR-VRLASH (resíduos 28-47), e um segmento de cauda de 8 resíduos QKRLAVYQ

(resíduos 63-70). A designação $p(141-155)_2$ define um péptido de apo E em tandem que contém duas sequências adjacentes do segmento p141-155. Um polipéptido preferido adicional é um "trímero" contendo três sequências adjacentes do segmento p141-155, designado $p(141-155)_3$. Também são preferidos os auto-conjugados dos péptidos de apo E em tandem designados por $p(141-155)_2$ - $p(141-155)_2$, e os péptidos de apo E triméricos designados $p(141-155)_3$ - $p(141-155)_3$. A designação $p(141-150)_2$ define um péptido de apo E em tandem que contém duas sequências adjacentes do segmento p141-150. Também estão representados na Tabela 1, um tetrâmero de $p(141-155)$ e dois dímeros de $p(141-155)$, os quais contêm substituições nas posições 143 ou 150 da apo E.

Um polipéptido preferido deste invento, numa concretização, possui uma sequência correspondente à designação seleccionada de entre o grupo constituído por $p(141-150)_2$, $p(141-155)_2$, $p(141-155)_3$, $p(141-155)_4$, $p(K_{143}-A)_2$, $p(K_{150}-A)_2$ e $p(129-163)_2$, cujas sequências estão representadas na Tabela 1.

Um polipéptido objecto contém tipicamente um total de cerca de 30 a cerca de 450 resíduos de aminoácido, preferivelmente cerca de 60 a cerca de 120 resíduos. Tipicamente, um polipéptido objecto contém não mais do que cerca de 100, preferivelmente não mais do que cerca de 70, e habitualmente não mais do que cerca de 30 ou 40 resíduos de aminoácido na sua sequência primária.

Um polipéptido objecto inclui qualquer análogo, fragmento ou derivado químico de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácido está aqui representada, desde que o polipéptido seja capaz de induzir a função celular diferenciada duma forma correspondente à da apo E. Consequentemente, um polipéptido presente pode ser submetido a várias alterações, substituições, inserções e deleções, desde que as referidas alterações proporcionam certas vantagens na sua utilização.

O termo "análogo" inclui qualquer polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido substancialmente idêntica a uma sequência aqui especificamente mostrada, na qual um ou mais

resíduos foram substituídos conservativamente com um resíduo funcionalmente semelhante e que apresenta a capacidade de mimetizar a apo E, tal como aqui descrito. Exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo não polar (hidrofóbico) tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, a substituição de um resíduo polar (hidrofílico) por outro, tal como entre arginina e lisina, entre glutamina e asparagina, entre glicina e serina, a substituição de um resíduo básico tal como lisina, arginina ou histidina por outro, ou a substituição de um resíduo ácido tal como ácido aspártico ou ácido glutâmico por outro.

3 A frase "substituição conservativa" também inclui a utilização de um resíduo derivado quimicamente no lugar de um resíduo não derivado, desde que esse polipéptido apresente a actividade de ligação requerida.

"Derivado químico" refere-se a um polipéptido objecto possuindo um ou mais resíduos derivados quimicamente por reacção de um grupo lateral funcional. As referidas moléculas derivadas incluem, por exemplo, aquelas moléculas nas quais os grupos amino livres foram derivados para formar hidrocloreto de amina, grupos p-toluenossulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo ou grupos formilo. Os grupos carboxilo livres podem ser derivados para formar sais, ésteres de metilo e etilo, ou outros tipos de ésteres ou hidrazidas. Os grupos hidroxilo livres podem ser derivados para formar derivados O-acilo ou O-alquilo. O azoto do imidazolo da histidina pode ser derivado para formar a N-im-benzil-histidina. Também estão incluídos como derivados químicos aqueles péptidos que contêm um ou mais derivados dos aminoácido de ocorrência natural dos vinte aminoácidos comuns. Por exemplo: a prolina pode ser substituída por 4-hidroxiprolina; a lisina pode ser substituída por 5-hidroxilisina; a histidina pode ser substituída por 3-metil-histidina; a serina pode ser substituída por homo-serina; e a lisina pode ser substituída por ornitina. Os polipéptidos do presente invento também incluem qualquer polipéptido possuindo uma ou mais adições e/ou deleções, ou

resíduos relativos à sequência de um polipéptido cuja sequência é aqui apresentada, desde que a actividade requerida seja mantida.

O termo "fragmento" refere-se a qualquer polipéptido objecto possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido mais curta do que a de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácido é aqui apresentada.

Um polipéptido objecto pode ser preparado utilizando metodologias de ácido nucleico recombinante bem conhecidas na arte. Por exemplo, sequências de ADN úteis na produção de um polipéptido objecto encontram-se descritas em Paik e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3445-3449 (1985); McLean e colab., J. Biol. Chem., 259:6498-6504 (1984); e Rall e colab., J. Biol. Chem., 257:4171-4178 (1982). Um segmento de ADN que codifica um polipéptido deste invento pode ser sintetizado por técnicas químicas, por exemplo, pelo processo do fosfotriéster de Matteucci e colab., J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981). O segmento de ADN pode, em seguida, ser ligado num vector de expressão, e um hospedeiro transformado com o mesmo pode ser utilizado para produzir o polipéptido. Ver, por exemplo, Current Protocols In Molecular Biology, Ausubel e colab., John Willey & Sons, ed., Nova Iorque, NY; Patentes dos E.U.A. N° 4 237 224 e N° 4 356 270.

Encontram-se também contemplados como parte do presente invento os vectores de expressão recombinantes capazes de expressarem um polipéptido objecto, e os processos da sua utilização para a produção de um polipéptido objecto.

Um polipéptido objecto também pode ser preparado utilizando a técnica sintética de fase sólida inicialmente descrita por Merrifield, em J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963). Outras técnicas de síntese polipeptídica podem ser encontradas, por exemplo, em M. Bodanszky e colab., Peptide Synthesis, John Willey & Sons, 2ª ed.(1976), bem como noutros trabalhos de referência conhecidos dos peritos na arte. Pode ser encontrado



um sumário das técnicas de síntese polipeptídica em J. Stuart e J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 3ª ed., Neurath, H. e colab., ed., pág.104-237, Academic Press, Nova Iorque, NY (1976). Os grupos protectores adequados para utilização na referida síntese poderão ser encontrados nos textos anteriores, bem como em J.F.W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, Nova Iorque, NY (1973).

Em geral, esses processos sintéticos compreendem a adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos, a uma cadeia polipeptídica em crescimento. Normalmente, o grupo amino ou o grupo carboxilo do primeiro resíduo de aminoácido é protegido por um grupo protector selectivamente removível adequado. Para aminoácidos contendo um grupo reactivo lateral, tal como a lisina, é utilizado um grupo protector selectivamente removível diferente. Utilizando a síntese de fase sólida como um exemplo, o aminoácido protegido ou derivado é ligado a um suporte sólido inerte através do seu grupo amino ou carboxilo não protegido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é então selectivamente removido, e o próximo aminoácido, na sequência possuindo o grupo complementar (amino ou carboxilo) adequadamente protegido é misturado e feito reagir sob condições adequadas para formar a ligação amida com o resíduo já fixado ao suporte sólido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é de seguida removido deste resíduo de aminoácido recentemente adicionado, e o aminoácido seguinte (convenientemente protegido) é em seguida adicionado, e assim por diante. Depois de todos os aminoácidos desejados terem sido ligados na sequência apropriada, quaisquer grupos protectores do grupo lateral ou terminal restantes (e o suporte sólido) são removidos sequencial ou simultâneamente, para originar o polipéptido final.

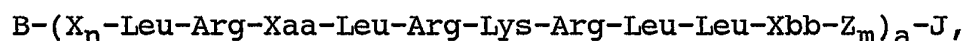
Qualquer péptido do presente invento pode ser utilizado na forma de um sal farmacêuticamente aceitável. Os ácidos adequados que são capazes de formar sais com os péptidos do presente invento incluem ácidos inorgânicos como ácido clorídrico, ácido

bromídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociânico, ácido sulfúrico, ácido acético-fosfórico, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinâmico, ácido naftalenossulfônico, ácido sulfanílico ou semelhantes.

As bases adequadas capazes de formarem sais com os péptidos do presente invento incluem bases inorgânicas como hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio e semelhantes; e bases orgânicas como mono-, di- e tri-alquil e aril aminas (por ex., trietilamina, diisopropilamina, metilamina, dimetilamina e semelhantes) e opcionalmente etanolaminas substituídas (por ex., etanolamina, dietanolamina e semelhantes).

C. Conjugados

O presente invento contempla ainda um análogo da apo E sob a forma de um conjugado polipeptídico constituído por uma pluralidade de polipéptidos operativamente ligados, por uma ligação diferente de uma ligação peptídica entre o grupo amino alfa e o grupo carboxilo de resíduos de aminoácido contíguos, onde pelo menos dois dos polipéptidos ligados possuem uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente àquela representada pela fórmula:



na qual B, X, Z, J, Xaa, Xbb, n, m e a são definidos como anteriormente discutido, com a exceção de a também poder ser o número inteiro 1.

Os auto-conjugados preferidos são o p141-150 ligado ao p141-150, designado por (p141-150)-(p141-150), e conjugados semelhantes do p141-150, e outros polipéptidos do invento.

Os conjugados adicionais contemplados compreendem um polipéptido de acordo com a fórmula II aqui descrita na ligação



operativa de um conjugado.

Em concretizações preferidas, um conjugado deste invento possui uma massa molecular inferior a cerca de 40 000 dalton, preferivelmente inferior a cerca de 20 000 dalton, e mais preferivelmente inferior a cerca de 10 000 dalton. Tipicamente, um conjugado objecto possui uma massa molecular de não mais do que cerca de 15 000 dalton, preferivelmente de não mais do que cerca de 8 000 dalton, e mais usualmente de não mais do que cerca de 4 000 dalton. Preferivelmente, o conjugado é dimérico ou trimérico, isto é, é essencialmente constituído por duas ou três cadeias polipeptídicas, respectivamente.

Um conjugado polipeptídico deste invento é adicionalmente caracterizado pela sua capacidade para mimetizar substancialmente a capacidade da apo E para induzir a função celular diferenciada, como a proliferação de linfócitos, a secreção de androgénios ováricos, e semelhantes. Os conjugados objecto também estão substancialmente isentos de toxicidade contra os linfócitos e as células ováricas (teca/intersticiais) produtoras de androgénios em concentrações de cerca de 20 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$).

As técnicas de conjugação ou acoplamento polipeptídico através de grupos funcionais activados, presentemente conhecidas na arte, são particularmente aplicáveis. Ver, por exemplo, Avrameas e colab., Scand. J. Immunol., vol. 8, supl. 7:7-23 (1978), e Patentes dos E.U.A. N° 4 493 795, N° 3 791 932 e N° 3 839 153. Além disso, pode ser efectuada uma reacção de acoplamento dirigida ao local, de modo que qualquer perda de actividade devida à orientação do polipéptido depois do acoplamento possa ser minimizada. Ver, por exemplo, Rodwell e colab., Biotech., 3:889-894 (1985), e Patente dos E.U.A. N° 4 671 958.

Podem ser adicionados um ou mais resíduos de aminoácido adicionais aos terminais amino ou carboxilo do polipéptido a fim de auxiliar na ligação do polipéptido para formar um conjugado.



Verificou-se que os resíduos de cisteína, geralmente adicionados ao terminal carboxilo do polipéptido, são particularmente úteis na formação de conjugados por meio de ligações dissulfureto, mas podem ser utilizados outros processos bem conhecidos na arte para a preparação de conjugados.

D. Composições para Modulação da Degradação Hepática da LDL

Considerando a capacidade dos polipéptidos e conjugados do presente invento para ligar o receptor de LDL presente nos hepatócitos, o presente invento contempla uma composição para modulação da absorção hepática de LDL. A composição compreende uma porção de ligação ao receptor de LDL operativamente ligada a uma porção de ligação à LDL. A porção de ligação ao receptor de LDL compreende um polipéptido e/ou conjugado do presente invento. Uma porção de ligação ao receptor de LDL preferida compreende o segmento polipeptídico de acordo com a fórmula I ou II anteriormente descrita. As porções de ligação ao receptor de LDL particularmente preferidas possuem uma sequência de resíduos de aminoácido mostrada na Tabela 1.

A porção de ligação ao receptor de LDL pode ser operativamente ligada à porção de ligação à LDL por uma ligação peptídica ou através de uma ligação covalente que não é uma ligação peptídica entre o grupo amino alfa e o grupo carboxilo de resíduos de aminoácido contíguos.

Uma porção de ligação à LDL pode ser uma molécula de anticorpo anti-LDL ou um seu fragmento imunologicamente activo. Moléculas de anticorpo anti-LDL ilustrativas são produzidas pelos hibridomas HB8746 e HB8742, que foram depositados na American Tissue Culture Collection (ATCC; Rockville, MD), produzindo ambas moléculas de anticorpo anti-apo B-100. O polipéptido e/ou conjugado de ligação ao receptor de LDL deste invento pode ser acoplado quimicamente tal como aqui anteriormente descrito para a molécula de anticorpo anti-LDL. Alternativamente, um polipéptido deste invento pode ser incorporado na sequência de resíduos de aminoácido primária da molécula de anticorpo por técnicas de ADN recombinante.



Tipicamente, o polipéptido de ligação ao receptor de LDL será incorporado ou substituirá uma porção de um dos domínios constantes da molécula de anticorpo. Ver Patentes dos E.U.A. N° 4 816 567, N° 4 816 397 e N° 4 647 334.

Em concretizações preferidas, a porção de ligação à LDL é uma sequência lipofílica (hidrofóbica) de resíduos de aminoácido. Mais preferivelmente, a porção de ligação à LDL é um segmento polipeptídico possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido capaz de formar uma hélice anfipática.

É evidente que, quando o meio de ligação operativa da porção do receptor de LDL e da porção de ligação à LDL é diferente de uma ligação peptídica, a ligação ocorre tipicamente entre cadeias de resíduos de aminoácido em resíduos dos terminais amino e/ou carboxilo, ou próximo deles, das porções respectivas, de modo a conservar as suas actividades.

Os segmentos polipeptídicos de hélice anfipática preferidos deste invento, incorporados na composição por uma ligação peptídica ou não peptídica, incluem aqueles possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à de uma apolipoproteína, tal como apo B-100, apo B-48, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo A-I, apo A-II, apo D, apo E, e semelhantes. Ver, Fitch, Genetics, 86:623-644 (1977); Segrest e colab., Biopolymers, 16:2053-2065 (1977); e Chan, Klin Wochenscher, 67:225-237 (1989). Utilizando um segmento polipeptídico de hélice anfipática com a sequência de resíduos de aminoácido derivada da apo B-100 ou da apo B-48, o polipéptido pode ser preferencialmente dirigido para a LDL, em oposição a outras espécies de lipoproteína.

A hélice anfipática é caracterizada por uma segregação espacial dos resíduos de aminoácido hidrofóbicos e hidrofílicos em faces opostas da hélice. Os resíduos não polares agrupados podem, em seguida, ser intercalados em partículas lipídicas, tal como LDL. Além desta interacção hidrofóbica, também podem existir interacções de carga específicas entre lípido e péptido.

Por exemplo, foi posto em evidência que um péptido de 18 resíduos se pode ligar a um fosfolípido se possuir resíduos carregados positivamente na interface hidrofóbica-hidrofílica de uma hélice anfipática, e resíduos carregados negativamente opostos à face hidrofóbica da hélice. Ver, Epanand e colab., J. Biol. Chem., 264:4628-4635 (1989).

Um segmento polipeptídico de hélice anfipática particularmente preferido, útil na ligação da porção de ligação ao receptor de LDL do segmento polipeptídico derivado da apo E à LDL, possui uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

EWLKAFYEKVLKELKELF.

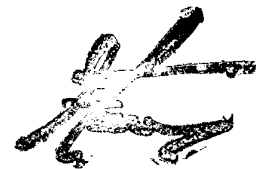
Em concretizações preferidas, a composição é um polipéptido de acordo com a fórmula I, na qual B e/ou J é um segmento polipeptídico de hélice anfipática como anteriormente descrito. Um polipéptido preferido deste tipo possui uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente à fórmula:

LRKLRKRLRLRDADDLLRKLRKRLRLRDADDLEWLKAFYEKVLKELKELF.

Em concretizações preferidas, o conjugado ou o polipéptido objecto é disperso num transportador, tal como um fosfolípido. Mais preferivelmente, o conjugado ou o polipéptido objecto é inserido de forma removível num lipossoma, isto é, é incorporado (ancorado) na camada dupla do lipossoma por meio da porção de ligação à LDL. Ver, por exemplo, Gregoriadis, Trends in Biotech., 3:235-241 (1985), e Eriksson e colab., pág. 141-156 em Liposome Technology, vol. II, ed. G. Gregoriadis CRC Press, Boca Raton, FL.

E. Processos Terapêuticos

Os polipéptidos, conjugados e composições contemplados pelo presente invento são úteis como agentes para modulação daqueles acontecimentos fisiológicos induzidos pela apo E nativa, tais



como resposta imunitária, génese de esteróides e/ou intensificação da ligação hepática da LDL. Por exemplo, um polipéptido e/ou conjugado deste invento pode ser utilizado como um agente imunossupressor para inibir a proliferação de linfócitos, ou como um agente para inibir a produção de androgénios ováricos. O polipéptido e/ou conjugado é administrado ao animal, tal como um humano, necessitado do referido tratamento, numa quantidade predeterminada calculada para alcançar o efeito desejado, isto é, numa quantidade terapêuticamente eficaz.

Tipicamente, foi aqui posto em evidência que um multímero de ordem elevada produzia um polipéptido de actividade específica mais elevada. Assim, a concentração eficaz dependerá do polipéptido específico a ser utilizado.

Consequentemente, quando é utilizado como um agente imunossupressor para inibição da proliferação de linfócitos, tal como num doente apresentando os sintomas de uma doença auto-imune, o polipéptido em tandem e/ou conjugado é administrado numa quantidade suficiente para alcançar uma concentração plasmática de pelo menos cerca de 0,8 $\mu\text{g/ml}$, preferivelmente de pelo menos cerca de 1,0 a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ até cerca de 30 a 50 $\mu\text{g/ml}$, dependendo do polipéptido específico a ser utilizado. Expondo noutros termos, uma quantidade inibidora é uma quantidade suficiente para produzir uma concentração plasmática de pelo menos cerca de 1-5 μM a cerca de 10-50 μM , dependendo do composto a ser utilizado.

Em alguns casos, é desejável aplicar o polipéptido e/ou conjugado, objecto localmente como um agente imunossupressor. Por exemplo, cerca de 10 μg a cerca de 1 mg podem ser aplicados por injeção numa articulação artrítica (por ex., no fluido sinovial da articulação) para suprimir a inflamação.

Quando utilizado como um agente para inibição da produção de androgénios ováricos, tal como em fêmeas com ovários poliquísticos, um polipéptido e/ou conjugado deste invento é



administrado numa quantidade suficiente para alcançar uma concentração plasmática de pelo menos cerca de 2 $\mu\text{g/ml}$, preferivelmente de cerca de 5 $\mu\text{g/ml}$, e mais preferivelmente de cerca de 10 $\mu\text{g/ml}$ (isto é, cerca de 1-50 μM).

Em contraste, observou-se que os polipéptidos e conjugados aumentam a proliferação de linfócitos e aumentam a síntese de androgénios quando utilizados em concentrações inferiores às inibidoras. Os mecanismos para esta resposta "bifásica" à droga não estão completamente compreendidos, mas esta foi observada de forma reprodutível quando as composições terapêuticas foram administrados em concentrações inferiores às concentrações inibidoras.

Quando é utilizado para aumentar a proliferação de linfócitos ou a síntese de androgénios, o péptido em tandem ou o seu conjugado é administrado numa quantidade suficiente para alcançar uma concentração plasmática desde cerca de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a cerca de 5 $\mu\text{g/ml}$, e em algumas situações tão elevada como 1 $\mu\text{g/ml}$, (isto é, cerca de 0,1-1 μM dependendo do composto específico a ser utilizado).

Uma terceira resposta biológica observada pelos polipéptidos ou auto-conjugados deste invento foi a modulação da ligação e absorção hepáticas da LDL, tal como em sujeitos com hipercolesterolemia.

Consequentemente, em doentes onde é desejável aumentar a ligação e incorporação hepáticas da LDL, a composição é administrada numa quantidade suficiente para alcançar uma concentração plasmática do péptido em tandem ou do conjugado de cerca de 0,1 a 1,0 μM .

Em contraste, em doentes onde é desejável inibir a ligação e absorção hepáticas da LDL, a composição é administrada numa quantidade suficiente para alcançar uma concentração plasmática do péptido em tandem ou do conjugado de, pelo menos, cerca de 1,0 μM , preferivelmente de cerca de 5 a 50 μM , dependendo do



polipéptido ou conjugado específico a ser testado.

As concentrações eficazes precisas de um polipéptido ou conjugado, deste invento, dependem do composto específico, e do efeito desejado, tal como aqui mostrado. As concentrações eficazes de uma composição particular para utilização como um inibidor ou intensificador num processo mediado pela apo E tal como aqui descrito, podem ser prontamente determinadas por um ensaio para a actividade tal como aqui descrito.

A preparação de composições terapêuticas que contêm polipéptidos como ingrediente activo é bem compreendida na arte. Tipicamente, as referidas composições são preparadas como injectáveis, como soluções ou suspensões líquidas; contudo, também podem ser preparadas como formas sólidas adequadas para solução ou para suspensão num líquido antes da injeção. A preparação também pode ser emulsionada. O ingrediente terapêutico activo é frequentemente misturado com excipientes que são farmacêuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes, e suas combinações. Além disso, se desejado, a composição também pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tampão do pH, os quais aumentam a eficácia do ingrediente activo.

Um polipéptido pode ser formulado na composição terapêutica sob a forma de sal farmacêuticamente aceitável neutralizado. Os sais farmacêuticamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres do polipéptido ou molécula de anticorpo), e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com ácidos orgânicos tais como os ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico, e semelhantes. Os sais formados a partir dos grupos carboxilo livres também podem derivar de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio, ou férricos, e de bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol,



histidina, procaína e semelhantes.

As composições terapêuticas contendo o polipéptidos são convencionalmente administradas por via endovenosa ou no local da inflamação induzida de modo auto-imune, por exemplo, por injeção de uma dose unitária. O termo "dose unitária" quando utilizado em referência a uma composição terapêutica do presente invento, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para humanos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de material activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente requerido, isto é, 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, da capacidade do sistema imunitário do sujeito para utilizar o ingrediente activo, e do grau desejado de inibição da linfoproliferação ou produção de androgénios. As quantidades precisas de ingrediente activo necessário a serem administradas dependem do julgamento do clínico, e são específicas para cada indivíduo. Contudo, as gamas de dosagem adequadas para aplicação sistémica situam-se na ordem de 0,01 a 10, preferivelmente um a vários miligramas de ingrediente activo por quilograma de peso corporal do indivíduo por dia, e depende da via de administração que origina as concentrações plasmáticas anteriormente enumeradas. Os regimes adequados para a administração inicial e injeções de reforço também são variáveis, mas encontram-se tipificados por uma administração inicial seguida por doses repetidas a intervalos de uma ou mais horas, por uma injeção subsequente ou outra administração. Alternativamente, também estão abrangidas as infusões endovenosas contínuas suficientes para manter as concentrações plasmáticas anteriormente enumeradas no sangue.

F. Anticorpos e Anticorpos Monoclonais

O termo "anticorpo" nas suas várias formas gramaticais é

aqui utilizado como um substantivo colectivo que se refere a uma população de moléculas de imunoglobulina e/ou a porções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, isto é, a moléculas que contêm um local de combinação do anticorpo ou paratopo.

Um "local de combinação do anticorpo" é aquela porção estrutural de uma molécula de anticorpo constituída pelas regiões variáveis e hipervariáveis das cadeias pesada e leve que ligam especificamente o antigénio.

A frase "molécula de anticorpo" nas suas várias formas gramaticais tal como aqui utilizada contempla uma molécula de imunoglobulina intacta e uma porção imunologicamente activa de uma molécula de imunoglobulina.

Moléculas de anticorpo ilustrativas para utilização nos sistemas e processos de diagnóstico do presente invento incluem moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas, e aquelas porções de uma molécula de imunoglobulina que contêm o paratopo, incluindo aquelas porções conhecidas na arte como Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v).

As porções Fab e F(ab')₂ dos anticorpos são preparadas pela reacção proteolítica da papaína e da pepsina, pespectivamente, sobre anticorpos substancialmente intactos por processos bem conhecidos. Ver, por exemplo, a Patente dos E.U.A N° 4 342 566 de Theofilopolous e Dixon. As porções Fab' de anticorpo também são bem conhecidas e são produzidas a partir das porções F(ab')₂, seguida por redução das ligações dissulfureto ligando as duas porções das cadeis pesadas, por e seguida por exemplo com mercaptoetanol, e seguida por alquilação do mercaptano de proteína resultante com um reagente tal como iodoacetamida. São preferidos anticorpos contendo moléculas de anticorpo intactas, e são aqui utilizadas como exemplo.

Numa concretização, um anticorpo do presente invento, isto



é, um anticorpo anti-apo E, é caracterizado por ser capaz de imunorreagir com a apo E presente em partículas lipoproteicas contendo colesterol, tais como LDL, VLDL, e semelhantes. A apo E em associação com VLDL é designada por apo E/VLDL. Um anticorpo anti-apo E desta concretização é adicionalmente caracterizado por ser capaz de imunorreagir com o polipéptido deste invento, por exemplo um polipéptido compreendendo uma pluralidade de segmentos apresentando a fórmula $p(141-150)$, $p(141-150)_2$, $p(141-150)_3$, $p(141-150)_4$, ou auto-conjugados de $p(141-150)_2$ ou $p(141-150)_3$, ou com um polipéptido de acordo com a fórmula I ou II.

3 Numa concretização preferida, um anticorpo anti-apo E é caracterizado por estar substancialmente isento de moléculas de anticorpo que imunorreagem com o polipéptido LSKELQAAQARLGADMEDVR correspondente aos resíduos 93-112 da apo E madura e designado por p93-112, ou com o polipéptido RGLSAIRERL correspondente aos resíduos 172-182 da apo E madura e designado por p172-182.

São particularmente preferidas as moléculas de anticorpo que não imunorreagem com um polipéptido contendo apenas um monómero do polipéptido de apo E, p141-150 ou p141-155. Os polipéptidos de apo E que contêm apenas um p141-150 ou p141-155 único não possuem a capacidade de mimetizar a capacidade de ligação ao receptor de LDL da apo E, que resulta no aumento da absorção e degradação hepáticas de partículas de lipoproteína contendo apo E tal como aqui descrito. Assim, um tal anticorpo é imuno-específico para antigénios capazes de mimetizarem a porção de ligação ao receptor de LDL, e não imunorreage com monómeros.

Os polipéptidos que mimetizam a função de ligação ao receptor de LDL da apo E são designados como polipéptidos de apo E "competentes para o receptor". As moléculas de anticorpo anti-apo E que não imunorreagem com o p141-150 ou p141-155 monoméricos apresentam, por conseguinte, imuno-especificidade para polipéptidos de apo E competentes para o receptor, e apresentam imuno-especificidade para a apolipoproteína apo E que

se encontra numa forma competente para o receptor.

As moléculas de anticorpo anti-apo E que são específicas para apo E ou polipéptidos de apo E competentes para o receptor apresentam uma utilidade particular em imunoensaios, nomeadamente, para monitorizar o destino de polipéptidos de apo E administrados terapêuticamente no decurso dos regimes terapêuticos aqui descritos, ou para detectar os níveis de apo E competente para o receptor numa amostra de fluido vascular corporal.

A imunorreactividade do anticorpo com os antígenos contendo apo E pode ser medida por uma variedade de ensaios imunológicos conhecidos na arte. A imunorreacção ilustrativa de um anticorpo anti-apo E deste invento por ligação directa com apo E/VLDL ou com polipéptidos de apo E , pode ser analisada pelo menos pelos processos descritos no Exemplo 14.

Um anticorpo do presente invento é tipicamente produzido por imunização de um mamífero com um inóculo contendo um polipéptido de apo E deste invento, tal como um auto-conjugado de um polipéptido de acordo com a fórmula I ou II, ou com um polipéptido de acordo com a fórmula I ou II, ou com um polipéptido apresentado na Tabela 1, e, desse modo, são induzidas no mamífero moléculas de anticorpo apresentando imunoespecificidade para um polipéptido de apo E deste invento ou para apo E competente para o receptor de LDL. Alternativamente, a apo E/LDL ou apo E/VLDL podem ser utilizadas como a fonte de antígeno de apo E de imunização.

Os processos de produção para a preparação de um antissoro anti-polipéptido de apo E policlonal descritos no Exemplo 8 são ilustrativos. As moléculas de anticorpo são, em seguida, recolhidas do mamífero e isoladas na extensão desejada por técnicas bem conhecidas tais como, por exemplo, por utilização de DEAE Sephadex para obter a fracção IgG.

Para aumentar a especificidade do anticorpo, são preferidos

os anticorpos que são purificados por cromatografia de imunoafinidade utilizando o polipéptido de imunização afixado a uma fase sólida. O anticorpo é posto em contacto com o polipéptido de imunização afixado à fase sólida durante um período de tempo suficiente para que o polipéptido imunorreaja com as moléculas de anticorpo para formar um imunocomplexo afixado à fase sólida. Os anticorpos ligados são separados do complexo por técnicas comuns.

Num processo relacionado para produzir anticorpo anti-apo E que não imunorreage substancialmente com um monómero, por exemplo p141-150, o anticorpo anti-apo E preparado pode ser posto em contacto com o p141-150 monomérico na fase sólida de modo a permitir que os anticorpos que imunorreagem com o p141-150 monomérico a fim de formar complexos na fase sólida, e o anticorpo da fase líquida é então recolhido para formar anticorpo anti-apo E que é específico para polipéptidos de apo E competentes para o receptor.

O anticorpo assim produzido pode ser utilizado, inter alia, em sistemas e processos de diagnóstico do presente invento para detectar apo E ou polipéptido de apo E presente numa amostra corporal.

A palavra "inóculo" nas suas várias formas gramaticais é aqui utilizada para descrever uma composição contendo um polipéptido de apo E, deste invento, como um ingrediente activo utilizado para a preparação de anticorpos imunorreactivos com um polipéptido de apo E. Quando um polipéptido é utilizado num inóculo para induzir anticorpos, deverá compreender-se que o polipéptido pode ser utilizado em várias concretizações, por ex., só ou ligado a um transportador como um conjugado, ou como um polímero polipeptídico. Contudo, por facilidade de expressão e no contexto de um inóculo polipeptídico, as várias concretizações dos polipéptidos deste invento são aqui colectivamente referidas pelo termo "polipéptido" e pelas suas várias formas gramaticais.

Para um polipéptido que contém menos do que cerca de 35 resíduos de aminoácido, é preferível utilizar a ligação peptídica a um transportador para o fim de induzir a produção de anticorpos.

Podem ser adicionados um ou mais resíduos de aminoácido adicionais aos terminais amino ou carboxilo do polipéptido para auxiliar na ligação do polipéptido a um transportador. Veirificou-se que os resíduos de cisteína adicionados aos terminais amino ou carboxilo do polipéptido são particularmente úteis para a formação de conjugados por meio de ligações dissulfureto. Contudo, também podem ser utilizados outros processos bem conhecidos na arte para a preparação de conjugados. Os processos de ligação adicional ilustrativos incluem a utilização dos produtos da reacção de adição de Michael, dialdeídos como o glutaraldeído, Klipstein e colab., J. Infect. Dis., 147:318-326 (1983), e semelhantes, ou a utilização de tecnologia da carbodiimida, tal como na utilização de uma carbodiimida solúvel em água para formar ligações amida ao transportador. Para uma revisão da conjugação ou acoplamento proteico através de grupos funcionais activados, ver Avrameas e colab., Scand. J. Immunol., 1:7-23 (1978).

Os transportadores úteis são bem conhecidos na arte e são geralmente, eles próprios, proteínas. Exemplos dos referidos transportadores incluem hemocianina de lapa género *Fissurella* (KLH), edestina, tiroglobulina, albuminas tais como a albumina de soro de bovino (BSA) ou a albumina de soro humano (HSA), eritrócitos tais como eritrócitos de carneiro (SRBC), toxóide do tétano, toxóide da cólera, bem como poli-aminoácidos como poli(D-lisina; D-ácido glutâmico), e semelhantes.

A escolha do transportador depende principalmente do fim último do inóculo e baseia-se em critérios não particularmente envolvidos no presente invento. Por exemplo, deverá ser seleccionado um transportador que não provoque uma reacção desfavorável no animal particular a ser inoculado.

O presente inóculo contém uma quantidade imunogénica eficaz de um polipéptido deste invento, tipicamente como um conjugado ligado a um transportador. A quantidade eficaz de polipéptido por dose unitária, suficiente para induzir uma resposta imunitária ao polipéptido imunizador, depende, entre outras coisas, da espécie de animal a ser inoculado, do peso corporal do animal e do regime de inoculação escolhido, tal como é bem conhecido na arte. Os inóculos contém tipicamente concentrações de polipéptido de cerca de 10 microgramas a cerca de 500 miligramas por inoculação (dose), preferivelmente de cerca de 50 microgramas a cerca de 50 miligramas por dose.

O termo "dose unitária" no que diz respeito aos inóculos refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para animais, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de material activo, calculada para produzir o efeito imunogénico desejado em associação com o diluente requerido, isto é, transportador ou veículo. As especificações para a nova dose unitária de um inóculo deste invento são impostas e directamente dependentes: (a) das características únicas do material activo e do efeito imunogénico particular a ser alcançado, e (b) das limitações inerentes à arte na composição do referido material para uso imunológico em animais, tal como aqui descrito em detalhe, e sendo estas características do presente invento.

Os inóculos são tipicamente preparados a partir do conjugado do polipéptido sólido seco, por dispersão do conjugado do polipéptido num diluente fisiologicamente tolerável (aceitável), tal como água, solução salina ou solução salina tamponada com fosfato, a fim de formar uma composição aquosa.

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



São particularmente aplicáveis as técnicas de conjugação ou acoplamento polipeptídico através de grupos funcionais activados presentemente conhecidas na arte. Ver, por exemplo, Avrameas e colab., Scand. J. Immunol., vol. 8, supl. 7:7-23 (1978) e Patentes dos E.U.A. N° 4 493 795, N° 3 791 932 e N° 3 839 153. Além disso, pode ser efectuada uma reacção de acoplamento dirigida ao local, de modo que qualquer perda de actividade devida à orientação do polipéptido depois do acoplamento possa ser minimizada. Ver, por exemplo, Rodwell e colab., Biotech., 3:889-894 (1985), e Patente dos E.U.A. N° 4 671 958.

Podem ser adicionados um ou mais resíduos de aminoácido aos terminais amino ou carboxilo do polipéptido para auxiliar na ligação do polipéptido para formar um conjugado. Verificou-se que os resíduos de cisteína, geralmente adicionados ao terminal carboxilo do polipéptido, são particularmente úteis para a formação de conjugados por meio de ligações dissulfureto, mas podem ser utilizados outros processos bem conhecidos na arte para a preparação de conjugados.

Um anticorpo anti-apo E particularmente preferido é um anticorpo monoclonal.

A frase "anticorpo monoclonal" nas suas várias formas gramaticais refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie de local de combinação do anticorpo capaz de imunorreagir com um epitopo particular. Deste modo, um anticorpo monoclonal tipicamente exhibe uma única afinidade de ligação para qualquer epitopo com o qual imunorreaça. Um anticorpo monoclonal pode,consequentemente, conter uma molécula de anticorpo possuindo uma pluralidade de locais de combinação do anticorpo, cada um deles imuno específico para um epitopo diferente, por ex. um anticorpo monoclonal biespecífico.

Os anticorpos monoclonais anti-apo E preferidos são preparados tal como aqui descrito.

Os anticorpos monoclonais adicionais úteis para a prática dos processos de diagnóstico deste invento são aqueles que imuno-
reagem com LDL, VLDL, HDL, e partículas lipoproteicas semelhantes. São particularmente preferidos os anticorpos anti-apo B-100.

Um hibridoma ilustrativo que segrega moléculas de anticorpo monoclonal que imuno-
reagem com a apo B-100 foi previamente descrito na Patente dos E.U.A. N° 4 677 057, a qual é aqui incorporada por referência, e as moléculas de anticorpo monoclonal segregadas pelo hibridoma são designadas como MB47. O anticorpo monoclonal MB47 imuno-
reage com mais do que cerca de 90 % da ^{125}I -LDL, e com uma determinante antigénica conservada distinta e separada na apo B-100. Tal como referido por Young e colab., Clin. Chem., 32/8:1484-1490 (1986), o MB47 apenas reage com a apo B-100.

O hibridoma anterior foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD), de acordo com o Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para o Fim de Procedimento de Patente, em 6 de Março de 1985, e foi-lhe atribuída a designação HB8746.

O depósito anterior foi efectuado de acordo com as exigências do Tratado de Budapeste quanto à duração do depósito, ou durante 5 anos após o último pedido para o depósito no depositário ou durante a vigência de uma patente dos E.U.A. que tenha por origem este pedido, qualquer que seja o mais longo. O hibridoma é reabastecido se se tornar não viável no depositário, e é colocado ao dispôr do público pela ATCC após a atribuição de uma patente a partir deste pedido.

G. Preparação de Anticorpos Monoclonais

Um anticorpo monoclonal é tipicamente composto por anticorpos produzidos por clones de uma única célula, designados por hibridoma, que segregam (produzem) apenas um tipo de molécula de anticorpo. A célula do hibridoma é formada pela

fusão de uma célula produtora de anticorpos com uma linha de células de mieloma ou outra que se auto-perpetue. A preparação dos referidos anticorpos foi primeiramente descrita por Kohler e Milstein, Nature, 256:495-497 (1975), cuja descrição é aqui incorporada para referência. Os sobrenadantes dos hibridomas assim preparados podem ser examinados quanto à presença de moléculas de anticorpo que imunorreagem com um polipéptido de apo E deste invento.

Resumidamente, para formar o hibridoma a partir do qual é produzida a composição de anticorpo monoclonal, uma linha de células de mieloma ou outra que se auto-perpetue é fundida com linfócitos obtidos a partir do baço de um mamífero hiperimunizado com um polipéptido de apo E deste invento, ou com uma molécula de apo E nativa, tal como se encontra presente numa partícula lipoproteica contendo apo E. A tecnologia do hibridoma induzido por polipéptido encontra-se descrita por Niman e colab., Proc. Natl. Sci., U.S.A., 80:4949-4953 (1983), cuja descrição é aqui incorporada para referência.

É preferido que a linha de células de mieloma utilizada para preparar um hibridoma seja da mesma espécie que os linfócitos. Tipicamente, o mamífero preferido é um ratinho da estirpe 129 G1X⁺. Os mielomas de ratinho adequados para utilização no presente invento incluem as linhas de células sensíveis a hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), P3X63-Ag8.653 e Sp2/0-Ag14, que se encontram disponíveis em American Type Culture Collection, Rockville, MD, sob as designações CRL 1580 e CRL 1581, respectivamente.

Os esplenócitos são tipicamente fundidos com as células de mieloma utilizando polietilenoglicol (PEG) 1500. Os híbridos fundidos são seleccionados pela sua sensibilidade a HAT. Os hibridomas produtores de um anticorpo monoclonal deste invento são, em seguida, identificados por pesquisa das imunoespecificidades de um anticorpo anti-apo E tal como aqui descrito, por exemplo, pelo ensaio de imunossorção de enzima ligado (ELISA) descrito no Exemplo 16, ou utilizando o

radioimunoensaio de fase sólida (SPRIA) descrito no Exemplo 14.

Um anticorpo monoclonal do presente invento também pode ser produzido por iniciação de uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio nutriente contendo um hibridoma que segrega moléculas de anticorpo com imunoespecificidade apropriada. A cultura é mantida sob condições e durante um período de tempo suficiente para que o hibridoma segregue as moléculas de anticorpo para o meio. O meio contendo o anticorpo é então recolhido. As moléculas de anticorpo podem ser adicionalmente isoladas por técnicas bem conhecidas.

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

São igualmente bem conhecidos outros processos para a produção de um anticorpo monoclonal, de uma célula de hibridoma, ou de uma cultura de células de hibridoma. Ver, por exemplo, o processo para o isolamento de anticorpos monoclonais a partir de um reportório imunológico tal como descrito por Sastry e colab., Proc. Natl. Acad. Sci., 86:5728-5732 (1989), e Huse e colab., Science, 246:1275-1281 (1989).

Também se encontram abrangidas por este invento a célula de hibridoma e as culturas contendo a célula de hibridoma que produzem um anticorpo monoclonal deste invento.

O anticorpo monoclonal produzido pelo processo anterior pode ser utilizado, por exemplo, em modalidades de diagnóstico aqui descritas onde é desejada a formação de um produto de imunorreacção contendo apo E.

O hibridoma HB 8746 produz moléculas de anticorpo

monoclonal MB47, e foi formado pela fusão de esplenócitos de ratinho imunizado com LDL com células de mieloma P3X63Ag8.653.1. A preparação detalhada do anticorpo monoclonal MB47 e do hibridoma foi descrita por Young e colab., Arteriosclerosis, 6:178-188 (1986).

H. Processos de Ensaio

Os processos de ensaio de fase sólida e líquida úteis são aqui discutidos. No entanto, o invento não se encontra limitado dessa maneira. Além disso, embora os processos de ensaio particularmente descritos utilizem um meio indicador com enzima ligado, o presente invento não se encontra especificamente limitado aos ensaios referidos. Os processos de ensaio adicionais são descritos seguidamente com ênfase particular para os processos de imunoensaio de fase sólida.

Os peritos na arte compreenderão que existem numerosos processos de imunoensaio de fase sólida que podem ser aqui utilizados. Os ensaios de fase sólida úteis ilustrativos incluem técnicas de imunoensaio multiplicado de enzima (EMIT) e ensaios de imunofluorescência (FIA), além dos especificamente discutidos, RIA, radio-imunoensaio de fase sólida (SPRIA) do Exemplo 8B, e ELISA. No entanto, é considerado qualquer processo que origine um sinal conferido pela reacção da apo E com um anticorpo deste invento. Cada um desses processos de ensaio pode empregar técnicas de anticorpo simples ou duplo, nas quais é utilizado um meio indicador para assinalar a imunorreacção, e desse modo a ligação de uma apo E que está a ser ensaiada com um receptor deste invento. Técnicas ilustrativas podem ser encontradas descritas em Maggio, Enzyme Immunoassay, CRC Press, Cleveland, OH (1981), e em Goldman, Fluorescent Antibody Methods, Academic Press, Nova Iorque, NY.

Neste processo de ensaio é utilizada uma amostra de fluido vascular. A amostra pode ser soro ou plasma. Verificou-se previamente que os resultados obtidos utilizando ambas as composições são estatisticamente indistinguíveis. Independentemente de se utilizar soro ou plasma, a amostra de

fluido vascular é preferivelmente obtida a partir de pessoas que se mantiveram em jejum pelo menos durante cerca de doze horas, tal como é sabido na arte. Uma tal amostra de sangue é designada como uma amostra de "jejum".

Um processo de ensaio contemplado determina a presença, e preferivelmente a quantidade de uma apo E competente para um receptor de LDL numa amostra de fluido vascular. Este processo inclui os seguintes passos:

(a) Uma amostra de fluido vascular é misturada com uma composição de anticorpo anti-apo E deste invento, para formar uma mistura de imunorreacção. As moléculas de anticorpo na composição encontram-se preferivelmente operativamente ligadas a um suporte sólido, de modo que a mistura de imunorreacção possui uma fase sólida e uma fase líquida. Estas moléculas de anticorpo imunorreagem com:

(i) um polipéptido deste invento, tal como um de acordo com a fórmula I, fórmula II, ou um polipéptido de acordo com a Tabela 1, e

(ii) apo E/VLDL, mas não imunorreagem com um polipéptido correspondente a um de fórmula p93-112 e p172-182, e preferivelmente não imunorreagem com um polipéptido contendo apenas um monómero do polipéptido p141-150, p141-150 ou p(LLRK).

(b) A mistura de imunorreacção é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo apo E na fase sólida.

(c) É então determinada a presença, e preferivelmente a quantidade de produto de imunorreacção formado no passo (b) e, desse modo, a quantidade de antigénio apo E na amostra de fluido vascular.

As condições de ensaio biológico são aquelas condições que são capazes de sustentar a actividade biológica dos reagentes imunoquímicos deste invento e do antigénio que se pensa estar a ser analisado. Essas condições incluem uma gama de temperaturas

desde cerca de 4° C a cerca de 45° C, um valor do pH na gama de cerca de 5 a cerca de 9, e uma força iónica variando desde a da água destilada até à do cloreto de sódio um molar. Os processos para otimizar essas condições são bem conhecidos na arte.

3 Numa concretização preferida do processo anterior, a quantidade de produto de imunorreacção é determinada de acordo com o passo (c) por (i) mistura de um agente de ligação específica marcado capaz de ligar uma partícula contendo apo E com o produto de imunorreacção contendo apo E para formar uma mistura reaccional marcadora, (ii) manutenção da mistura reaccional marcadora sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para que o agente de ligação específica marcado ligue o produto de imunorreacção contendo apo E para formar um complexo marcado, e (iii) detecção da quantidade de todo o complexo marcado formado e, consequentemente, detecção da quantidade de produto de imunorreacção contendo apo E.

Numa concretização particularmente preferida, o agente específico marcado é um anticorpo monoclonal anti-B-100 produzido pelo hibridoma possuidor da designação da ATCC, HB 8742.

Outro ensaio contemplado por este invento é um processo de ensaio de competição para detecção da presença, e preferivelmente da quantidade, de um antigénio apo E numa amostra de fluido vascular. Este processo de ensaio compreende os seguintes passos:

(a) Uma amostra de fluido vascular é misturada com um polipéptido de apo E deste invento ligado a uma fase sólida para formar uma primeira mistura de fase sólida-líquida.

(b) Uma composição de anticorpo, contendo uma quantidade limitante de moléculas de anticorpo anti-polipéptido de apo E que imunorreagem com o polipéptido na fase sólida, e imunorreagem com a apo E/VLDL, mas não imunorreagem com um polipéptido correspondente a um com as fórmulas p93-119 e

p72-182, e preferivelmente não imunorreagem com um polipéptido contendo apenas um monómero do polipéptido p141-150 ou p141-155, é misturada com a primeira mistura para formar uma segunda mistura.

(c) Esta segunda mistura é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo apo E na fase sólida.

(d) É determinada a quantidade de produto de imunorreacção presente na fase sólida formado no passo (c) e, consequentemente, a quantidade de apo E na amostra de fluido vascular.

3 Numa concretização alternativa, o polipéptido de apo E ligado a uma fase sólida é substituído por uma lipoproteína contendo apo E, tal como uma partícula de VLDL.

Numa concretização mais preferida, o componente contendo a apo E ou o polipéptido de apo E ligado à fase sólida é o análogo polipeptídico competente para o receptor anteriormente descrito, e o anticorpo anti-análogo de apo E no passo (b) está operativamente ligado a um meio indicador enzimático, e o produto formado no passo (c) é um produto de imunorreacção marcado.

Na medida em que os processos de diagnóstico presentes podem ser utilizados para monitorizar o destino dos polipéptidos de apo E administrados terapêuticamente, tal como aqui descrito, compreende-se que os processos descritos para detecção de um antigénio apo E possam ser prontamente aplicados para monitorizar um análogo de um antigénio apo E, nomeadamente um polipéptido de apo E. Por esta razão, a frase "antigénio apo E" refere-se a moléculas antigénicas que imunorreagem com os anticorpos do presente invento, sejam moléculas antigénicas apo E nativa, polipéptidos de apo E, ou combinações do análogo e proteína nativa.

Em concretizações para o seguimento do destino de um polipéptido de apo E administrado terapêuticamente, deverá

compreender-se que a apo E nativa e o polipéptido de apo E podem ser indistinguíveis numa amostra de fluido vascular onde ambos os componentes imunorreagem com os anticorpos anti-apo E. Por conseguinte, é útil e preferido medir os níveis vasculares do antigénio apo E num doente antes da administração de uma composição terapêutica a fim de se estabelecer uma linha de base de antigénio apo E no doente. A intervalos de tempo predeterminados após a administração do péptido terapêutico, são recolhidas amostras de sangue do doente, e os níveis de antigénio apo E são novamente medidos a fim de determinar o destino e o efeito da composição terapêutica sobre o antigénio apo E circulante.

Também se encontra contemplado um processo relacionado para a detecção da apo E presente em partículas lipoproteicas numa amostra de fluido vascular. A amostra de fluido é misturada com um anticorpo anti-B-100 na fase sólida, isto é, operativamente ligado a uma matriz sólida, para formar uma mistura de imunorreacção de fase sólida-líquida. A mistura é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção na fase sólida. O produto de imunorreacção, contendo partículas lipoproteicas com apo B-100, é de seguida misturado com um anticorpo anti-apo E deste invento para formar uma segunda mistura de imunorreacção de fase sólida-líquida. A segunda mistura é mantida como anteriormente a fim de permitir que os anticorpos anti-apo E imunorream com as partículas lipoproteicas na fase sólida e formem um segundo produto de imunorreacção na fase sólida. O segundo produto resultante é detectado para indicar a presença de apo E no fluido vascular.

Em concretizações preferidas, o anti-apo E é marcado, e o segundo produto é, desse modo, detectado por detecção da presença do marcador na fase sólida. Mais preferivelmente, o anticorpo anti-apo E possui a capacidade de ligar os polipéptidos de apo E competentes para o receptor, e pode, consequentemente, ser útil para detectar a apo E competente para o receptor em vez da apo E total.



As técnicas para ligar operativamente uma enzima a uma molécula de anticorpo para formar um conjugado são bem conhecidas na arte. Técnicas ilustrativas encontram-se descritas em Maggio, Enzyme-Immunoassay, Capítulo 4 por KabaKoff, CRC Press, Boca Raton, FL (1980), pág. 71-104.

As moléculas de anticorpo monoclonal podem ser utilizadas tal como são obtidas a partir dos sobrenadantes de hibridomas ou de ascite. No entanto, é preferível utilizar moléculas de anticorpo monoclonal purificadas.

Diversas formas para a purificação de moléculas de anticorpo monoclonal são bem conhecidas na arte e, tipicamente, utilizam técnicas cromatográficas. Aqui, a técnica de escolha é a cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC).

Os conjugados de molécula de anticorpo monoclonal ligado a enzima são proporcionados às misturas na fase fluida. Essas moléculas são tipicamente dissolvidas numa composição aquosa. As composições típicas contêm sais tampão, como é o caso das composições contendo anticorpo monoclonal purificado ilustrativas aqui utilizadas que incluem solução salina tamponada com fosfato (PBS) como diluente. O fluido ascítico diluído também é útil.

Preferivelmente, os locais de ligação de proteína não específicos na superfície do suporte de fase sólida estão bloqueados. Assim, as moléculas paratópicas ligadas à fase sólida estão ligadas quer por adsorção quer por outros meios bem conhecidos de afixação à matriz sólida. Seguidamente, uma solução aquosa de uma proteína isenta de interferência com o ensaio, tal como albumina de soro de bovino, de cavalo ou outra, que também se encontra isenta de contaminação com apo B-100 ou apo E humanas, é misturada com a fase sólida para adsorver a proteína misturada sobre a superfície do suporte sólido contendo moléculas paratópicas, nos locais de ligação de proteína na superfície que não estão ocupados pela molécula paratópica monoclonal.

Uma solução proteica aquosa típica contém cerca de 3 a cerca de 10 % em peso de albumina de soro de bovino em PBS a um valor de pH de 7,1-7,5. A mistura de solução proteica aquosa-suporte sólido é tipicamente mantida durante um período de tempo de, pelo menos, uma hora a 37° C, e a fase sólida resultante é de seguida lavada até ficar isenta de proteína não ligada.

Como já referido, a amostra de fluido vascular pode ser plasma ou soro. A amostra é preferivelmente diluída a cerca de 1:500 até cerca de 1:5 000, e mais preferivelmente a cerca de 1:1 000. A utilização de diluições inferiores pode fornecer demasiado antigénio apolipoproteico à mistura e prejudicar a linearidade dos resultados do ensaio, bem como reduzir ou abolir o excesso de molécula paratópica ligada à fase sólida relativamente ao antigénio misturado. A utilização de diluições superiores a 1:20 000 tende a reduzir a precisão.

Os tempos de manutenção utilizados podem variar amplamente com variação mínima nos resultados, desde que seja utilizado um tempo mínimo de cerca de 30 minutos à temperatura ambiente (cerca de 20-25° C). Quando é desejável utilizar um tempo de manutenção mínimo de 30 minutos, é preferível que a mistura mantida seja agitada durante aquele período de tempo para assegurar a imunorreacção substancialmente completa entre o antigénio apolipoproteico e as moléculas paratópicas monoclonais. Quando são utilizados tempos de manutenção mais longos, tais como uma hora ou mais, à temperatura ambiente, a agitação não é tipicamente requerida. A agitação desejada pode ser prontamente fornecida por meio de um giro-batedor operado a cerca de 100 rpm. Cada um dos ensaios utilizados no processo pode ser executado utilizando tempos de manutenção da mistura de imunorreacção de cerca de 30 minutos a cerca de 60 minutos à temperatura ambiente.

A quantidade de antigénio apolipoproteico presente no imunorreagente analisado é determinada por mistura da fase sólida contendo apolipoproteína ligada a enzima separada com uma



quantidade predeterminada de reagente ou reagentes de visualização. Quando é utilizado HRPO como meio indicador enzimático, os reagentes de visualização tais como peróxido de hidrogénio, e um precursor de corante oxidativo tal como o o-fenilenodiamina (OPD) presentes num meio aquoso, são misturados com o imunorreagente ligado a fase sólida separado. A mistura assim formada é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado, tal como pelo menos cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente para desenvolver a cor. O desenvolvimento da cor é de seguida interrompido pela mistura de um reagente de paragem como o ácido sulfúrico. Em seguida, é lida a densidade óptica da composição, comparada com o valor da curva padrão, e a quantidade de apolipoproteína é determinada, tal como é bem conhecido.

Assim, uma vez que o suporte sólido e a amostra de fluido vascular estejam preparados, cada ensaio pode ser executado à temperatura ambiente num período de tempo de cerca de uma hora, isto é, um tempo de manutenção de 30 minutos com agitação para as misturas formadas a partir de moléculas paratópicas e a alíquota de amostra, e mais um tempo de manutenção de 30 minutos para o desenvolvimento da cor. Na realidade, não é necessário preparar o suporte sólido imediatamente antes de cada utilização, mas em vez disso, os referidos suportes tal como são aqui descritos podem ser preparados e armazenados húmidos e cobertos sob as condições de refrigeração habituais durante um período de tempo de, pelo menos, um mês antes da utilização.

I. Sistemas de Diagnóstico

O presente invento também contempla um sistema de diagnóstico, tipicamente na forma de um conjunto, que pode ser utilizado na execução dos processos de ensaio anteriormente descritos. O sistema inclui, numa quantidade suficiente para pelo menos um ensaio, um polipéptido de apo E sujeito e/ou um anticorpo anti-apo E ou anticorpo monoclonal deste invento, como reagentes imunoquímicos embalados separadamente. As instruções para a utilização do reagente embalado são também tipicamente incluídas.

Numa concretização, um sistema de diagnóstico na forma de um conjunto inclui um suporte sólido compreendendo uma matriz sólida, tal como uma placa de microtitulação, possuindo um anticorpo monoclonal anti-apo E deste invento afixado (operativamente ligado à matriz sólida), numa quantidade suficiente para executar pelo menos um ensaio.

Em concretizações preferidas, o sistema de diagnóstico anterior ainda inclui, como um reagente embalado separadamente, um segundo anticorpo, um anticorpo de revelação, que contém moléculas de anticorpo que imunorreagem com partículas lipoproteicas contendo apo E. Nesta concretização, o anticorpo de revelação pode imunorreagir com qualquer componente presente na partícula lipoproteica contendo apo E. As referidas partículas incluem apo E/LDL, apo E/VLDL, apo E/HDL, e semelhantes. Os anticorpos de revelação preferidos são aqueles que imunorreagem com a apo B-100 dado que é um epitopo conservado nas partículas lipoproteicas contendo apo E. As moléculas de anticorpo anti-apo B-100 particularmente úteis são os anticorpos monoclonais segregados pelo hibridoma MB47, o qual se encontra disponível na ATCC e possui o número de acesso HB8746.

Noutra concretização utilizada para analisar uma amostra de fluido quanto à presença de polipéptido de apo E ou de partículas lipoproteicas contendo apo E, o sistema de diagnóstico inclui um suporte sólido compreendendo uma matriz sólida com um polipéptido de apo E deste invento afixado. O sistema pode ainda incluir, como um reagente embalado separadamente, um anticorpo anti-polipéptido de apo E deste invento para utilização num formato de ELISA de competição.

Preferivelmente, um sistema de diagnóstico inclui adicionalmente um ou mais dos seguintes: (i) um abastecimento de peróxido de hidrogénio de concentração conhecida; (ii) um precursor de corante oxidativo para visualização, tal como OPD; (iii) uma solução de um agente de paragem, tal como ácido sulfúrico 4N, para extinguir a reacção de formação da cor; (iv)

um ou mais tampões sob a forma seca ou líquida para utilização no ensaio; e (v) materiais para preparação de curvas de referência padrão.

Tal como aqui utilizado, o termo "embalagem" refere-se a uma matriz ou material sólido, tal como vidro, plástico, papel, folha e semelhantes, capaz de suportar um polipéptido, um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal do presente invento, dentro de limites fixos. Assim, por exemplo, uma embalagem pode ser um frasco de vidro utilizado para conter quantidades de miligramas de um polipéptido abrangido, ou pode ser um alvéolo de uma placa de microtitulação ao qual quantidades de microgramas de um polipéptido contemplado foram operativamente afixadas, isto é, ligadas de modo a serem capazes de serem imunologicamente ligadas por um anticorpo. As "instruções para a utilização" tipicamente incluem 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 amostra a serem misturadas, os períodos de manutenção para as misturas de reagente/amostra, temperatura, condições de tampão, e semelhantes.

Em concretizações preferidas, um sistema de diagnóstico do presente invento ainda inclui um marcador ou meio indicador capaz de assinalar a formação de um complexo contendo um polipéptido ou molécula de anticorpo do presente invento.

A palavra "complexo" tal como aqui utilizada refere-se ao produto de uma reacção de ligação específica, tal como uma reacção anticorpo-antigénio ou receptor-ligando. Complexos ilustrativos são os produtos de imunorreacção.

Tal como aqui utilizados, os termos "marcador" e "meio indicador" nas suas várias formas gramaticais referem-se a átomos simples e moléculas que estão directa ou indirectamente envolvidos na produção de um sinal detectável para indicar a presença de um complexo. Qualquer marcador ou meio indicador pode ser ligado ou incorporado numa molécula de anticorpo,

polipéptido ou proteína expressa que faça parte de uma composição de anticorpo ou anticorpo monoclonal do presente invento, ou utilizado separadamente, e aqueles átomos ou moléculas podem ser utilizados sózinhos ou em conjunto com reagentes adicionais. Os referidos marcadores são, eles próprios, bem conhecidos na química do diagnóstico clínico, e constituem uma parte deste invento apenas na medida em que são utilizados com novos processos e/ou sistemas proteicos.

O meio marcador pode ser um agente marcador fluorescente que se ligue quimicamente a anticorpos ou antigénios, sem os desnaturar, para formar um fluorocromo (corante) que seja um traçador imunofluorescente útil. Agentes marcadores fluorescentes adequados são fluorocromos tais como isocianato de fluoresceína (FIC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloreto de 5-dimetilamino-1-naftaleno-sulfonilo (DANSC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), lissamina, cloreto de rodamina 8200 sulfonilo (RB 200 SC), e semelhantes. Uma descrição das técnicas de análise por imunofluorescência pode ser encontrada em DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", em Antibody As a Tool, Marchalonis e colab., ed., John Wiley & Sons, Ltd., pág. 189-231 (1982), o qual é aqui incorporado para referência.

Em concretizações preferidas, o grupo indicador é uma enzima, tal como peroxidase de rábano silvestre (HRP), glucose-oxidase, ou semelhantes. Nestes casos onde o grupo indicador principal é uma enzima, tal como HRP ou glucose-oxidase, são necessários reagentes adicionais para visualizar o facto de um complexo receptor-ligando (imunorreagente) se ter formado. Os referidos reagentes adicionais para a HRP incluem peróxido de hidrogénio e um precursor de corante oxidativo tal como diaminobenzidina. Um reagente adicional útil com a glucose oxidase é 2,2'-azino-di-(ácido 3-etil-benzotiazolino-G-sulfónico) (ABTS).

Os elementos radioactivos também são agentes marcadores úteis e são aqui ilustrativamente utilizados. Um agente

radiomarcador ilustrativo é um elemento radioactivo que produz emissões de raios gama. Os elementos que emitem, eles próprios, raios gama, tais como ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{132}I e ^{51}Cr , representam uma classe de grupos indicadores de elemento radioactivo produtores de emissão de raios gama. O ^{125}I é particularmente preferido. Outro grupo de meios marcadores úteis é constituído por aqueles elementos, tais como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N , os quais, eles próprios, emitem positrões. Os positrões assim emitidos produzem raios gama após colisões com electrões presentes no corpo do animal. Um emissor beta, tal como ^{111}In ou ^3H , também é útil.

A ligação dos marcadores, isto é, a marcação dos polipéptidos e proteínas é bem conhecida na arte. Por exemplo, as moléculas de anticorpo produzidas por um hibridoma podem ser marcadas por incorporação metabólica de aminoácidos contendo radio-isótopo fornecidos como um componente no meio de cultura. Ver, por exemplo, Galfre e colab., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). As técnicas de conjugação ou acoplamento proteico através de grupos funcionais activados é particularmente aplicável. Ver, por exemplo, Aurameas e colab., Scand. J. Immunol., vol. 8, supl. 7:7-23 (1978), Rodwell e colab., Biotech., 3:889-894 (1985), e Patente dos E.U.A. Nº 4 493 795.

Os sistemas de diagnóstico também podem incluir, preferivelmente 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 ou um complexo contendo a referida espécie, mas não é ela própria uma composição de polipéptido ou de molécula de anticorpo do presente invento. Agentes de ligação específica ilustrativos são moléculas de anticorpo secundárias, proteínas do complemento ou seus fragmentos, proteína A de S. Aureus, e semelhantes. Preferivelmente, o agente de ligação específica liga a espécie reagente quando aquela espécie se encontra presente como parte de um complexo.

Em concretizações preferidas, o agente de ligação

específica encontra-se marcado. Contudo, quando o sistema de diagnóstico inclui um agente de ligação específica que não se encontra marcado, o agente é tipicamente utilizado como um reagente ou meio amplificador. Nestas concretizações, o agente de ligação específica marcado é capaz de ligar especificamente o meio amplificador quando o meio amplificador está ligado a um complexo contendo a espécie reagente.

Os conjuntos de diagnóstico do presente invento podem ser utilizados num formato "ELISA" para detectar a quantidade de apo E numa amostra de fluido vascular, tal como sangue, soro ou plasma. "ELISA" refere-se a um ensaio de imunossorção com enzima ligada, que emprega um anticorpo ou antigénio ligado a uma fase sólida e um conjugado de enzima-antigénio ou enzima-anticorpo, para detectar e quantificar a quantidade de um antigénio presente numa amostra. Uma descrição da técnica do ELISA pode ser encontrada no capítulo 22 da 4ª edição de Basic and Clinical Immunology por D.P. Sites e colab., publicado por Lange Medical Publications de Los Altos, CA em 1982, e nas Patentes dos E.U.A. N.º. 3 654 090, N.º 3 850 752, e N.º 4 016 043, sendo todos aqui incorporados para referência.

Um reagente é tipicamente afixado a uma matriz sólida por adsorção a partir de um meio aquoso, embora possam ser utilizados outros modos de afixação aplicáveis a proteínas e polipéptidos, bem conhecidos dos peritos na arte.

Assim, em concretizações preferidas, um polipéptido de apo E, ou uma molécula de anticorpo anti-apo E, do presente invento pode ser afixada a uma matriz sólida para formar um suporte sólido que constitui uma embalagem no sistema de diagnóstico objecto.

As matrizes sólidas úteis são bem conhecidas na arte de preparação de um suporte sólido contendo um reagente ligado. Os referidos materiais são insolúveis na água e incluem o dextrano reticulado, disponível sob a marca registada SEPHADEX de Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ); agarose; esferas de

poliestireno com cerca de 1 micron a cerca de 5 milímetros de diâmetro, disponíveis de Abbott Laboratories de North Chicago, IL; tramas baseadas em nylon, nitrocelulose, poli(cloreto de vinilo), poliestireno ou poliacrilamida reticulada, tais como folhas, tiras ou pás; ou tubos, placas ou os alvéolos de uma placa de microtitulação, tal como aquelas feitas de poliestireno ou poli(cloreto de vinilo).

A espécie reagente, o agente de ligação específica marcado ou o reagente amplificador de qualquer sistema de diagnóstico aqui descrito, podem ser fornecidos em solução, como uma dispersão líquida ou como um pó substancialmente seco, por ex., sob a forma liofilizada. Quando o meio indicador é um enzima, o substrato enzimático também pode ser fornecido numa embalagem separada do sistema. Um suporte sólido, tal como a placa de microtitulação anteriormente descrita, também pode ser incluído como um elemento embalado separadamente no sistema de ensaio de diagnóstico.

Os materiais de embalagem aqui discutidos em relação aos sistemas de diagnóstico são aqueles habitualmente utilizados nos sistemas de diagnóstico. Os referidos materiais incluem garrafas e frascos de vidro e plástico (por ex., polietileno, polipropileno e policarbonato), envólucros de plástico e de folha de plástico laminada, e semelhantes.

EXEMPLOS

Os Exemplos seguintes destinam-se a ilustrar, mas não a limitar, o presente invento.

1. Preparação de Polipéptido e Conjugado

a. Síntese

Os polipéptidos $p(141-155)_2$, designado por "péptido em tandem", $p(141-155)_3$, os polipéptidos de controlo apresentados na Tabela 2, e outros polipéptidos descritos, foram sintetizados utilizando a técnica de fase sólida clássica descrita por Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96 (1969), adaptada para

utilização com um sintetizador de péptidos automatizado modelo 430A (Applied Biosystems, Foster City, California), utilizando activação de HOBt DCC. As resinas-polipéptido foram clivadas com fluoreto de hidrogénio, extractadas e analisadas quanto à pureza por cromatografia líquida de elevado rendimento (HPLC), utilizando uma coluna de fase inversa C18 fabricada por Waters Associates, Milford, MA. Os péptidos foram adicionalmente purificados por cromatografia HPLC numa coluna de HPLC preparativa Waters Auto500. As composições em aminoácidos foram determinadas num analisador de elevado rendimento Beckman Modelo 6300 e a pureza foi avaliada por HPLC analítica. As sequências peptídicas, a pureza e a composição em aminoácidos de alguns dos péptidos encontra-se apresentada na Tabela 6. Os péptidos foram liofilizados e armazenados num ambiente escuro sob vácuo. Para os preparar para a adição às culturas, todos os péptidos foram dissolvidos em tampão de solução salina de Tris HCl 10mM, e dialisados durante toda a noite numa tubagem de diálise com uma exclusão de massa molecular de 1 000 (Spectrum Medical, Los Angeles, CA).

TABELA 2

<u>Designação¹</u>	<u>Sequência dos Resíduos de Aminoácido</u>
p93-112	LSKELQAAQARLGADMEDVR
p139-149	SHLRKLRKRLI
p141-150	LRKLRKRLLR
p141-155	LRKLRKRLLRDADDL
p145-154	RKRLLRDADD
p150-160	RDADDLQKRLA
p161-171	VYQAGAREGAE
p167-176	REGAERGLSA
p172-182	RGLSAIRERL
p174-203	LSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSILAGQPL
p(LLRK) ₄	LLRKLLRKLLRKLLRK
p(LLRK) ₈	LLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRKLLRK

¹ A designação para cada péptido indica a posição dentro da sequência de resíduos de aminoácido da proteína de apo E madura

à qual a sequência peptídica corresponde, isto é, da qual é derivada.

Os resíduos de lisina do péptido dimérico foram modificados onde indicado por acetoacetilação com o reagente diceteno tal como descrito por Weisgraber e colab., J. Biol. Chem., 253:9053-9062 (1978). Os resíduos de arginina do péptido dimérico foram modificados por modificação de 1,2-ciclo-heximida tal como descrito por Shive e colab., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 83:9-13 (1986).

b. Auto-conjugação dos péptidos de apo E

p141-155 e p129-163

Os péptidos sintéticos contendo os resíduos de aminoácido 141-155 ou 129-163 da apo E ou o péptido p(141-155)₂ foram auto-conjugados (isto é, o p141-155 foi acoplado ao p141-155 e o p129-163 foi acoplado ao p129-163) de acordo com o processo de Hoare e colab., J. Biol. Chem., 242:2447 (1967). Resumidamente, 100 mg de péptido sintético foram dissolvidos em 10 ml de água de elevada pureza (sistema Nanopure). Foi misturado um grama de EDG [hidroclorato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] à solução do péptido. A reacção prosseguiu rapidamente à temperatura ambiente e completou-se ao fim de uma hora. Durante os primeiros cinco a dez minutos o pH da solução foi monitorizado. A solução de partida, antes da adição do EDG, encontra-se a um pH de aproximadamente 3,7. Após a adição de EDG, o pH aumenta para aproximadamente 5,0 nos primeiros cinco minutos. Aos cinco minutos, são adicionados 50 µl de HCl 0,1N. Não é necessária qualquer outra adição de ácido durante o resto da incubação. A mistura é rodada durante a incubação para assegurar uma reacção completa. A reacção é extinta com 10 ml de tampão acetato 2M, pH 4,75.

Para isolar os péptidos conjugados (operativamente ligados) dos péptidos e produtos químicos não reagiram, a preparação de auto-conjugação é dialisada numa tubagem de diálise com uma exclusão de massa molecular de 2 000, uma largura de 18 mm e aproximadamente duas vezes o comprimento do volume da amostra. A

diálise de partida é efectuada contra ácido acético 2M. Um gradiente reduzindo a concentração do ácido acético de 2M para <0,01M é alcançado por troca do tampão de diálise (um litro) a cada hora, reduzindo a concentração do ácido acético em 50 % em cada troca. Uma vez reduzida a concentração do ácido acético para <10mM, a amostra é dialisada contra um litro de água altamente purificada durante toda a noite à temperatura ambiente, com pelo menos cinco trocas de um litro. A amostra é liofilizada até à secura e redissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS), e encontra-se pronta para adição à cultura de células.

O rendimento em péptido auto-conjugado deste processo é baixo, não sendo geralmente superior a 5 %. Por exemplo, numa conjugação iniciada com 100 mg de péptido sintético, foram recuperados 2,82 mg de péptido p141-155 auto-conjugado. A concentração polipeptídica do péptido redissolvido em PBS foi determinada pelo processo de ensaio proteico de Lowry. Todas as adições de péptido à cultura de células desta preparação de auto-conjugado foram baseadas no valor do ensaio de Lowry. A actividade na preparação do p141-155 auto-conjugado é estável durante pelo menos dois meses, quando armazenada a -20° C.

2. Os Péptidos Monoméricos e os Conjugados Péptido-BSA Não Inibem Especificamente a Proliferação de Linfócitos

Foi utilizado um sistema de cultura celular de linfócitos para examinar a capacidade de vários polipéptidos e conjugados para mimetizar a capacidade da apo E para inibir a diferenciação dos linfócitos, posta em evidência através da proliferação.

As células mononucleares do sangue periférico (PBM) humanas são isoladas a partir do sangue total num gradiente de Ficoll-Hypaque. As células PBM recolhidas são lavadas três vezes com meio fresco (RPMI-1640 mais 5 % de soro de bovino fetal, glutamina, penicilina, estreptomicina e tampão HEPES). Depois da lavagem, as células são contadas e postas a uma densidade de $1 \times 10^5/\text{ml}$. Para cultura, são colocados 0,2 ml das células por alvéolo de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos. O péptido

ou conjugado é adicionado aos alvéolos num volume de 50 μ l, que pode ser esterilizado por filtração ou por UV. O escalonamento no tempo típico para esta experiência é a exposição das células ao polipéptido de apo E ou auto-conjugado durante toda a noite. A PHA, o mitogénio que estimula o crescimento e a proliferação de linfócitos, é adicionada no dia seguinte. Quarenta e oito horas após a adição da PHA, é adicionado 1 μ Ci de ^{3} H-timidina por alvéolo num volume de 1 μ l, e 18-24 horas, mais tarde as células são recolhidas numa pasta. A colheita das células na pasta actua por recolha das células em papel de filtro, onde elas são lavadas com tampão para remover a ^{3} H-timidina livre. Os papéis de filtro são secos, colocados em frascos de cintilação com mistura de cintilação, e são obtidas as emissões β . Cada ponto dos dados recolhidos representa a absorção média de timidina em quatro alvéolos, e o erro padrão foi inferior a 10 % para todos os pontos dos dados.

Quando examinados no ensaio anteriormente descrito, os polipéptidos representados na Tabela 2 não apresentam qualquer efeito sobre a proliferação de linfócitos quando utilizados sob a forma monomérica, não conjugada. Contudo, quando os mesmos polipéptidos foram utilizados conjugados com albumina de soro de bovino (BSA), a proliferação de linfócitos foi inibida numa forma equivalente para todos os estudos peptídicos, tal como posto em evidência pelas quantidades decrescentes de absorção da timidina com dose crescente de conjugado. Foi observada uma inibição tipicamente linear, de 50 a 75x10³ contagens por minuto (cpm) a cerca de 6 microgramas (μ g) por mililitro (ml) de péptido-BSA, até cerca de 5 a 40x10³ cpm a cerca de 200 μ g/ml.

3. Os Péptidos Multiméricos e os Auto-Conjugados dos Péptidos Inibem Especificamente a Proliferação de Linfócitos Duma Forma Não Citotóxica

A capacidade dos polipéptidos e conjugados deste invento para inibirem especificamente a proliferação de linfócitos foi examinada utilizando o ensaio descrito no Exemplo 2. Especificamente, os auto-conjugados (p172-182)-(p172-182), (p93-112)-(p93-112) e (p141-155)-(p141-155) foram comparados

quanto à capacidade para inibirem a proliferação de linfócitos. Neste ensaio, os auto-conjugados (p172-182)-(p172-182) e (p93-112)-(p93-112) não evidenciavam capacidade significativa para inibir a proliferação de linfócitos, tal como posto em evidência na sua falha para reduzir a absorção de ^3H -timidina. Em contraste, um auto-conjugado deste invento, (p141-155)-(p141-155), começou a evidenciar actividade inibidora significativa (detectável) na gama de concentrações de cerca de 0,8 a cerca de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, e exibiu inibição completa (menos de 2% do controlo) acima duma concentração de cerca de 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Para examinar se a inibição da proliferação observada era ou não devida à morte celular (citotoxicidade directa), as culturas de células tratadas foram submetidas a um ensaio de libertação de lactato-desidrogenase (LDH), tal como descrito por Carney e colab., J. Immunol., 134:1084 (1985). A presença de LDH no sobrenadante da cultura de células indica toxicidade, dado que é libertada pelas células que foram lisadas.

Foram cultivadas 1×10^6 células mononucleares do sangue periférico por ml, a 37°C em RPMI com 5 % de soro de bovino fetal na presença do auto-conjugado (p141-155)-(p141-155). Todas as células foram de seguida expostas a PHA às 24 horas, marcadas com ^3H -timidina às 48 horas, e recolhidas às 72 horas. Os sobrenadantes das culturas de células de alvéolos duplicadas foram recolhidos para o ensaio de actividade de lactato-desidrogenase (LDH), de acordo com o processo de Carney e colab., J. Immunol., 134:1084 (1985). Os dados são expressos como uma percentagem do controlo. A absorção de ^3H -timidina e a actividade da LDH dos linfócitos de controlo expostos a PBS foram uma variação de 0,085 e de 1,232 na D.O. a 340 nm/min, respectivamente. A actividade da LDH foi medida depois da lise das células com H_2O . Cada ponto medido representa o valor médio de 4 alvéolos por tratamento, e o erro padrão foi inferior a 10 %.

De acordo com os resultados deste estudo, para o auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) existe uma libertação da

actividade da LDH inferior a 4 %, à concentração do auto-conjugado que inibe a proliferação de linfócitos em mais de 95 % (4 μ g/ml). Estes resultados demonstram que os polipéptidos e auto-conjugados deste invento não são directamente citotóxicos e que inibem especificamente a proliferação de linfócitos.

A inibição pela apo E da proliferação de linfócitos estimulada por mitogénio não é prontamente reversível. A reversibilidade da inibição pelos péptidos auto-conjugados deste invento foi testada por incubação dos linfócitos durante toda a noite com os péptidos, seguida de lavagem das culturas antes da adição da PHA. Tal como representado na Tabela 3, o auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) foi inibidor de forma máxima sob estas condições. Além disso, esta actividade inibidora não pôde ser revertida por lavagem do péptido auto-conjugado não associado a células antes da estimulação com PHA. A este respeito, a actividade inibidora do auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) mimetizou a actividade inibidora irreversível observada com a apo E nativa.

TABELA 3

A Proliferação de Linfócitos Foi Irreversivelmente Inibida
Por Um Auto-Conjugado do Péptido 141-155^a

<u>Tratamento</u>	<u>Absorção da ³H-Timidina</u> (cpm $\pm$ SD)	
	<u>Sem Lavagem</u>	<u>Com Lavagem</u> ^b
PBS	69 106 $\pm$ 6 555	57 123 $\pm$ 8 842
Auto-Conjugado de apo E ₁₄₁₋₁₅₅ ^c	1 035 $\pm$ 170	425 $\pm$ 100
Auto-Conjugado de apo A-I ₉₅₋₁₀₅ ^c	83 480 $\pm$ 4 027	64 524 $\pm$ 4 200

^a Todas as culturas continham 1×10^6 células PBM por ml. As células foram cultivadas a 37°C em RPMI-1640 com 5 % de soro de

bovino fetal. Todas as células foram expostas a PHA às 24 horas, marcadas com ^3H -timidina às 48 horas, e recolhidas às 72 horas.

^b Às 24 horas, depois dos conjugados terem sido adicionados, antes da estimulação com PHA, as células foram lavadas três vezes com meio e ressuspensas até ao seu volume original em RPMI 1640 contendo 5 % de soro.

^c Os péptidos foram utilizados a uma concentração final de 40 $\mu\text{g/ml}$.

4. Os Péptidos Monoméricos e os Conjugados de Péptido-BSA Não Inibem Especificamente a Produção de Androgénios Ovários

O sistema celular utilizado para examinar o efeito dos vários péptidos e conjugados sobre a produção de androgénios ovários foi aquele descrito por Curtiss e colab., J. Biol. Chem., 263:10965 (1988). Resumidamente, ratas fêmeas imaturas hipofissectomizadas (pituitária removida) foram sacrificadas por luxação cervical. Aos ovários removidos das ratas foi retirada a gordura e outros tecidos não ovários; em seguida, foram cortados em aproximadamente seis a oito peças por ovário e dissociados numa solução de colagenase/DNase, a qual degrada o tecido conjuntivo libertando os cachos de células. É necessária uma incubação a 37°C de aproximadamente uma a duas horas para dissociar o tecido. As células foram lavadas três vezes com meio modificado 5A de McCoy fresco suplementado com glutamina e penicilina/estreptomicina. Não foi adicionado qualquer soro a este meio. As células foram cultivadas durante toda a noite em 10 ml de meio num balão T-25 para permitir que as células não esteroideogénicas aderissem. No dia seguinte as células não aderentes foram recuperadas, lavadas três vezes com meio fresco, contadas e plaqueadas a uma densidade de $1 \times 10^3/\text{ml}$, com alíquotas de 0,2 ml por alvéolo de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos. Todos os meios na experiência contêm hormona luteinizante (LH) a 4 ng/ml, e lipoproteína de alta densidade (HDL) humana a 300 μg de

proteína/ml. Preparações de péptidos monoméricos, conjugados de péptido-BSA e péptidos auto-conjugados foram adicionadas às células em várias concentrações (0,2 a 50 $\mu\text{g/ml}$). As células foram de seguida cultivadas durante 48 horas a 37°C; os sobrenadantes foram recolhidos, transferidos para uma placa de microtitulação de 96 alvéolos limpa, e mantidos a -20°C até as concentrações de androstenodiona e progesterona serem medidas por radio-imunoensaio. Cada ponto dos dados representa a média das concentrações de androstenodiona medidas em quatro alvéolos por tratamento, e o erro padrão foi inferior a 10 % para todos os pontos dos dados.

Quando examinados no ensaio anteriormente descrito, foram estudados os polipéptidos p139-149, p141-155, p145-154, p150-160, p161-171, p167-176, p172-182 e p174-203, possuindo as sequências apresentadas na Tabela 2, e quando utilizados na forma monomérica não conjugada não apresentaram qualquer efeito sobre a secreção de androgénios. Contudo, quando aqueles mesmos polipéptidos foram utilizados sob a forma de um conjugado com BSA, a produção de androgénios foi inibida numa forma aproximadamente equivalente por todos os péptidos estudados desse modo, indicando uma falta de especificidade, tal como posto em evidência por doses decrescentes de produção de androstenodiona com dose crescente de conjugado. Foi observada uma produção tipicamente linear e decrescente desde cerca de 14 a 28 nanogramas (ng) de androstenodiona por ml a cerca de 0,2 μg de BSA-péptido por ml, até cerca de 4 a 13 ng de androstenodiona por ml a cerca de 15 μg de BSA-péptido por ml. O controlo de PBS exibiu 22,1 ng de androstenodiona por ml.

5. Um Péptido Multimérico e um Auto-Conjugado do Péptido Inibiram Especificamente a Produção de Androgénios Ovários

A capacidade dos polipéptidos e conjugados deste invento para inibirem especificamente a produção de androgénios ovários foi examinada utilizando o ensaio descrito no Exemplo 4. Neste

ensaio, o auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) evidenciou a capacidade para inibir a produção de androgénios pelas células intersticiais/da teca ováricas a uma concentração tão baixa como cerca de 1,5 $\mu\text{g/ml}$, e exibiu menos de 20 % da produção do controlo a 10 $\mu\text{g/ml}$. Em contraste, os auto-conjugados (p93-112)-(p93-112) ou (p172-182)-(p172-182), não contendo a apo E 141-155, não inibiram a produção de androgénios nas concentrações anteriores.

A inibição pela apo E da produção de androstenodiona pelas células ováricas é reversível. Para testar se a actividade inibidora do auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) foi reversível, as células ováricas foram cultivadas com o péptido durante 48 horas. No fim desta cultura, o meio foi removido e substituído por meio fresco sem o péptido auto-conjugado. Tal como representado na Tabela 4, a produção de androstenodiona ovárica foi inibida durante as primeiras 48 horas de cultura mas, depois do péptido ter sido removido e das células ováricas terem sido realimentadas com meio fresco, a sua produção de androstenodiona durante as 48 horas subsequentes voltou aos níveis de controlo. A este respeito, a actividade dos polipéptidos e/ou conjugados do presente invento mimetizou a actividade da apo E nativa.

TABELA 4

A Produção de Androgénios Ováricos Foi Reversivelmente Inibida por um Auto-Conjugado do Péptido de Apo E 141-155^a

<u>Acumulação de Androstenodiona</u> (ng/ml)		
<u>Tratamento</u>	<u>Primeiras 48 h de Cultura</u>	<u>Segundas 48 h de Cultura</u>
PBS	12,13 $\pm$ 0,26	11,27 $\pm$ 0,84
Péptido		
Auto-Conjugado	6,27 $\pm$ 1,26	13,34 $\pm$ 2,75



a As células intersticiais/da teca ováricas (20 000/0,25 ml) foram cultivadas na ausência ou presença do péptido auto-conjugado. Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram removidos e as células foram realimentadas com meio fresco sem péptido auto-conjugado.

Para examinar se a inibição da produção de androgénios observada foi devida a morte celular (citotoxicidade), as culturas de células tratadas foram ensaiadas quanto à produção de progesterona, tal como descrito por Dyer e colab., J. Biol. Chem., 263:10965-10973 (1988). A presença de progesterona na cultura indica que as células são viáveis. Resumidamente, foram adicionadas concentrações crescentes do auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) às células ováricas (1×10^5 /ml), que foram cultivadas a 37°C em meio modificado 5a de McCoy isento de soro, contendo 4 ng/ml de LH e 300 µg/ml de HDL humana. Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram recolhidos, as concentrações de androstenodiona e progesterona (esteróide) foram medidas por radio-imunoensaio, e os dados recolhidos exibiam um erro padrão inferior a 10 % para todos os pontos estudados quando medidos em quadruplicado. De acordo com os resultados deste estudo, para o auto-conjugado (p141-155)-(p141-155) não houve diminuição significativa na produção de progesterona nas concentrações de auto-conjugado (5-10 ug/ml) que inibiam 95 % da produção de androstenodiona (Adione). Este resultado indica que a actividade inibidora observada foi específica e não o resultado da morte celular (citotoxicidade).

6. Um Péptido Dimérico e Auto-Conjugados do Péptido Dimérico Afectam a Proliferação de Linfócitos

A capacidade do péptido dimérico $p(141-155)_2$ e dos auto-conjugados deste péptido $p(141-155)_2$ - $p(141-155)_2$ para afectar a proliferação de linfócitos foi examinada utilizando o ensaio descrito no Exemplo 2.

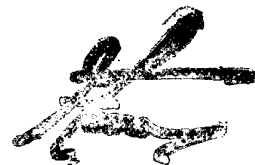
Várias concentrações de vários péptidos de apo E foram adicionadas a culturas que continham 8×10^5 células mononucleares

do sangue periférico por ml. As células foram cultivadas a 37°C e em RPMI com 5 % de soro. Todas as células foram expostas a PHA às 24 horas, marcadas com ³H-timidina às 72 horas, e recolhidas às 90 horas. Foram medidas as contagens por minuto (cpm) de ³H-timidina nas células recolhidas, e os dados foram expressos como a média de quatro alvéolos por tratamento, como uma medida da absorção de timidina (x 1 000 cpm). O desvio padrão foi inferior a 10 % para todas as médias.

O péptido de apo E em tandem p(141-155)₂ aumentou a proliferação de linfócitos em concentrações baixas, e inibiu a proliferação de linfócitos em concentrações elevadas. Esta capacidade para aumentar e inibir a proliferação de linfócitos, dependendo da dose do péptido, mimetiza a actividade da apo E nativa e exhibe uma forma bifásica dependente da dose de afectar a proliferação de linfócitos. O aumento da proliferação de linfócitos foi observado com doses do péptido de apo E em tandem desde cerca de 1 µg/ml a cerca de 3 µg/ml, enquanto que a inibição da proliferação foi observada com concentrações de, pelo menos, cerca de 3 µg/ml até cerca de 30 µg/ml. Os auto-conjugados do péptido de apo E em tandem p(141-155)₂-p(141-155)₂ foram ainda mais potentes do que o péptido de apo E em tandem sózinho na sua capacidade para afectar a proliferação de linfócitos, ocorrendo o aumento tão baixo como de cerca de 0,2 a 1,0 µg/ml e ocorrendo a inibição na gama de cerca de 1,5 a 4 µg/ml.

7. Um Péptido Dimérico e Auto-Conjugados Deste Péptido Afectam a Produção de Androgénios Ováricos

A capacidade do péptido de apo E em tandem p(141-155)₂ e dos auto-conjugados deste péptido para afectar a produção de androgénios ováricos foi examinada utilizando o ensaio descrito no Exemplo 4. Concentrações crescentes do péptido de apo E em tandem foram adicionadas a células ováricas (8 x 10⁴/ml), que foram cultivadas a 37°C em meio modificado 5a de McCoy isento de soro, contendo 4 ng/ml de LH e 300 µg/ml de HDL humana. Após 48 horas de cultura, os sobrenadantes foram recolhidos, e a concentração de androstenodiona foi medida por radio-imuno-



ensaio. Quando o péptido de apo E em tandem foi adicionado em concentrações inferiores a cerca de 0,04 $\mu\text{g/ml}$, a produção de androstenodiona foi aumentada. Concentrações do péptido de apo E em tandem superiores a cerca de 0,2 a 2 $\mu\text{g/ml}$ inibiram a produção de androstenodiona duma forma dependente da dose.

8. O Polipéptido de Apo E Liga Lipoproteínas

Para determinar o grau de ligação do péptido em tandem com as lipoproteínas, o ^{125}I -péptido em tandem foi misturado com lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), LDL, lipoproteína de alta densidade (HDL) ou soro com empobrecido em lipoproteína (LPDS), para medir a ligação directa. Resumidamente, as lipoproteínas foram isoladas por ultracentrifugação de acordo com Curtiss e colab., J. Biol. Chem., 257:15213 (1982). O soro empobrecido em lipoproteína (LPDS) foi obtido como a fracção de fundo, restante após flotação da HDL a uma densidade de 1,25 g/ml. Todas as fracções foram diluídas em PBS contendo 3% de albumina de soro de bovino (BSA). O péptido em tandem p(141-155)₂ foi radiomarcado, utilizando o processo do monocloreto de iodo de Brown e colab., Methods Enzymol., 98:241 (1983), para uma actividade específica de $7,99 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{g}$ e era 99 % precipitável em ácido tricloroacético (TCA) a 10 %. Os ensaios de ligação foram executados em tubos siliconizados num volume total de 0,3 ml de PBS contendo 3 % de BSA, 20 μg de lipoproteína ou LPDS, e 250 ng de ^{125}I -péptido em tandem. Após 1 hora a 37°C, o péptido ligado a lipoproteína foi separado do péptido livre. Os tubos contendo VLDL, LDL e LPDS foram precipitados com 0,3 ml de ácido fosfotúngstico 555 μM e MgCl_2 25 mM, e os tubos contendo HDL foram precipitados com 0,3 ml de um antissoro específico para a apo A-I. Cada condição de precipitação foi previamente optimizada com a utilização de lipoproteínas radio-iodadas, e foi concebida para atingir 100 % de precipitação das lipoproteínas. A radioactividade precipitada foi medida por detecção da radiação gama, e expressa com base na actividade específica, como nanogramas (ng) de péptido ligado por micrograma (μg) de proteína.

Os resultados, apresentados na Tabela 5, indicam que menos de 0,7 % do ^{125}I -péptido em tandem se associou à HDL, e que, respectivamente, 58 % e 39 % do péptido adicionado foram encontrados associados com a VLDL e a LDL. Calculado como o número de moléculas de péptido em tandem ligadas por partícula de lipoproteína, cada uma de VLDL, LDL e HDL continha 1,8, 0,25 e 0,0043 moléculas de péptido por partícula, respectivamente. Por conseguinte, o polipéptido de apo E p(141-155)₂ liga preferencialmente partículas de lipoproteína na seguinte ordem: VLDL > LDL > HDL.

TABELA 5		
LIPOPROTEÍNA OU PROTEÍNA	ng de ^{125}I -Péptido em Tandem ligado por μg de proteína	Razão Molar de Péptido por Partí- cula de Lipoproteína
VLDL	7,25	1,8
LDL	1,87	0,25
HDL	0,07	0,0043
LPDS	0,76	-

9. Um Péptido em Tandem Afecta a Ligação e a Degradação da LDL

As propriedades de ligação ao receptor de LDL do péptido em tandem foram determinadas utilizando fibroblastos humanos normais e uma linha de células do tipo de monócitos humanos transformados, THP1, como fonte do receptor de LDL. As células THP-1 foram estudadas porque quer o receptor de LDL quer outro receptor lipoproteico, o receptor de limpeza, se encontram presentes e a ligação com esses receptores é facilmente examinada. No estado não diferenciado as células THP-1 expressam receptores de LDL que são regulados pelo teor em lipoproteínas do meio de cultura; Hara e colab., Biochem. Biophys. Res. Commun., 146:802 (1987); Via e colab., J. Lipid Res., 30:1515 (1989). Depois da estimulação com éster de miristato-acetato de forbol (PMA), as células pararam de se dividir, diferenciaram-se em células do tipo de macrófagos, perderam eventualmente a maior

parte dos seus receptores de LDL e adquiriram receptores de limpeza que ligam LDL acetilada ou modificada; Hara e colab., Biochem. Biophys. Res. Commun., 146:802 (1987); Via e colab., J. Lipid Res., 30:1515 (1989).

a. Inibição da degradação por células THP-1
não estimuladas

As células THP-1 foram adquiridas na American Type Culture Collection, e foram cultivadas em meio RPMI-1640 isento de soro, suplementado com 1 % de Nutridoma-Hu, durante 48 horas para regular no sentido do aumento os receptores de LDL. A LDL foi isolada por ultracentrifugação e radiomarcada utilizando o processo do monocloreto de iodo, tal como descrito no Exemplo 8, para uma actividade específica de 200-300 cpm/ng. Mais de 99 % do ligando de ^{125}I -LDL era precipitável por TCA a 10 %. Foram sintetizados os péptidos indicados na Figura 1, tal como descrito no Exemplo 1, purificados a > 95 % por cromatografia líquida de alta pressão, tendo sido verificada a sua composição em aminoácidos. Todos os péptidos foram solubilizados em PBS. "AI 74-105" é um péptido de controlo derivado dos resíduos 74-105 da apolipoproteína A-I. "Monómero" é p(141-155). "Péptido em tandem" é p(141-155)₂. "LDL" é LDL não marcada, e "aLDL" é LDL acetilada.

A ligação e a degradação da LDL foram avaliadas como o desaparecimento da radioactividade de ^{125}I -LDL solúvel em ácido da incubação durante uma incubação de 5 horas a 37°C. Várias concentrações de LDL não marcada ou de péptido de apo E em tandem foram co-incubadas com ^{125}I -LDL a fim de determinar os seus efeitos sobre a ligação e a degradação.

Para o ensaio, 5×10^5 células THP-1 em 0,5 ml de DMEM foram co-incubadas num tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com 2-5 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -LDL a 37°C na presença de várias concentrações dos competidores indicados na Figura 1. Após 5 horas, as células foram sedimentadas a 5 000 x g, os sobrenadantes foram removidos e extractados com TCA a 10 %, e contados para formar uma cpm solúvel em TCA. Os resultados foram expressos como B/B_0 , onde B

equivale ao cpm solúvel em TCA total no sobrenadante recolhido na presença de LDL ou péptido, e B_0 equivale ao cpm solúvel em TCA total no sobrenadante de células de controlo tratadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Cada ponto representa a média de 4 réplicas, com erro padrão da média (SEM), 10 %.

Tal como representado na Figura 1A, o péptido de apo E em tandem, p(141-155)₂, aumentou a degradação da LDL por células THP-1 não estimuladas em concentrações baixas, e inibiu a degradação da LDL em concentrações elevadas; isto é, o efeito foi bifásico. Nesta experiência, o aumento da concentração de LDL ocorreu com concentrações do péptido de apo E em tandem variando desde cerca de 0,08 até cerca de 1,5 μ M. A inibição da degradação da LDL começou a ocorrer a níveis do péptido de apo E em tandem de 2,0 a 5,0 μ M. A LDL não marcada inibiu a degradação da ^{125} I-LDL, indicando a especificidade do receptor de LDL.

Pode ser verificado que nem um péptido 74-105 de apo A-I de controlo nem o péptido 141-155 de apo E monomérico LDL inibiram a degradação da ^{125} I-LDL. Em contraste, o péptido de apo E em tandem inibiu a degradação da ^{125} I-LDL em 50 % a 5 μ M. Foi necessário um excesso molar de aproximadamente 200 vezes do péptido de apo E em tandem em comparação com a LDL para alcançar uma inibição da degradação de 50 %.

b. A inibição é específica do receptor de LDL

Para verificar que a inibição da degradação da LDL foi específica para o receptor de LDL, foi testado o efeito do péptido em tandem sobre o receptor de limpeza processando a LDL acetilada (aLDL).

Células THP-1 (5×10^5 em 1,0 ml de meio DMEM por placa de cultura de 16 mm) foram estimuladas com PMA (10^{-7} M) durante 4 dias. A LDL foi acetilada (Hara e colab., Biochem. Biophys. Res. Comm., 146(2):802-808, 1987) e, em seguida, radiomarcada tal como descrito no Exemplo 8 até uma actividade específica de 300-500 cpm/ng originando ^{125} I-aLDL que era mais de 99 %

precipitável por TCA a 10 %. As células foram lavadas com PBS e o ensaio foi executado em meio DMEM suplementado com 1 % de Nutridoma-Hu mais 25 ug/ml de ^{125}I -aLDL. Após 5 horas a 37°C, os sobrenadantes foram removidos dos alvéolos e extractados com TCA a 10%. As razões B/B_0 foram analisadas tal como anteriormente descrito. Os resultados encontram-se representados na Figura 1B.

Nem a LDL nem o péptido em tandem inibiram a degradação da ^{125}I -aLDL por células THP-1 estimuladas por PMA. Tal como pode ser observado na Figura 1B, a 12,5 μM o péptido de apo E em tandem provocou uma inibição de 80 % na degradação da ^{125}I -LDL, mas não apresentou qualquer efeito sobre a degradação da ^{125}I -aLDL.

10. Confirmação da Ligação pelo Receptor de LDL e Identificação dos Aminoácidos Críticos

O papel de aminoácidos específicos dentro dos resíduos 141-155 da apo E intacta foi estudado por Lalazar e colab., J. Biol. Chem., 263:3542 (1988) com variantes da apo E humana contendo substituições de aminoácidos simples. As variantes foram produzidas num sistema de expressão bacteriana formando um complexo com o fosfolípido, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), e foram testadas quanto à sua capacidade para se ligarem aos receptores de LDL de fibroblasto. Lalazar e colab., J. Biol. Chem., 263:3542 (1988). Para confirmar que o péptido em tandem foi ligado pelo receptor de LDL e para identificar os aminoácidos dentro deste péptido que são críticos para a ligação, foram preparados, tal como descrito no Exemplo 1, três péptidos em tandem que continham as mesmas substituições de aminoácidos em ambas as posições na sequência em tandem. As alterações incluíam substituições dos aminoácidos básicos Lys 143 para Ala, Arg 150 para Ala, e Leu 144 com um aminoácido rompendo a hélice alfa, Pro. Foi utilizada ^{125}I -LDL, a uma actividade específica de 700-900 cpm/ng (> 99 % precipitável por TCA a 10 %), para o ensaio de ligação tal como descrito no Exemplo 9. Os fibroblastos normais foram colocados em placas de cultura de 16 mm, cultivados durante 72-96 horas em meio DMEM com 10 % de soro de bovino fetal (FBS), e de seguida



transferidos para meio DMEM com 10 % de soro empobrecido em lipoproteínas (LPDS) durante 48 horas para regular para cima os receptores de LDL. A quantidade de ^{125}I -LDL ligada por alvéolo foi normalizada para o teor em proteína de cada alvéolo, o qual foi medido com o reagente do ensaio proteico de Bio-Rad, utilizando albumina de soro de bovino (BSA) como padrão.

Tal como ilustrado na Figura 2, cada uma das substituições no $\text{p}(141-155)_2$ reduziu a capacidade do péptido em tandem para inibir a ligação da ^{125}I -LDL aos fibroblastos. A substituição de Lys 143 para Ala apresentou o menor dos efeitos, enquanto que a substituição de Leu 144 para Pro teve o maior dos impactos. Na realidade, o péptido em tandem substituído de Leu 144 para Pro não apresentou qualquer actividade a 60 uM, um efeito que foi semelhante àquele observado com a variante de apo E nativa. Lalazar e colab., J. Biol. Chem., 263:3542 (1988). Assim, os multímeros dos péptidos de apo E que definem uma porção de ligação ao receptor de LDL podem apresentar substituições de Lys (143) para Ala ou de Arg (150) para Ala sem alterações significativas na actividade biológica dos multímeros.

11. Multímeros de Ordem Mais Elevada da Sequência 141-155
Podem Apresentar Maior Actividade de Ligação

Um trímero do péptido $\text{p}141-155$, $\text{p}(141-155)_3$, foi sintetizado tal como no Exemplo 1 e a sua actividade comparada com a dos péptidos $\text{p}(141-155)$ (monomérico) e $\text{p}(141-155)_2$ (dimérico). Fibroblastos normais foram colocados nos alvéolos duma placa de cultura de 96 alvéolos e cultivados durante 96 horas em meio DMEM com 10 % de FBS. As células foram transferidas para meio DMEM com 10 % de LPDS durante 48 horas para regular no sentido do aumento os receptores de LDL. O ensaio de degradação da LDL foi executado de acordo com o Exemplo 9 com 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ^{125}I -LDL (300-500 cpm/ng) em 0,2 ml/alvéolo em meio DMEM com 10 % de LPDS, e incubado durante 5 horas a 37°C. Os sobrenadantes removidos dos alvéolos foram extractados com TCA a 10 %. As contagens solúveis em TCA foram normalizadas para o teor em proteínas por alvéolo, tal como medido pelo ensaio de proteínas de Bio-Rad.

Comparando numa base molar a sua capacidade para inibir a degradação da ^{125}I -LDL, o péptido trimérico foi 15 vezes mais eficaz do que o péptido dimérico (Figura 3). Os resultados indicam que os multímeros de ordem mais elevada da sequência 141-155 apresentam actividade de ligação ao receptor aumentada.

12. Número Total de Locais de Ligação por Célula

Foi medida a ligação directa do ^{125}I -péptido em tandem [$\text{p}(141-155)_2$] para células THP-1 em divisão. As células THP-1 foram cultivadas durante 48 horas em meio RPMI-1640 isento de LDL contendo 1 % de Nutridoma-Hu. Quantidades crescentes do ^{125}I -péptido em tandem (17 444 cpm/pmole), marcado tal como descrito no Exemplo 8, foram adicionadas a 5×10^5 células/0,05 ml de meio DMEM contendo 1 % de Nutridoma-Hu combinado com 0,05 ml de PBS ou 0,05 ml de VLDL a 500 $\mu\text{g/ml}$, em tubos de vidro siliconizado. Após 20 minutos a 4°C , o ^{125}I -péptido em tandem livre foi separado do péptido ligado por sedimentação das células através de óleo de silicone. As contagens de fundo foram $< 1\,000$ cpm/tubo.

A ligação do ^{125}I -péptido em tandem apresentou-se linear com o número de células, saturável, e alcançou um estado estacionário aparente dentro de 20 minutos a 4°C . A ligação do ^{125}I -péptido em tandem a células THP-1 foi especificamente inibida por lipoproteínas contendo apo B e apo E, com a capacidade para inibir ordenada como se segue:

VLDL > LDL > HDL.

A ligação do ^{125}I -péptido em tandem às células também se apresentou dependente do Ca^{++} . Foi obtido um aumento de 2 vezes na quantidade de ^{125}I -péptido em tandem ligado às células quando as concentrações de Ca^{++} foram aumentadas de 0,1 para 2,0 mM, enquanto que Mg^{++} tão elevado como 2,0 mM não apresentou qualquer efeito. Finalmente, se as células THP-1 forem privadas de soro contendo LDL durante 96 horas antes da ligação do ^{125}I -péptido em tandem ser testada, é observado um aumento de 2-3 vezes com ambos os ligandos, indicando uma regulação no

sentido do aumento do receptor de LDL e do local de ligação do péptido em tandem.

Quando a ligação do ^{125}I -péptido em tandem às células THP-1 cultivadas em meio isento de LDL foi estudada na presença de 2,0 mM de Ca^{++} e na ausência e presença de 500 $\mu\text{g/ml}$ de VLDL, a ligação saturável específica foi observada com um K_d de $1,1 \times 10^{-7}\text{M}$. A ligação não específica (isto é, a ligação na presença de 500 $\mu\text{g/ml}$ de VLDL) representou, em média, 23,4 % do total de contagens ligadas. Com base nestes dados, o número total de locais de ligação por célula foi calculado como sendo de 1 500.

Embora os dados indiquem que o péptido em tandem se liga ao receptor de LDL, o receptor de LDL pode não ser o único local de ligação no fibroblasto ou THP-1 para o péptido em tandem. A proteína relacionada com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) é uma proteína da superfície celular recentemente descrita, que contém sequências reiteradas, que são homólogas a sequências semelhantes no receptor de LDL; Herz e colab., EMBO J., 7:4119 (1988); Beisiegel e colab., Nature, 341:162 (1989). Estudos recentes indicam que a LRP pode apenas interagir com lipoproteínas enriquecidas em apo E, incluindo beta-VLDL; Kowal e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5810 (1989). Contrariamente ao receptor de LDL, o receptor de LRP nos fibroblastos não parece ser regulado no sentido da diminuição pela exposição das células ao LDL; Kowal e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5810 (1989).

13. Aplicação Terapêutica

O alojamento específico de um polipéptido de apo E, tal como um péptido em tandem, para lipoproteínas ricas em colesterol é conseguida concebendo um péptido sintético que possui propriedades de ligação de alta afinidade ao lípido e ao receptor. A fixação do péptido em tandem 141-155, $\text{p}(141-155)_2$, a um péptido ou molécula lipofílica facilita uma associação específica de alta afinidade da sequência em tandem com lipoproteínas ricas em colesterol, e aumenta a clearance

hepática da lipoproteína da circulação. Foi observado um aumento significativo e reprodutível da degradação da LDL pelas células THP-1 (Figura 1A) e pelos fibroblastos (Figura 3) a concentrações baixas do péptido em tandem, quando o péptido em tandem entrou em contacto com as células in vitro.

Existem vários Exemplos citados na literatura nos quais foi observado que a função da apo E é dependente do número de moléculas de apo E por partícula de lipoproteína: (a) a redução do número de moléculas de apo E por complexo DMPC origina ligação diminuída; Mahley e colab., Biochem. Biophys. Acta, 737:197 (1983); (b) a absorção de VLDL pelo fígado é aumentada pela adição de cópias adicionais de apo E acessível à trombina; Bradley e colab., J. Biol. Chem., 259:14728 (1984); (c) é necessária uma média superior a uma molécula de apo E por partícula, para que a VLDL estimule a esterificação do colesterol pelos macrófagos; Soltys e colab., J. Lipid Res., 29:191 (1988); (d) as VLDL portadoras de mais apo E são mais rapidamente removidas do sangue; Yamada e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:665 (1989); e finalmente, (e) apenas a beta-VLDL enriquecida em apo E é incorporada pelo receptor de LRP; Kowal e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5810 (1989). Acredita-se aqui que este requisito reflecte a associação estreita de, pelo menos, duas cópias de apo E para formar um ligando de apo E competente para o receptor de LDL. As verificações aqui descritas determinam que podem ser utilizadas vários números de cópias da apo E.

14. Preparação de Anti-Soros Policlonais para Péptidos Sintéticos

a. Preparação de imunogénio

A LDL foi isolada a partir de plasma obtido por plasmaforese de sangue de coelho reunido normal (Scripps Clinic and Research Foundation Vivarium, La Jolla, Calif.). O plasma assim obtido foi ajustado para conter uma concentração final de benzamidina 2 milimolar (mM), ácido etilenodiaminatetraacético 14 mM (sal dissódico) (EDTA), 20 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de inibidor da tripsina de soja, 10 000 unidades por ml

de aprotinina, 20 $\mu\text{g/ml}$ de inibidor da tripsina de feijão de lima, 25 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno e D-fenilalanil-1-propil-1-arginina-clorometil-cetona (PPACK). A LDL foi, seguidamente, isolada a partir deste plasma ajustado por ultracentrifugação sequencial utilizando brometo de potássio sólido (KBr) para ajuste da densidade.

Primeiro, o plasma ajustado foi centrifugado a 186 000xg durante 18 a 24 horas a 4°C. A camada superior do sobrenadante resultante contendo apo/VLDL foi removida e retida. A camada do fundo do sobrenadante foi recuperada e misturada com a camada de KBr sólido até a densidade ser superior a 1,063 gramas por mililitro (g/ml). A mistura resultante foi de seguida colocada em camada sob uma solução de EDTA a 0,1 % contendo KBr a uma densidade de 1,063 g/ml e centrifugada a 186 000xg durante 18 a 24 horas.

Após a segunda centrifugação, a camada superior contendo LDL foi recuperada e a camada do fundo contendo HDL foi rejeitada. A camada superior foi misturada com KBr sólido até a densidade estar ajustada a mais de 1,063 g/ml. Essa camada ajustada foi colocada em camada sob uma solução de EDTA a 0,1 % contendo KBr a uma densidade de 1,21 g/ml e foi centrifugada a 186 000xg durante 18 a 24 horas, a 4°C.

A camada superior foi, então, recuperada e foi misturado KBr sólido até a densidade ser superior a 1,063 g/ml. Essa camada superior ajustada foi colocada em camada sob uma solução de EDTA a 0,1 % contendo KBr a uma densidade de 1,063 g/ml, e centrifugada adicionalmente a 250 000xg durante 18 a 24 horas, a 4°C. A camada superior contendo LDL concentrada foi recuperada e dialisada contra PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2) e foi armazenada a -70°C.

Os análogos polipeptídicos multiméricos de apo E, (p141-155)₂, (p141-155)₃, e auto-conjugados dos mesmos, foram sintetizados tal como descrito no Exemplo 1a e b. O polipéptido de apo E p(141-155)₂ foi dissolvido em acetato de sódio 1,5M, pH

7,8, até uma concentração final de 6 mg/ml num volume total de 5 ml. Um polipéptido dissolvido foi misturado com 2,5 ml de cada um de uma solução de LDL a 2 mg/ml e de uma solução de acetato de sódio 3M, pH 7,8, para uma proporção de péptido:LDL de 1 000:1. Uma solução de glutaraldeído 500 mM foi adicionada à mistura reaccional de polipéptido e LDL, utilizando um excesso molar de 2,7 do glutaraldeído para o péptido. A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 10 minutos, após o que foi adicionada uma solução 40 mM de boro-hidreto de sódio até uma concentração final de 0,2 mM. A mistura foi seguidamente mantida a 37°C durante 5 a 8 horas, seguida por diálise contra PBS durante 5 dias com duas trocas de tampão por dia, utilizando tubagem de diálise com uma exclusão de peso molecular de 12 000 a 14 000. A solução dialisada foi centrifugada a 2 500xg durante 10 minutos e a pelota resultante foi ressuspensa em 5 ml de PBS para formar um imunogénio de péptido-LDL. Um imunogénio de péptido-LDL foi preparado utilizando o polipéptido anteriormente descrito, nomeadamente p(141-155)2.

b. Imunização e recolha de anti-soros policlonais

O imunogénio de péptido-LDL preparado no Exemplo 14a, anterior, foi emulsionado utilizando o Sistema Adjuvante de Ribí (Ribí Immunochem Research, Inc., Hamilton, Montana) de acordo com as instruções do fabricante. Os antigénios de péptido-LDL foram incorporados na emulsão a uma concentração de 300 µg/ml. Depois de amostras de soro pré-imune serem recolhidas, foram injectados dois coelhos com 1 ml de uma emulsão preparada. A dose de emulsão de 1 ml foi administrada como se segue: 0,30 ml por via intradérmica (0,05 ml em cada um de 6 locais); 0,40 ml por via intramuscular (0,2 ml em cada uma das patas traseiras); 0,10 ml por via subcutânea (na região do pescoço); e 0,20 ml por via intraperitoneal. Os coelhos foram injectados 6 vezes com intervalos de três semanas, seguindo o protocolo de injeção tal como pormenorizado. Uma semana após as segunda a sexta injeções, foram recolhidas amostras de sangue para verificar o título de anticorpo contra o péptido específico utilizado como imunogénio pelo ensaio do SPRIA descrito abaixo. As amostras de sangue recolhidas foram agitadas numa estufa a 37°C durante 1

hora, após o que as amostras foram centrifugadas a 3 000xg durante 20 minutos. A interface foi recolhida e centrifugada numa microcentrífuga a 12 000xg durante 5 minutos. O sobrenadante contendo os anticorpos anti-péptido foi recolhido e armazenado a -20°C.

Os títulos em anticorpo para o péptido foram determinados por radio-imunoensaio de fase sólida (SPRIA), essencialmente tal como descrito em Curtiss e Edgington, J. Biol. Chem., 257:15213-15221 (1982). Resumidamente, 50 µl de PBS, contendo 5 µg/ml de péptidos sintéticos, foram misturados nas cavidades de placas de microtitulação. As placas foram mantidas durante toda a noite (cerca de 16 horas) a 4°C, a fim de permitir que os péptidos aderissem às paredes dos alvéolos. Após lavagem dos alvéolos, quatro vezes, com tampão de SPRIA (KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,03 mM, 0,05 % de Tween-20, Traysol a 0,1 KIU/ml, 0,1 % de BSA, 0,015 % de NaN₃), foram misturados 200 µl de tampão SPRIA, contendo 3 % de soro de cabra normal (NGS) e 3 % de albumina de soro de bovino (BSA), a cada alvéolo para bloquear o excesso de locais de ligação da proteína. As placas foram mantidas durante 30 minutos a 20°C, os alvéolos foram esvaziados por agitação, e secas por absorção em papel para formar um suporte sólido, isto é, uma matriz sólida à qual foi operativamente afixado um polipéptido de apo E.

A cada alvéolo foram então misturados 50 µl de sobrenadante de soro contendo anticorpos anti-péptido, a fim de testar por SPRIA uma mistura de imunorreacção de fase sólida-líquida. A mistura foi mantida durante 2 horas a 37°C para permitir a formação de produtos de imunorreacção de fase sólida-líquida. Após lavagem dos alvéolos tal como anteriormente descrito, foram misturados em cada alvéolo 50 µl de um segundo anticorpo de revelação, IgG de cabra anti-ratinho marcada com ¹²⁵I, a 0,25 µg de proteína por ml, para formar uma mistura reaccional de marcação. Essa mistura foi mantida a 37°C durante 1 hora a fim de permitir a formação de produtos de imunorreacção de fase sólida marcados com ¹²⁵I. Após lavagem dos alvéolos tal como anteriormente descrito, a quantidade de produto marcado com

^{125}I ligado a cada alvéolo foi determinada por medição da radiação gama emitida pelo produto marcado. Os títulos em anticorpo anti-péptido específico nas amostras de soro recolhidas de coelhos imunizados foram, deste modo, determinados e comparados com os títulos medidos utilizando amostras de soro de coelho normal pré-imunizado, que são uma medida do fundo não específico. Considera-se que as amostras de soro contêm anticorpos policlonais anti-péptido se o sinal radioactivo fôr 5 vezes maior do que aquele observado com soro de coelho normal.

Os anticorpos anti-polipéptido de apo E foram obtidos pelo processo anterior quando foi utilizado um imunogénio de péptido-LDL que contém o péptido de apo E $\text{p}(141-155)_2$.

Anticorpos anti-polipéptido de apo E adicionais são preparados utilizando imunogénios de péptido-LDL com base nos péptidos de apo E $\text{p}(141-155)_3$ e auto-conjugados de $\text{p}(141-155)_2$ e de $\text{p}(141-155)_3$.

O ensaio anteriormente descrito é utilizado para determinar se estes anti-soros policlonais ligam a apo E/VLDL. A apo E/VLDL é preparada tal como descrito no Exemplo 14a, anterior. No lugar de péptidos sintéticos, são misturados nos alvéolos das placas de microtitulação 50 μl de PBS contendo 5 $\mu\text{g/ml}$ de apo E/VLDL. Os ensaios de SPRIA executados desta forma indicam que os anticorpos ligam a apo E/VLDL.

15. Preparação do Anticorpo Monoclonal

a. Geração de hibridomas

Ratinhos Balb/c ByJ (Scripps Clinic and Research Foundation Vivarium, La Jolla, CA) foram imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 50 μg de lipoproteína (o complexo polipéptido-portador é utilizado no caso da apo E) em adjuvante completo de Freund (CFA), seguido por uma segunda imunização em tampão de lipoproteína no dia 28, 3 dias antes da fusão.

Os animais imunizados com o análogo polipeptídico multimérico de apo E, $\text{p}(141-155)_2$, conjugado com LDL tal como

descrito no Exemplo 14a, são sacrificados e o baço de cada ratinho é recolhido. É então preparada uma suspensão de células do baço. As células do baço são de seguida extraídas da suspensão de células do baço por centrifugação durante cerca de 10 minutos a 1 000 rpm, a 23°C. Após a remoção do sobrenadante, a pelota de células é ressuspensa em 5 ml de tampão de lise de NH₄Cl frio, e é incubada durante cerca de 10 minutos.

À suspensão de células lisadas são misturados 10 ml de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO) e tampão HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperidíniaetanossulfónico], e essa mistura é centrifugada durante cerca de 10 minutos a 1 000 rpm a 23°C.

O sobrenadante é decantado, a pelota é ressuspensa em 15 ml de DMEM e HEPES e é centrifugada durante cerca de 10 minutos a 1 000 rpm, a 23°C. O processo anterior é repetido.

A pelota é de seguida ressuspensa em 5 ml de DMEM e HEPES. Uma alíquota de suspensão de células do baço é então removida para contagem. As fusões são executadas como se segue utilizando a linha de células de mieloma de ratinho não secretora P3X63Ag8.653.1, um subclone da linha P3X63Ag8.653 (ATCC 1580). Utilizando uma razão de células de mieloma para células do baço de cerca de 1 para 10 ou de cerca de 1 para 5, uma quantidade suficiente de células de mieloma é centrifugada até uma pelota, lavada duas vezes em 15 ml de DMEM e HEPES, e centrifugada durante 10 minutos a 1 000 rpm, a 23°C.

As células do baço e as células do mieloma são combinadas em tubos de 15 ml de fundo redondo. A mistura de células é centrifugada durante 10 minutos a 1 000 rpm a, 23°C, e o sobrenadante é removido por aspiração. Seguidamente, são misturados 200 µl de polietilenoglicol de massa molecular 4 000, aquoso, a 50 % (peso em volume) (PEG; ATCC Baltimore, MD) a cerca de 37°C, utilizando uma pipeta de 1 ml, com agitação vigorosa para desintegrar a pelota, e as células são misturadas suavemente durante entre 15 e 30 segundos. A mistura de células

é centrifugada 4 minutos a 700 rpm.

Cerca de 8 minutos depois da adição do PEG, 5 ml de DMEM mais tampão HEPES são lentamente misturados à pelota, sem perturbar as células. Após 1 minuto, a mistura resultante é fragmentada com uma pipeta de 1 ml, e é incubada durante mais 4 minutos. Esta mistura é centrifugada durante 7 minutos a 1 000 rpm. O sobrenadante é decantado, 5 ml de meio HT (hipoxantina/timidina) são lentamente misturados à pelota, e a mistura é mantida em repouso durante 5 minutos. A pelota é de seguida fragmentada em pedaços grandes, e a suspensão de células final é colocada em balões T75 (2,5 ml por balão), nos quais tinham sido previamente colocados 7,5 ml de meio HT. A suspensão de células resultante é incubada a 37°C para crescimento das células fundidas. Após 245 horas, 10 ml de meio HT são misturados aos balões, seguidos 6 horas mais tarde pela mistura de 0,3 ml de aminopterina 0,04 mM. Quarenta e oito horas depois da fusão, 10 ml de meio HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina) são misturados aos balões.

Três dias depois da fusão, as células viáveis são colocadas em placas de cultura de tecidos de 96 alvéolos, a cerca de 2×10^4 células viáveis por alvéolo (total de 768 alvéolos) em meio tampão HAT, tal como descrito em Kennett e colab., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81:77 (1978). As células são alimentadas sete dias depois da fusão com meio HAT, e seguidamente, como necessário, a intervalos de aproximadamente 4-5 dias com meio HT. O crescimento foi seguido microscopicamente, e os sobrenadantes das culturas foram recolhidos cerca de duas semanas mais tarde e analisados quanto à presença de moléculas de anticorpo imunorreagindo com o polipéptido imunizante, por radio-imunoensaio (SPRIA) de fase sólida, tal como descrito no Exemplo 14b.

Resumidamente, 50 µl de PBS contendo 5 µg/ ml do polipéptido de apo E imunizante, (p141-155)₂, são misturados nos alvéolos de placas de microtitulação. As placas são mantidas durante 3 horas à temperatura ambiente a fim de permitir a

aderência do polipéptido às paredes dos alvéolos. Após lavagem dos alvéolos, quatro vezes, com tampão de SPRIA (KCl 2,68 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8,03 mM, 0,05 % de Tween-20, Traysol a 0,1 KIU/ml, 0,1 % de BSA, 0,015 % de NaN_3), 200 μl de tampão de SPRIA contendo 3 % de soro de cabra normal (NGS) e 3 % de albumina de soro de bovino (BSA) são misturados em cada alvéolo para bloquear o excesso de locais de ligação da proteína. As placas foram mantidas durante 30 minutos a 20°C, os alvéolos foram esvaziados por agitação, e secas por absorção por papel para formar um suporte sólido, isto é, uma matriz sólida à qual foi operativamente afixado um polipéptido de apo E.

A cada alvéolo contendo um polipéptido imunizante foram de seguida misturados 50 μl de sobrenadante de cultura de tecido de hibridoma, produzido pelo polipéptido imunizante correspondente, a fim de formar uma mistura imunorreaccional de fase sólida-líquida. A mistura é mantida durante duas horas a 37°C para permitir a formação de produtos de imunorreacção de fase sólida-líquida. Após lavagem dos alvéolos tal como anteriormente descrito, 50 μl de anti-IgG de ratinho de cabra marcado com ^{125}I , a 0,25 μg de proteína por ml, foram misturados em cada alvéolo para formar uma mistura reaccional de marcação. Essa mistura foi mantida a 37°C durante 1 hora a fim de permitir a formação de produtos de imunorreacção de fase sólida marcados com ^{125}I . Após lavagem dos alvéolos tal como anteriormente descrito, a quantidade de produto marcado com ^{125}I ligado a cada alvéolo foi determinada por medição da radiação gama emitida pelo produto marcado. Considera-se que os sobrenadantes de cultura de hibridoma contêm anticorpos anti-polipéptido de apo E, se o produto de imunorreacção formado produzir um sinal radioactivo 5 vezes maior do que o sinal medido utilizando um sobrenadante de cultura de hibridoma de controlo.

O anticorpo monoclonal anti-apo B-100 MB47 foi preparado essencialmente tal como anteriormente descrito, excepto que a LDL foi utilizada como imunogénio, e que o anticorpo foi seleccionado por pesquisa de imunorreacção com a apo B-100 isolada.

b. Isolamento da imunoglobulina

Os fluidos ascíticos contendo moléculas de anticorpo monoclonal úteis foram preparados utilizando ratinhos Balb/c de 10 semanas. Os ratinhos foram primeiramente sensibilizados com 0,3 ml de óleo mineral e injectados intraperitonealmente com $3-50 \times 10^5$ células de hibridoma MB47, preparadas tal como descrito no Exemplo 15a. O tempo médio para o desenvolvimento da ascite foi de 12 dias. O fluido ascítico resultante foi recolhido e clarificado por centrifugação a 15 000 x g durante 1 hora a 4°C para formar fluidos ascíticos clarificados, os quais podem ser reunidos e armazenados, se desejado, a -20°C.

As moléculas de anticorpo monoclonal MB47 isoladas foram preparadas por cromatografia dos fluidos ascíticos clarificados numa coluna de Proteína A-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ). O anticorpo foi eluído da coluna com ácido acético 0,1 molar (M), para formar o anticorpo monoclonal MB47 isolado.

As moléculas de anticorpo monoclonal isoladas também foram preparadas por cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) do fluido ascítico clarificado numa coluna de permuta aniónica Pharmacia Mono Q HR 5/5 num Sistema para FPLC de Pharmacia, utilizando um gradiente de NaCl de 0-0,5 M em Tris 10 mM, pH 8,0, e seguindo as instruções fornecidas com a coluna. As moléculas de anticorpo monoclonal isoladas resultantes foram concentradas utilizando uma célula de ultrafiltração agitada de Amicon (Danvers, MA; membrana PM 30) até uma concentração de 1 mg/ml, dialisadas para PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2), e armazenadas a -70°C, para formar o anticorpo monoclonal purificado.

As moléculas de anticorpo monoclonal anti-polipéptido de apo E podem ser purificadas como anteriormente utilizando o hibridoma, o qual pode ser preparado pelos processos do Exemplo 15a, a fim de formar anticorpo monoclonal anti-polipéptido de apo E purificado.

16. ELISA para Polipéptido de Fase Sólida

Os polipéptidos de apo E preparados no Exemplo 1 imunorreagem com um anticorpo anti-polipéptido de apo E num ELISA de ligação directa. No ensaio, 50 $\mu\text{g/ml}$ duma solução contendo o polipéptido de $(\text{p141-155})_2$ são dissolvidos em PBS para formar uma solução de revestimento de péptido, da qual 150 μl são misturados nos alvéolos duma placa de microtitulação. Os alvéolos são, de seguida, mantidos durante cerca de 16 a 20 horas a 4°C para permitir a adsorção (revestimento) do péptido às paredes dos alvéolos. Após remoção da solução de revestimento do péptido por agitação, os alvéolos são lavados uma vez com 350 μl de tampão de lavagem (PBS contendo BSA a 1 g/l, Tween-20 a 0,5 ml/l, e aprotinina a 2 $\mu\text{l/l}$). Os locais de ligação da proteína em excesso são bloqueados por mistura de 200 μl de tampão de bloqueio (PBS contendo 3 % de BSA) em cada alvéolo, manutenção dos alvéolos durante 1 hora a 37°C , remoção do tampão de bloqueio por agitação e, em seguida, lavagem dos alvéolos, três vezes, tal como anteriormente descrito. A placa é então seca durante 1 hora a 37°C , seguida pela adição de 100 μl de PBS contendo anticorpo anti- $(\text{p141-155})_2$ conjugado com peroxidase de rábano sivestre a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, preparado de acordo com o processo de Nakane e colab., J. Histochem. Cytochem., 22:1084 (1974), para formar uma mistura de imunorreacção de fase sólida-líquida. A mistura de imunorreacção de fase sólida-líquida resultante é mantida a 20°C durante 1 hora a fim de permitir a formação de um produto de imunorreacção contendo polipéptido de fase sólida. As cavidades são então lavadas 3 vezes com tampão de lavagem para remover o anticorpo não ligado.

Os ensaios são executados duma forma idêntica utilizando anticorpos policlonais anti- $\text{p}(141-155)_3$, os quais são originados tal como anteriormente descrito e conjugados com peroxidase de rábano silvestre.

A quantidade de produto de imunorreacção presente na fase sólida é, em seguida, determinada por mistura de 200 microlitros de substrato de OPD (3 % de H_2O_2 e o-fenilenodiamina a 0,67 mg/ml) em cada alvéolo para formar uma mistura reaccional de

desenvolvimento. A mistura é mantida durante 30 minutos a cerca de 20°C. Subsequentemente, 50 µl de H₂SO₄ 4N são misturados em cada alvéolo para parar a reacção de desenvolvimento, e a solução resultante é analisada quanto à absorvância a 450 nanómetros utilizando um leitor de placa de microtitulação (Dynatech) para detectar a quantidade de produto de imunorreacção formado.

A fim de determinar a especificidade das moléculas de anticorpo utilizando o mesmo ensaio, é preparado um péptido monomérico, p141-155, tal como descrito no Exemplo 1, e testado como anteriormente. Adicionalmente, são preparados e testados os péptidos de controlo p93-112 e p172-182. Os resultados, em todos os casos, indicam que estes anticorpos não ligam nem o monómero nem os péptidos de controlo.

Um ELISA de competição é útil para detectar um polipéptido de apo E ou a apo E numa amostra de fluido, tal como soro. As placas de microtitulação são revestidas com o dímero (p141-155)₂, tal como anteriormente descrito. Após o passo de secagem do ensaio anteriormente descrito, 50 µl duma amostra de fluido (isto é, uma amostra de fluido contendo polipéptido de apo E ou apo E) ou de um padrão (isto é, um polipéptido de apo E como padrão) a ser analisado, são misturados no alvéolo revestido com polipéptido simultâneamente com 50 µl de anticorpo anti-péptido conjugado com HRPO, para formar uma mistura de imunorreacção. No ensaio aqui descrito, são testados dois competidores (padrão de polipéptido ou a amostra de fluido), em misturas de imunorreacção separadas, quanto à sua capacidade para competir para a ligação do anticorpo anti-apo E ao análogo polipeptídico revestido, numa gama de diluições do anticorpo. O padrão de polipéptido em solução é adicionado numa concentração de partida de 1 mg/ml, e é diluído em série até uma concentração final de 0,0156 mg/ml. As amostras de fluido de soro ou plasma são adicionadas numa diluição de partida de 1:10 e diluídas em série até uma diluição final de 1:320. A placa é então incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente, lavada, e o ensaio é desenvolvido tal como anteriormente descrito para determinar a

quantidade de produto de imunorreacção formado e, consequentemente, a quantidade de competidor presente na amostra de fluido adicionada.

O ELISA de competição é particularmente preferido para medir as partículas de lipoproteína contendo apo E no fluido corporal, tal como a apo E total, e também pode ser utilizado para monitorizar o destino do polipéptido de apo E administrado terapêuticamente, presente no soro dum doente após a administração de composições de polipéptido de apo E terapêuticas.

a. Ensaio de sanduiche de apo E

É aqui descrito um ensaio de captura ou de sanduiche. Placas de microtitulação de polistireno (Nunc-Immuno Plate I) são revestidas com 150 μ l de tampão de bicarbonato de sódio, pH 9,0, contendo 1 μ g/ml de anticorpo policlonal anti-p(141-155)₃ purificado, durante 16 horas a 4°C para preparar um anticorpo de captura de fase sólida. As placas são lavadas três vezes com PBS contendo 0,1 % de BSA, 0,05 % de Tween e, em seguida, são bloqueadas com 3 % de BSA exactamente como descrito anteriormente. O padrão de apo E/VLDL (preparado como no Exemplo 14) é diluído a 1:200 em PBS contendo 0,5 % (tampão de diluição = LPDP/PBS) até concentrações variando desde 0,125 a 4,0 μ g/ml. Neste ensaio são utilizados os mesmos controlos que os descritos acima para o ELISA de competição. As amostras de plasma ou soro e os controlos são diluídos 1 000 vezes em tampão de diluição. São adicionados aos alvéolos, em triplicado, 50 μ l de padrões e de amostras desconhecidas.

As placas são incubadas exactamente 30 minutos a 25°C, e a fase líquida é removida dos alvéolos. Cinquenta μ l de PBS, contendo uma concentração fixa de anticorpo de revelação monoclonal anti-apo B-100 ligado a HRP0 (MB47), descrito anteriormente, são imediatamente pipetados para os alvéolos contendo 1 alíquota das amostras de plasma. As placas são incubadas exactamente 30 minutos a 25°C, lavadas, e 100 μ l de solução de substrato de OPD são adicionados para uma incubação

adicional de 30 minutos a 25°C. A revelação da cor é interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4N, e as placas são lidas num leitor de microplacas, tal como anteriormente descrito.

17. Efeito de Multímeros da Sequência 141-155 sobre a Proliferação de Linfócitos

Os efeitos dos mono-, di-, tri-, e tetrâmeros do péptido p(141-155) sobre a proliferação de linfócitos foram estudados de acordo com o ensaio descrito no Exemplo 2. Tal como representado na Figura 4, o p(141-155) monomérico não apresentou qualquer efeito sobre a proliferação de linfócitos na gama de concentrações do péptido examinadas.

Por outro lado, os di-, tri-, e tetrâmeros do péptido p(141-155) apresentaram, cada um deles, a capacidade para inibir a proliferação de linfócitos a concentrações do péptido mais elevadas. O cálculo da ED₅₀, ou dose do péptido necessária para inibir a proliferação de linfócitos em 50 %, para o dímero, o trímero e o tetrâmero foi, respectivamente, de 20, 7, e 1,2 µM. Consequentemente, o efeito de inibição dos polipéptidos multiméricos sobre a proliferação de linfócitos aumentou com a multiplicidade (número de repetições) da sequência p(144-155) no polipéptido. As fórmulas dos péptidos de apo E estudadas foram: monómero, p(141-155); dímero, p(141-155)₂; trímero, p(141-155)₃; tetrâmero, p(141-155)₄.

18. Efeito das Substituições de Aminoácidos sobre a Proliferação de Linfócitos

Foi estudado o efeito sobre a proliferação de linfócitos de substituições de aminoácidos simples em ambas as repetições da sequência 141-155 de apo E nos péptidos em tandem.

Os ensaios de proliferação foram executados tal como descrito no Exemplo 2, e os polipéptidos em tandem substituídos eram idênticos àqueles descritos no Exemplo 10, isto é, Lys 143 substituído para Ala, Arg 150 substituído para Ala, e Leu 144 substituído para Pro. Os resultados estão representados na

Figura 5, em conjunto com os resultados para o péptido em tandem não substituído p(141-155)₂.

Cada um dos péptidos activos estudados apresentou pelo menos alguma indicação de actividade bimodal, isto é, aumento da proliferação com concentrações baixas e inibição com concentrações mais elevadas, tal como é encontrado na apo E nativa. A substituição da Leu(144) para Pro reduziu substancialmente a actividade biológica do péptido em tandem, enquanto que as outras duas substituições pareceram ter pouco efeito sobre a actividade biológica.

19. Identificação de Polipéptidos de Apo E Adicionais

As lipoproteínas contendo a apoproteína (apo) E inibem a proliferação de linfócitos estimulada por mitogénio ou antigénio, in vitro e in vivo. Curtiss e colab., J. Immunol., 118:1966-1970 (1977); e Curtiss e colab., J. Immunol., 118:648-652 (1977). Mostrou-se que a apo E é um componente chave, dado que a apo E isenta de lípidos evidenciou possuir uma actividade comparável. Pepe e colab., J. Immunol., 136:3716-3723 (1986). Na presente descrição, foi identificado o local activo da apo E que é responsável pela sua capacidade para inibir a proliferação de linfócitos. Uma repetição dimérica sintética dos resíduos de aminoácido 141-155 da apo E humana foi capaz de suprimir a proliferação de linfócitos estimulada pela PHA numa forma que era análoga à da apo E nativa. A necessidade aparente de duplicação da sequência 141-155 foi posta em evidência pela observação de que a versão monomérica desta sequência não era activa.

Desconhece-se porque apenas é activo um domínio 141-155 duplicado sob a forma de multímeros ou de um auto-conjugado, mas não o são conjugados monoméricos com um transportador. Por conseguinte, para explorar com maior profundidade os requisitos estruturais necessários para a função e a actividade biológica, foram sintetizados e purificados um certo número de péptidos modificados. Os estudos especificamente destinados aos

requisitos estruturais necessários para a actividade biológica do mímico do péptido sintético foram então conduzidos como descrito abaixo. Encontra-se incluída uma verificação dos efeitos da modificação de resíduos de aminoácido específicos e dos efeitos do aumento do número de duplicações. Finalmente, foram examinados os efeitos das deleções de aminoácidos específicos numa tentativa para identificar uma sequência funcional mínima para uma porção de ligação ao receptor de LDL. Foi igualmente determinada a importância de várias características estruturais dos péptidos para a actividade biológica, com análises de minimização da energia e modelação molecular.

Nestes estudos, células mononucleares do sangue periférico (PBM) humanas foram isoladas e analisadas quanto à proliferação estimulada pela fito-hemaglutinina (PHA), tal como descrito por Pepe e colab., J. Immunol., 136:3716-3723 (1986), excepto que as células foram ressuspensas e cultivadas em meio CFBI isento de soro e isento de proteínas, tal como descrito por Shive e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:9-13 (1986). As células PBM (200 000 em 0,2 ml) foram incubadas a 37°C com 0,05 ml de péptido e PHA. Após 48 horas, as culturas foram submetidas a impulsos durante 18 horas com 0,5 mCi de [³H]-metiltimidina, e recolhidas para filtros de fibra de vidro. A radioactividade dos filtros foi contada num contador de cintilação líquida de Beckman. Os resultados foram expressos como a cpm média $\pm$ S.D. ou como a percentagem de inibição que derivou de $100 \times (1 - \text{cpm da cultura em teste} / \text{cpm da cultura de controlo})$. Todos os dados apresentados são representativos duma única experiência executada em quadruplicado, e todas as experiências foram repetidas pelo menos 3 vezes para verificar que os resultados apresentados eram reproduzíveis. A actividade biológica média de cada polipéptido para a inibição da proliferação de linfócitos (PMN) encontra-se representada na Tabela 6, e encontra-se expressa como uma actividade específica média, a qual é a concentração do péptido que ocasiona uma redução de 50 % na actividade.



A viabilidade das células PBM após a exposição aos péptidos foi determinada por medição da libertação de lactato-desidrogenase (LDH), utilizando um conjunto de ensaio de diagnóstico da LDH de Sigma, tal como descrito no Exemplo 3. Depois da cultura, os sobrenadantes das células foram diluídos 10 vezes em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, e NADH 6 mM. A absorvância foi medida depois da adição de piruvato de sódio 6 mM, e medida cineticamente a 340 nm. A concentração relativa de LDH nos sobrenadantes das culturas foi comparada com a libertação de LDH total obtida por lise de congelação e descongelação das células em água. Nenhum dos péptidos representado na Tabela 6 exibiu citólise significativa.

Estudos do efeito da carga sobre a capacidade da apo E nativa para se ligar ao receptor de LDL mostraram a importância dos aminoácidos básicos carregados positivamente. Mahley e colab., J. Biol. Chem., 252:7287-7297 (1977); e Wilson e colab., Science, 252:1817-1822 (1991). Existem 12 resíduos de lisina e de arginina no péptido dimérico (Tabela 6). Para testar a importância destes aminoácidos básicos para a actividade biológica, os resíduos de lisina do péptido dimérico foram modificados por acetilação, e os resíduos de arginina por modificação de ciclo-hexanodiona. Tal como esperado, cada uma destas modificações aboliu a actividade biológica do péptido em tandem, indicando a importância dos resíduos de aminoácidos básicos carregados positivamente.

(segue Tabela 6)

TABELA 6

Péptido	Péptido #	Sequência	Amino- ácidos #	Pureza	Atividade Específica Média (μ M)	n ¹	Energia Total
Monômero	(15)	IRKIRKRLIRDADDL	15		Nenhuma	0	-344,08 $\pm$ 0,01
Dímero	53	(IRKIRKRLIRDADDL) ₂	30	93	4,8 $\pm$ 1,1	8	-689,57 $\pm$ 0,04
143 Lys $\rightarrow$ Ala	36	(IRALRKRLIRDADDL) ₂	30	99	5,6 $\pm$ 1,7	3	-708,357 $\pm$ 0,02
150 Arg $\rightarrow$ Ala	38	(IRKIRKRLILDADDL) ₂	30	98	7,5 $\pm$ 3,0	3	-503,34 $\pm$ 0,05
144 Leu $\rightarrow$ Pro	37	(IRKPRKRLIRDADDL) ₂	30	98	Nenhuma	3	-624,390 $\pm$ 0,01
129-162	0	STEELRVRLASHRKIRK RLIRDADDLQKRLAVYQ	35	98	Nenhuma	3	-457,99 $\pm$ 0,05
Tetrâmero	35	Y(IRKIRKRLIRDADDL) ₄	60	99	2,8 $\pm$ 1,3	4	-1418,30 $\pm$ 0,01
(141-150) ₂	46	(IRKIRKRLIR) ₂	20	99	4,9 $\pm$ 1,2	3	-587,32 $\pm$ 0,03
(145-155) ₂	43	(RKRLIRDADDL) ₂	22	92	Nenhuma	3	-581,14 $\pm$ 0,05
(144-150) ₂	30	(IRKRLIR) ₂	14	94	Nenhuma	3	-455,71 $\pm$ 0,10
(LIRK) ₄	47	(LIRK) ₄	16	99	1,6 $\pm$ 0,5	6	-232,66 $\pm$ 0,09
(LIRK) ₈	45	(LIRK) ₈	32	95	1,1 $\pm$ 0,4	5	-483,55 $\pm$ 0,09

1 número de vezes analisado

O efeito das substituições de aminoácidos simples específicas dos resíduos de lisina e arginina também foi examinado por preparação de repetições diméricas sintéticas do péptido 141-155, com substituições da lisina 143 por alanina e da arginina 150 por alanina (Tabela 6). Todas as substituições de aminoácidos simples foram efectuadas em ambas as posições na sequência 141-155 duplicada. O efeito destas substituições sobre a actividade biológica foi testado no ensaio anterior para inibição da proliferação de linfócitos. Os resultados consistiram numa concentração do péptido de 0,2 a 30 micromolar (μM), p(141-155)₂, o péptido com a substituição 143 Lys-Ala e o péptido com a substituição 150 Arg→Ala inibiram a absorção de timidina tritiada acima de cerca de 4 μM . Foram observadas ligeiras diferenças na actividade biológica específica. No entanto, nenhuma destas substituições de aminoácidos simples apresentou um efeito significativo sobre a actividade do dímero.

Em contraste com os efeitos mínimos observados com as substituições simples de lisina e arginina, outra substituição de aminoácido simples apresentou um efeito significativo sobre a sua actividade biológica. A substituição da Leucina 144 por prolina eliminou essencialmente a actividade biológica. Esperar-se-ia que esta substituição apresentasse um efeito profundo sobre as propriedades de formação da hélice alfa deste péptido, sugerindo que a estrutura em hélice deste péptido seria importante para a actividade.

A importância da manutenção da estrutura helicoidal alfa para a actividade biológica também foi examinada pela preparação doutro péptido. Determinou-se por cristalografia de raios X que este péptido, o qual representa uma cópia simples dos resíduos de aminoácido 129-162 da apo E humana (Tabela 6), representa a quarta hélice alfa completa de um rolo de quatro hélices dentro da apo E intacta. Wilson e colab., Science, 252:1817-1822 (1991). A modelização por computador deste péptido monomérico extensivo sugere que a natureza da hélice alfa desta região da proteína é bastante estável. Contudo, quando medido por inibição da proliferação de linfócitos como anteriormente, o p(129-162)

não exibiu actividade biológica. Os resultados sugerem que a estrutura em hélice alfa desta região é essencial, mas não suficiente, para a actividade biológica.

Muitas das funções biológicas da apo E nativa são melhor conseguidas por partículas lipoproteicas que contêm múltiplas cópias desta apoproteína. Mahley e colab., Biochem. Biophys. Acta, 737:197-222 (1983); e Kowal e colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5810-5814 (1989). Também se mostrou que isto é verdadeiro para a actividade imunossupressora da apo E HDL_C. Hui e colab., J. Biol. Chem., 255:11775-11781 (1980). Nenhum dos péptidos monoméricos apresenta actividade biológica, enquanto que o dímero é inibidor numa gama de concentrações entre 2 e 5 μ M. Se a natureza multimérica do péptido é uma condição para a sua actividade, existe a possibilidade de se poder aumentar ainda mais a actividade preparando multímeros maiores da sequência 141-155. Para testar o conceito de que os péptidos com mais de 2 cópias desta sequência apresentariam maior actividade biológica, foi sintetizado e purificado um tetrâmero (Tabela 6). Tal como apresentado na Tabela 6, a representação tetramérica da sequência 141-155 apresentou uma actividade inibidora dupla da do dímero, numa base molar. Por conseguinte, o aumento do número de repetições da sequência 141-155 num péptido incrementou a sua actividade inibidora uma curva de dose-resposta para a inibição da proliferação de linfócitos pelos dímero, trímero e tetrâmero, encontra-se representada na Figura 4.

Mais reiteraões da sequência 141-155 exibiram maior actividade biológica. No entanto, os 60 resíduos aproximam-se rapidamente do tamanho limite para a síntese de péptidos com elevada pureza e integridade necessárias para uma avaliação quantitativa exacta da função. Consequentemente, para identificar uma sequência dimérica mínima para a actividade biológica, foram sintetizados três péptidos adicionais, e as suas actividades biológicas foram comparadas com a do dímero de progenitor. O primeiro péptido era uma repetição dimérica dos resíduos de aminoácido 141-150. Este péptido não continha os últimos cinco resíduos do terminal carboxilo da repetição

dimérica 141-155, DADDL (Tabela 6). Curiosamente, o péptido $p(141-150)_2$ apresentou uma actividade que era comparável à do dímero 141-155, inibindo a proliferação de linfócitos a concentrações superiores a cerca de $3 \mu M$. Na realidade, a sua actividade específica média de $4,9 \pm 1,2 \mu M$ foi muito semelhante àquela calculada para o dímero 141-155, de $4,8 \pm 1,1 \mu M$ (Tabela 6). Isto indica que a sequência rica em ácido aspártico da região do terminal carboxilo do dímero não é importante para a actividade.

Evidência adicional para a importância dos dez primeiros resíduos na sequência 141-55 proveio do ensaio numa repetição dimérica dos resíduos de aminoácido 145-155. Este péptido não continha a sequência do terminal amino LRKL, enquanto mantinha a sequência do terminal carboxilo rica em ácido aspártico, DADDL. A remoção dos resíduos LRKL na forma do péptido $p(141-155)_2$ resultou na perda da actividade biológica e confirmou a pouca importância relativa dos resíduos DADDL para a actividade biológica. A confirmação da necessidade absoluta dos resíduos do terminal amino LRK foi obtida pela preparação de um péptido que representa uma repetição dos resíduos de aminoácido 144-150 (Tabela 6). O péptido $p(144-150)_2$ não continha os resíduos do terminal amino LRK, bem como os resíduos do terminal carboxilo DADDL. Como para o péptido anterior, esta repetição dimérica não apresentou qualquer actividade biológica em concentrações $>210 \mu M$. Consequentemente, os resíduos que são chave para a actividade biológica incluem a sequência rica em leucina, arginina e lisina, LRKLRKRLLR.

A inibição da proliferação de linfócitos medida como anteriormente descrito utilizando os polipéptidos da Tabela 6, nomeadamente $p(141-155)_2$, $p(144-150)_2$, $p(145-155)_2$ e $p(141-150)_2$, origina uma resposta à dose de inibição para estes polipéptidos, e encontra-se representada na Figura 6.

Para explorar mais profundamente a importância deste motivo rico em leucina, arginina e lisina, dois péptidos adicionais foram sintetizados e testados quanto à actividade biológica.

Foram preparados péptidos contendo quatro a oito repetições da sequência LLRK (Tabela 6), e ambos os péptidos inibiram a absorção da timidina estimulada pela PHA. A actividade específica média da repetição (LLRK)₄ determinada a partir de 6 experiências distintas foi de $1,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$, enquanto que a repetição (LLRK)₈ apresentou uma actividade específica média de $1,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$. A inibição da proliferação de linfócitos medida como anteriormente descrito utilizando os polipéptidos p(141-155)₂, p(LLRK)₄, p(LLRK)₈ e p(141-150)₂, origina uma resposta à dose de inibição para estes polipéptidos, e encontra-se representada na Figura 7. Assim, a actividade biológica da sequência LLRK reiterada adiciona mais um suporte à importância da região definida pelos resíduos de aminoácido 141-145 da apo E nativa para a actividade biológica. Além disso, estas observações suportam o requisito aparente de reiteração deste motivo.

Para verificar que a actividade observada com cada um dos péptidos inibidores sintéticos não era o resultado de citotoxicidade celular directa, foram executados os ensaios de LDH, tal como descritos no Exemplo 3, em todos os sobrenadantes de cultura das culturas de linfócitos. Nenhum dos péptidos exibiu libertação significativa (menos do que 5 %) de libertação da actividade de LDH, indicando que os péptidos não eram citotóxicos.

Embora o presente invento tenha sido descrito em termos de certas concretizações preferidas, podem ser efectuadas várias modificações, alterações, omissões e substituições sem afastamento do espírito do presente invento.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um polipéptido compreendendo uma pluralidade de segmentos, tendo o referido polipéptido a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos e/ou a secreção de androgénios ováricos e possuindo cada segmento uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Leu-Arg-Xaa-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Xbb,

onde Xaa é Lys ou Ala, e Xbb é Arg ou Ala, caracterizado por se proceder a uma síntese por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes ou por adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia polipeptídica em crescimento.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido segmento ter uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula Leu-Arg-Xaa-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Xbb-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por pelo menos um dos referidos segmentos ter uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo a uma fórmula seleccionada de entre o grupo que consiste em:

- (1) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg,
- (2) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg,
- (3) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala,
- (4) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala,
- (5) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu,
- (6) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu,
- (7) Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu, e
- (8) Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

por o referido polipéptido ter uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo a uma fórmula seleccionada de entre o grupo que consiste em:

- (1) $\text{NH}_2\text{-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-COOH,}$
- (2) $\text{NH}_2\text{-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-COOH,}$
- (3) $\text{NH}_2\text{-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Ala-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-COOH,}$
- (4) $\text{NH}_2\text{-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-COOH,}$
- (5) $\text{NH}_2\text{-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-COOH, e}$
- (6) $\text{NH}_2\text{-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu-COOH.}$

5 - Processo de preparação de um polipéptido possuindo a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos e/ou a secreção de androgénios ováricos, sendo o referido polipéptido definido pela fórmula:

$\text{B-(X}_n\text{-Leu-Arg-Xaa-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Xbb-Z}_m\text{)}_a\text{-J,}$
 onde B é um grupo amino-terminal NH_2 ou um segmento de comando com 1 a 20 resíduos de aminoácido, J é um grupo carboxi-terminal COOH ou um segmento de cauda com 1 a 20 resíduos de aminoácido, X é um primeiro segmento espaçador com 1 a 20 resíduos de aminoácido, n é 1 ou 0, de tal modo que, quando n é 1, X está presente e, quando n é 0, X não está presente, Z é um segundo

segmento espaçador, m é 1 ou 0, de tal modo que, quando m é 1, Z está presente e, quando m é 0, Z não está presente, Xaa é Lys ou Ala, Xbb é Arg ou Ala e a é um número inteiro de 2 a 10, de tal modo que a sequência entre parênteses se repete o número de vezes indicado pelo valor de a, caracterizado por se proceder a uma síntese por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes ou por adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia polipeptídica em crescimento.

6 - Processo de preparação de um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido definida pela fórmula:

$$(Z_n B_m)_a$$

onde Z é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, B é um resíduo de aminoácido básico, n é de 2 a 100, m é de 2 a 4 e a é de 2 a 100 e possuindo a capacidade de inibir a proliferação de linfócitos e/ou a secreção de androgénios ováricos, caracterizado por se proceder a uma síntese por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes ou por adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia polipeptídica em crescimento.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por Z ser isoleucina, leucina ou valina e B ser arginina, lisina ou histidina, n ser 2 a 3, m ser 2 e a ser 2 a 50.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido polipéptido ter uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo a uma fórmula seleccionada de entre o grupo que consiste em:

- (1) Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys, e
- (2) Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Arg-Lys.

9 - Processo de preparação de uma composição para regulação da proliferação de linfócitos e/ou da síntese de androgénios ováricos num animal, caracterizado por compreender a associação de um excipiente farmacêuticamente aceitável com um polipéptido de acordo com as reivindicações 1, 5 ou 6.

10 - Processo de preparação de uma composição para modulação da absorção hepática de lipoproteína de baixa densidade, caracterizado por compreender a associação de um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável com uma porção de ligação do receptor de LDL operativamente ligada a uma porção de ligação a LDL, compreendendo a referida porção de ligação do receptor de LDL um polipéptido de acordo com as reivindicações 1, 5 ou 6.

11 - Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a referida porção de ligação a LDL ser um polipéptido capaz de formar uma hélice anfipática possuindo resíduos de aminoácido carregados positivamente na interface hidrofóbica-hidrofílica da hélice e resíduos carregados negativamente opostos à face hidrofóbica da hélice.

12 - Processo de preparação de uma composição compreendendo moléculas de anticorpo caracterizado por os referidos anticorpos, os quais imunorreagem com:

(a) um polipéptido de acordo com as reivindicações 1, 5 ou 6, e

(b) apo E/VLDL,

mas que não imunorreagem com um polipéptido correspondendo a uma das fórmulas:

Leu-Ser-Lys-Glu-Leu-Gln-Ala-Ala-Gln-Ala-Arg-Leu-Gly-Ala-Asp-Met-Glu-Asp-Val-Arg e Arg-Gly-Leu-Ser-Ala-Ile-Arg-Glu-Arg-Leu serem associados com meios adequados.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por as referidas moléculas de anticorpo não imunorreagirem com um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à fórmula:

Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg ou Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg-Asp-Ala-Asp-Asp-Leu.

14 - Processo para determinação da quantidade de um antigénio Apo E numa amostra de fluido vascular, caracterizado por compreender os passos de:

(a) misturar uma amostra de fluido vascular com um anticorpo anti-apo E, para formar uma mistura de imunorreacção, contendo o referido anticorpo moléculas de anticorpo as quais imunorreagem com:

(i) um polipéptido de acordo com as reivindicações 1, 5 ou 6, e

(ii) apo E/VLDL, mas que não imunorreagem com um polipéptido correspondendo a Leu-Ser-Lys-Glu-Leu-Gln-Ala-Ala-Gln-Ala-Arg-Leu-Gly-Ala-Asp-Met-Glu-Asp-Val-Arg e Arg-Gly-Leu-Ser-Ala-Ile-Arg-Glu-Arg-Leu;

(b) manter a referida misturas de imunorreacção sob condições de ensaio biológico, durante um período de tempo suficiente para que se forme um produto de imunorreacção contendo apo E; e

(c) detectar a quantidade do referido produto de imunorreacção, formado no passo (b) e, deste modo, a quantidade de antigénio apo E presente na referida amostra de fluido vascular.

15 - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por o referido anticorpo estar operativamente ligado a um suporte sólido de modo que a referida mistura de imunorreacção tenha uma fase líquida e uma fase sólida e que o produto de imunorreacção formado no passo (b) esteja presente na fase sólida.

16 - Processo de produção de um conjunto de diagnóstico caracterizado por se embalar, separadamente:

(A) uma quantidade suficiente para pelo menos um ensaio de um anticorpo contendo moléculas de anticorpo anti-apo E, as quais imunorreagem com:

(a) um polipéptido de acordo com as reivindicações 1, 5 ou

6, e

(b) apo E/VLDL,

mas que não imunorreagem com um polipéptido correspondendo:
Leu-Ser-Lys-Glu-Leu-Gln-Ala-Ala-Gln-Ala-Arg-Leu-Gly-Ala-Asp-Met-
-Glu-Asp-Val-Arg e Arg-Gly-Leu-Ser-Ala-Ile-Arg-Glu-Arg-Leu;

(B) opcionalmente, um segundo anticorpo, um anticorpo de revelação, contendo moléculas de anticorpo que imunorreagem com partículas de lipoproteína contendo apo E

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

(D) opcionalmente, um agente de ligação específica.

17 - Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o referido anticorpo anti-apo E estar operativamente ligado a uma matriz sólida.

18 - Processo de produção de um conjunto de diagnóstico, caracterizado por se embalar, em separado, uma quantidade de um polipéptido, preparado de acordo com a reivindicação 1, 5 ou 6, suficiente para pelo menos um ensaio, fixado sobre uma matriz sólida, e opcionalmente um anticorpo anti-polipéptido apo E.

Lisboa, 10. DEZ. 1991

Por THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

=O AGENTE OFICIAL=



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

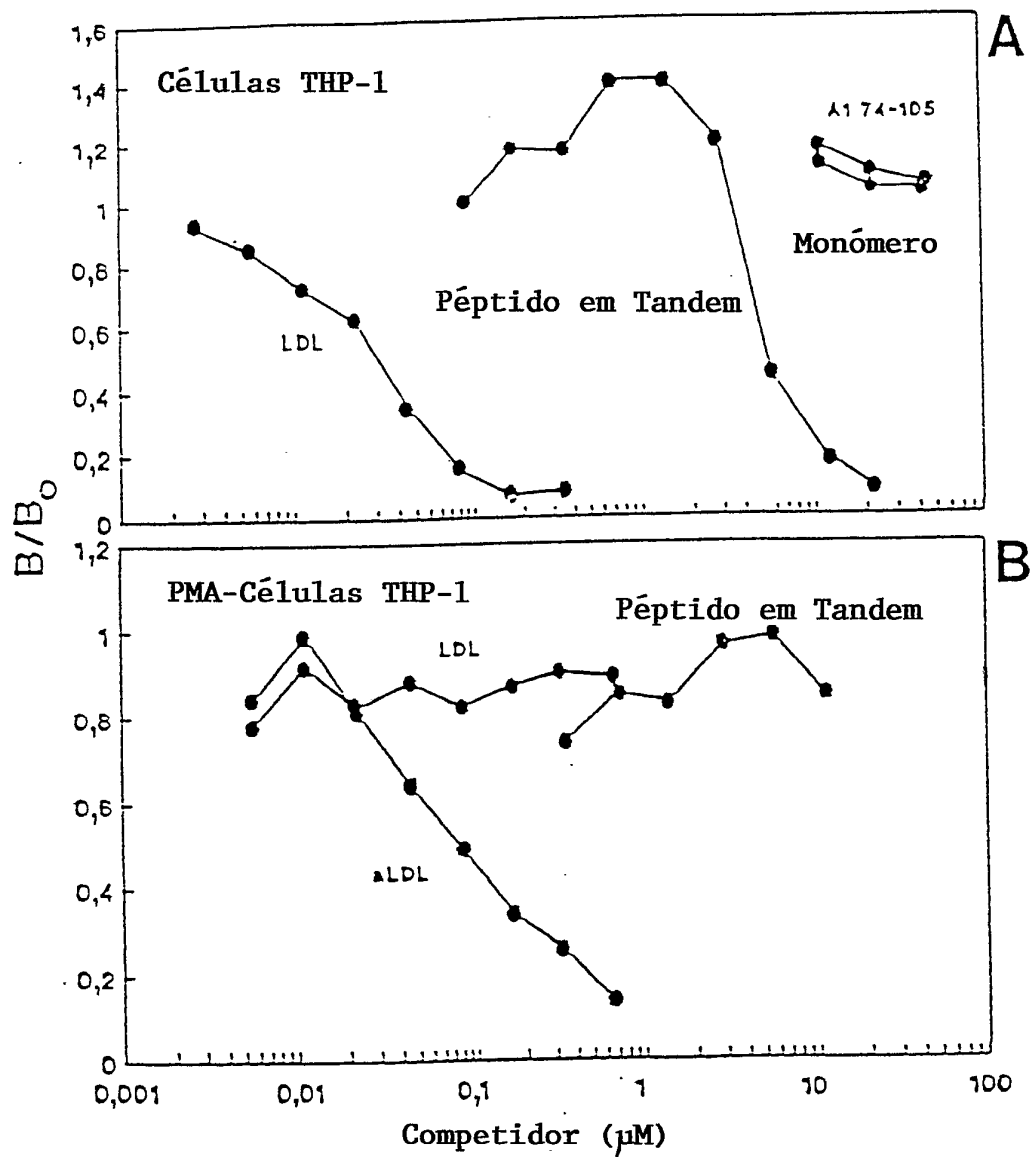


FIGURA 1

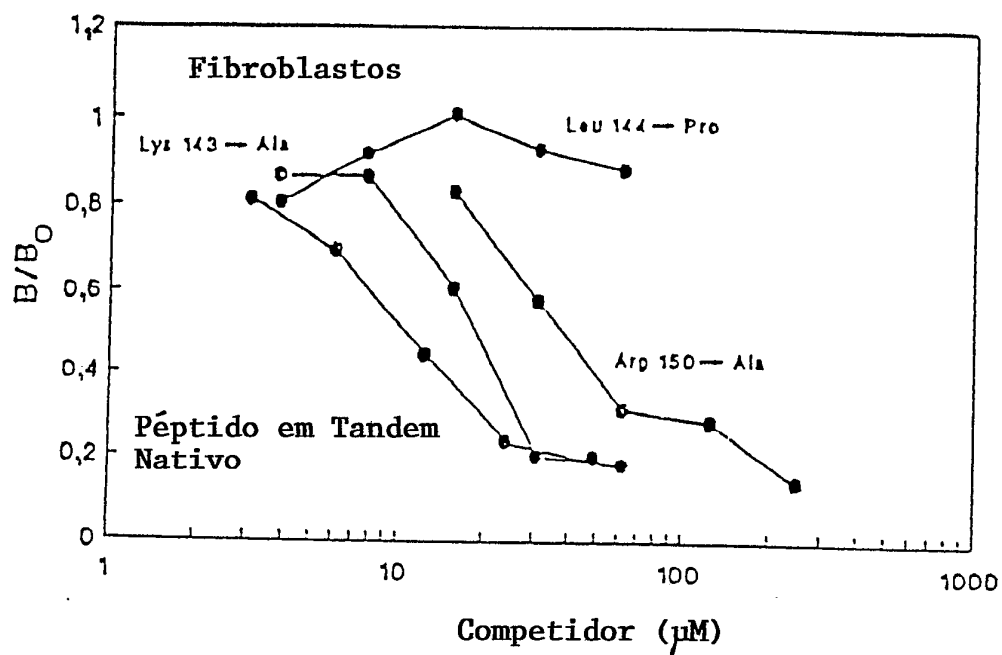


FIGURA 2

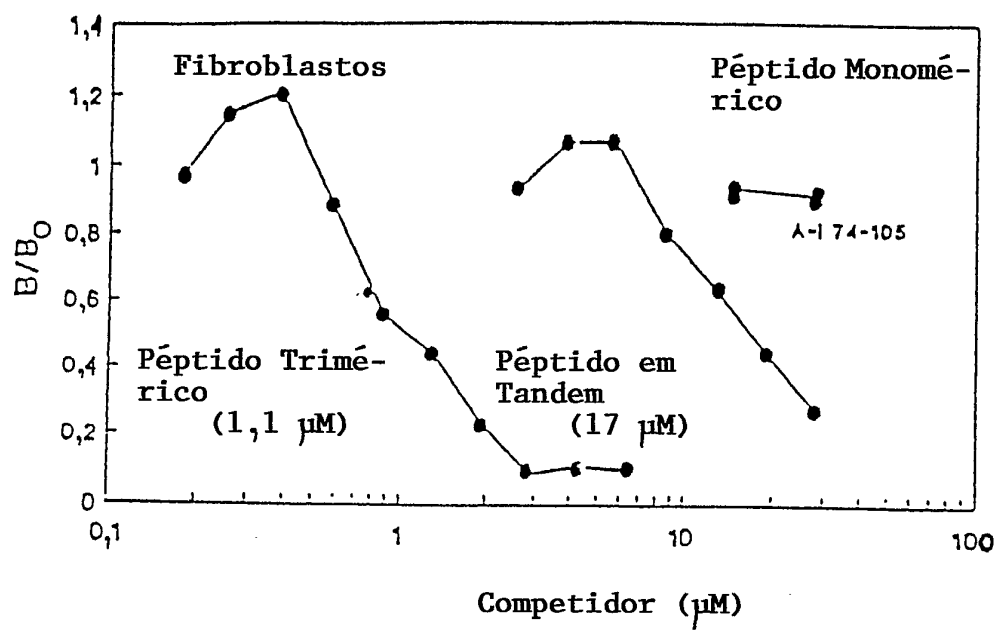


FIGURA 3

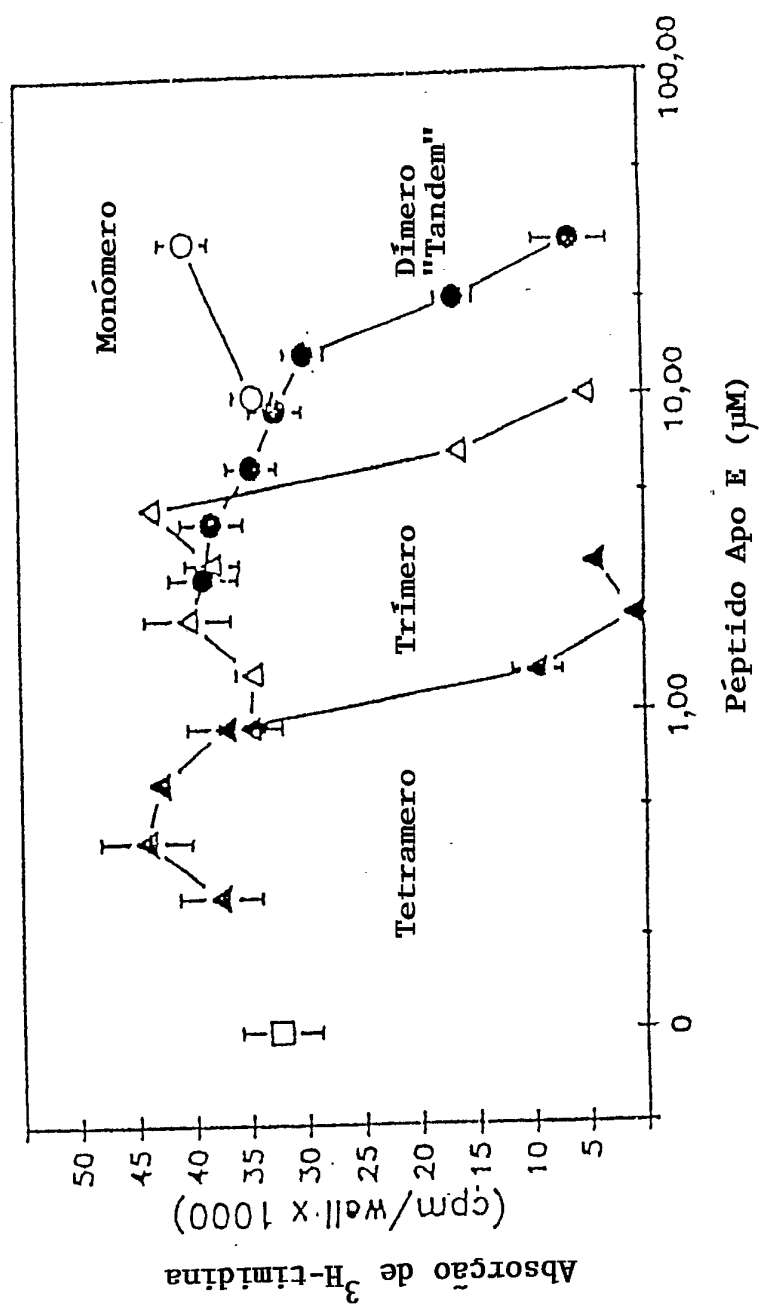


FIGURA 4

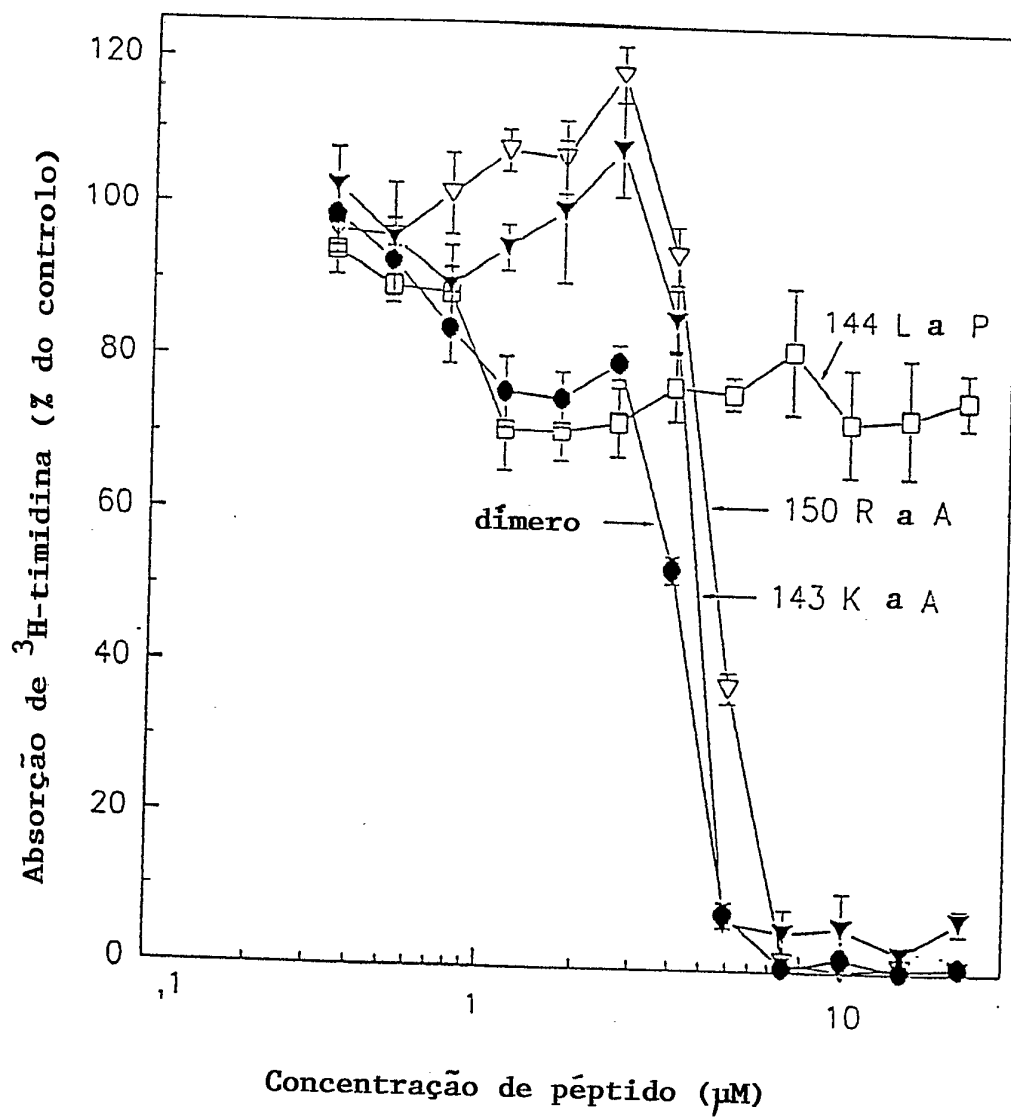


FIGURA 5

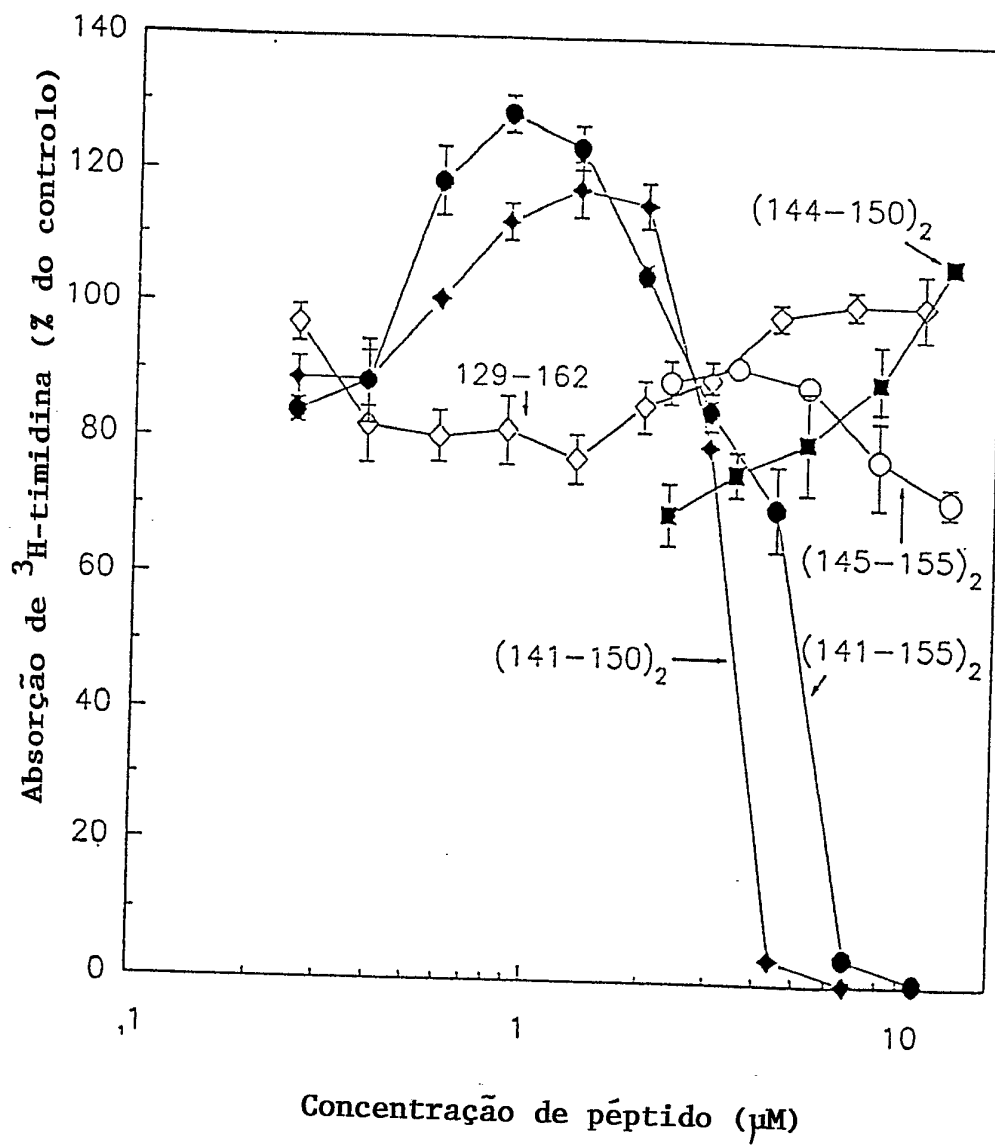


FIGURA 6

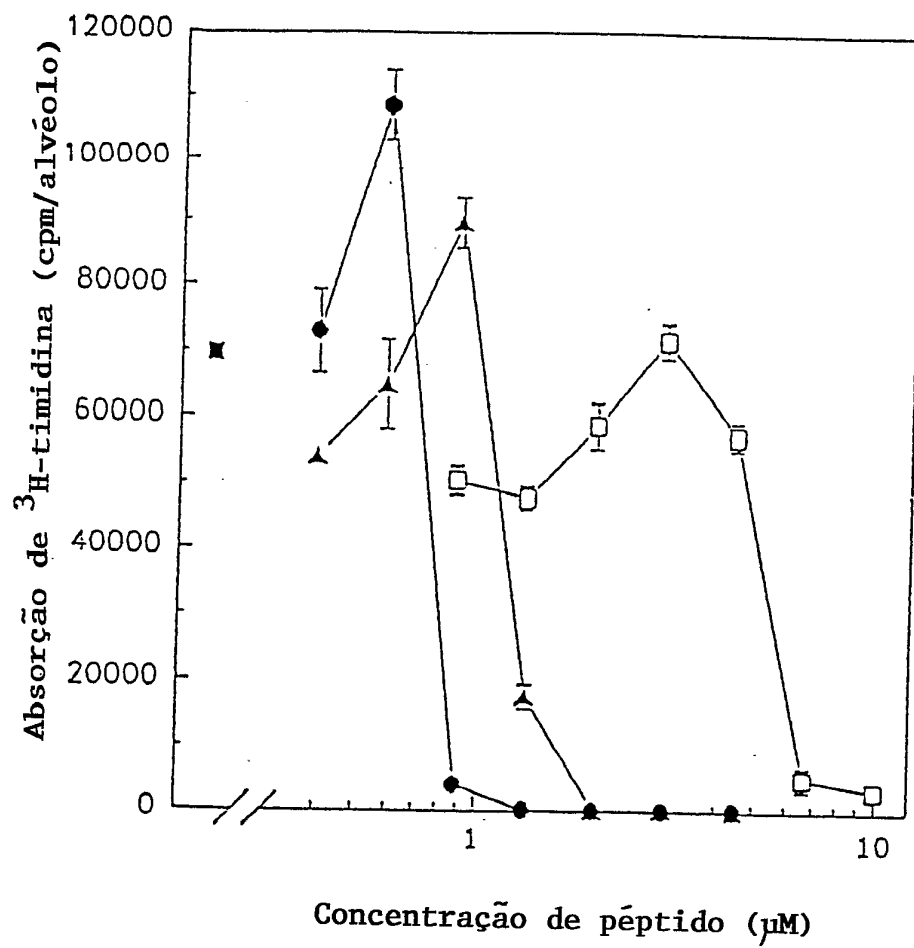


FIGURA 7