



(11) *Número de Publicação:* PT 690720 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K038/16 A

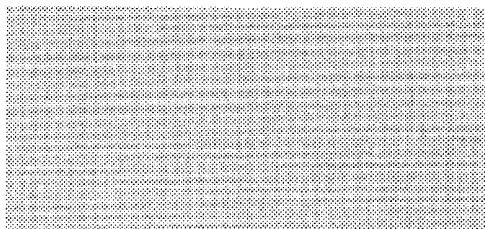
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) Data de depósito: 1994.03.11	(73) Titular(es): XOMA TECHNOLOGY LTD. C O XOMA (US) LLC, 2910 SEVENTH STREET BERKELEY, CA 94710 US
(30) Prioridade: 1993.03.12 US 30644 1993.07.15 US 93202	
(43) Data de publicação do pedido: 1996.01.10	(72) Inventor(es): ROGER G. II LITTLE US HELENE GAZZANO-SANTORO US JAMES BRIAN PARENT US
(45) Data e BPI da concessão: 2001.06.27	(74) Mandatário(s): JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* UTILIZAÇÕES TERAPÉUTICAS DE PRODUTOS DE PROTEÍNA BACTERICIDA INDUTORA DE PERMEABILIDADE

(57) *Resumo:*

UTILIZAÇÕES TERAPÉUTICAS DE PRODUTOS DE PROTEÍNA BACTERICIDA
INDUTORA DE PERMEABILIDADE



Campo das Cebolas - 1100 LISBOA **REF.: E10079PT/KK /GN - FB5601**
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º Objectos <input type="checkbox"/> N.º Desenhos <input type="checkbox"/>					
N.º 690.720 (11)		DATA DO PEDIDO ____ / ____ / ____ (22)			
REQUERENTE (71) XOMA Technology Ltd., norte-americana, industrial, com sede em (NOME E MORADA) c/o XOMA (US) LLC, 2910 Seventh Street Berkeley, CA 94710, Estados Unidos da América CÓDIGO POSTAL <input type="text"/>					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) LITTLE, ROGER, G., II; GAZZANO-SANTORO, HELENE e PARENT, JAMES, BRIAN					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)					FIGURA (para interpretação do resumo)
DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
<input type="text"/>					
EPIGRAFE (54) "UTILIZAÇÕES TERAPÊUTICAS DE PRODUTOS DE PROTEÍNA BACTERICIDA INDUTORA DE PERMEABILIDADE"					
RESUMO (max. 150 palavras) (57) A presente invenção proporciona métodos terapêuticos para o tratamento de estados patológicos, incluindo a neutralização da actividade anticoagulante da heparina, a inibição da angiogénese, a proliferação de células endoteliais e tumorais e o tratamento de doenças inflamatórias crónicas, mediante a administração de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade (BIP).					

Descrição

258

“Utilizações terapêuticas de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade”**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A presente invenção diz respeito às aplicações terapêuticas de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade (BIP) para o tratamento de doenças não directamente associadas com infecções bacterianas gram-negativas, incluindo a neutralização das propriedades anticoagulantes da heparina, a inibição da angiogénese e da proliferação de células tumorais e endoteliais e o tratamento de estados patológicos inflamatórios crónicos, tais como a artrite.

Ligação da heparina

A heparina é um conjunto heterogéneo de mucopolissacáridos de cadeia linear, designados por glicosaminoglicanos, que possuem propriedades anticoagulantes. Embora possa haver outros presentes, os principais açúcares que ocorrem na heparina são: (1) 2-sulfato do ácido α -L-idurónico, (2) 6-sulfato de 2-desoxi-2-sulfamino- α -D-glicose, (3) ácido β -D-glucorónico, (4) 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicose e (5) ácido α -L-idurónico. Estes açúcares encontram-se presentes em quantidades por ordem decrescente, normalmente segundo a ordem (2) > (1) > (4) > (3) > (5), e estão unidos por pontes glicosídicas, formando polímeros de diversos tamanhos. A heparina é fortemente acidica devido ao seu conteúdo em grupos ácido carboxílico e sulfato ligados de forma covalente. A heparina encontra-se dentro dos grânulos dos mastócitos e é libertada por desgranulação. Há uma forma de heparina associada a essas células que é designada por sulfato de heparano. A expressão ‘sulfato de heparano’ utiliza-se em sentido lato para

descrever diversos proteoglicanos sulfatados (PGSH, em inglês HSPG) que se encontram com uma distribuição quase universal nas membranas da superfície das células dos mamíferos e na matriz extracelular. Os PGSH contêm uma percentagem variável de sequências heparinóides pentaméricas que actuam de uma forma semelhante à da heparina solúvel. Os PGSH servem de repositório da antitrombina III (ATIII) e dos factores de crescimento de ligação da heparina, tais como os factores 1-5 de crescimento dos fibroblastos (FCF), IL-8, FEG-MG (em inglês GM-CSF) e IL-3. Folkman *et al.*, *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2ª ed. Capítulo 40, págs. 821-839 (1992). Com efeito, as células geneticamente deficientes em PGSH necessitam de heparina exógena para o seu desenvolvimento.

A heparina é vulgarmente administrada em doses até 400 unidades/kg durante procedimentos cirúrgicos, tais como as derivações cardiopulmonares, a cateterização cardíaca e em procedimentos de hemodiálise, com a finalidade de se evitar a coagulação do sangue durante tais procedimentos. O efeito anticoagulante da heparina no sangue é um resultado da interacção da heparina com a ATIII. O complexo heparina/ATIII é um inibidor poderoso de muitos dos factores de coagulação que intervêm na cascata de coagulação. Foi já demonstrada uma inibição específica para os factores IXa, Xa, XIa, XIIIa activados e para a trombina. O complexo heparina/ATIII possui a afinidade mais elevada para o factor Xa e para a trombina que são comuns nos circuitos de coagulação quer intrínsecos quer extrínsecos envolvidos nos dois últimos passos da cascata de coagulação donde resulta a conversão do fibrinogénio em fibrina.

Quando a heparina é administrada pelos seus efeitos anticoagulantes durante intervenções cirúrgicas, constitui um aspecto importante da terapia pós-cirúrgica que os efeitos da heparina sejam imediatamente neutralizados para que possa ser restabelecida a função normal de coagulação. Presentemente utiliza-se protamina para neutralizar a heparina. As protaminas são

proteínas simples de baixo peso molecular que são vulgarmente isoladas a partir do espermatozóide de salmão. São ricas em resíduos aminoácidos arginina e são fortemente alcalinas. Administradas por si sós, as protaminas (normalmente sob a forma de sulfato de protamina) têm efeitos anticoagulantes. Quando administradas na presença de heparina, forma-se um complexo estável e desaparece a actividade anticoagulante dos dois fármacos. A utilidade clínica das protaminas está limitada pelos seus efeitos hipotensivos e de tipo anafilático significativos.

Há outros compostos já estudados que possuem uma actividade neutralizadora da heparina, entre os quais se refere o factor 4 plaquetário (F4P, em inglês PF4) e a proteína básica principal, ver a patente de invenção norte-americana nº 5 086 164. A proteína básica principal possui uma actividade neutralizadora da heparina, mas também é fortemente tóxica.

Angiogénese

A angiogénese está estreitamente relacionada com a proliferação das células endoteliais e constitui o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos capilares. Assim sendo, constitui um processo importante no desenvolvimento e no crescimento dos mamíferos e também nos processos de menstruação. A libertação de factores de crescimento angiogénicos, tais como os factores 1-5 de crescimento dos fibroblastos, induz a proliferação de células endoteliais através de um mecanismo de ligação ao receptor dependente da heparina. Ver Yayon *et al.*, *Cell*, 64:841-848 (1991). Estes factores de crescimento de ligação da heparina podem ser libertados devido a traumas vasculares (cicatrização de ferimentos), estímulos imunitários (doenças autoimunitárias), mediadores inflamatórios (prostaglandinas) e a partir de células tumorais.

A angiogénese também está associada a diversos estados patológicos em que se considera desejável inibir o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Como exemplo, a angiogénese é

crítica para o crescimento, proliferação e metastase de diversos tumores. Há outros estados patológicos associados à angiogénese, entre os quais se refere a retinopatia diabética, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, psoríase, angiofibromas, inflamações imunitárias e não imunitárias, incluindo a artrite reumatóide, proliferação capilar com placas ateroscleróticas, hemangiomas, endometriose e sarcoma de Kaposi.

Folkman *et al.*, *supra*, afirmam que as lesões psoriáticas na pele são dominadas pela proliferação epitelial, pela neovascularização e por um infiltrado de células inflamatórias. No entanto, não está esclarecido se a angiogénese é um passo na patogénese da psoríase ou se é um fenómeno secundário.

Há várias substâncias sobre as quais se sabe que funcionam como inibidores da angiogénese e sobre as quais se sabe que inibem a angiogénese tumoral, prevenindo o início da artrite e inibindo a artrite já existente em modelos de artrite induzida pelo colagénio, Peacock *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175, 1135-1138 (1992). Como exemplo, sabe-se que a protamina inibe a angiogénese de tumores e o subsequente crescimento dos tumores. De acordo com Taylor *et al.*, *Nature*, 297:307-312 (1982), a actividade antiangiogénica da protamina é atribuída à sua capacidade para se ligar à heparina. Também se sabe que o F4P possui actividade antiangiogénica. Para o presente pedido tem interesse a patente de invenção norte-americana nº 5 112 946 que descreve o F4P modificado e os seus análogos que têm actividade antiangiogénica mas que não têm capacidade para se ligarem à heparina. Demonstrou-se que o F4P possui pelo menos duas propriedades funcionais. A ligação à heparina foi estudada mais exhaustivamente; no entanto, o F4P foi descrito originalmente como possuidor de propriedades inibitórias da collagenase. Os inibidores da collagenase foram os primeiros inibidores da angiogénese a ser descobertos. Ver Folkman, 1973, *supra*. As mutações na região do F4P de ligação à heparina

não foram analisadas nos seus efeitos sobre a actividade inibitória da colagenase. É interessante saber que a trombospondina também é um inibidor da angiogénese e que se liga à heparina com um motivo serina/triptofano em vez de um motivo aminoácido básico. Posto isto, não há nenhuma ligação evidente da heparina à sequência de consenso singular ou para a inibição da angiogénese.

O pedido de patente de invenção PCT publicado com o nº WO 92/01003 descreve a utilização de derivados de glicosaminoglicano (heparina) e a sua utilização como inibidores da invasividade tumoral. Aí são descritos derivados de heparina sobre os quais se afirma que são praticamente isentos de actividade anticoagulante e que impedem a formação de metástases tumorais num hospedeiro.

Inflamação crónica

A inflamação crónica está acompanhada normalmente por angiogénese. A artrite é uma síndrome crónica caracterizada pela inflamação das articulações periféricas em associação com o espessamento sinovial e o influxo de factores imunitários e células tais como os leucócitos polimorfonucleares (PMN). Na artrite reumatóide a inflamação é de natureza imunitária, ao passo que na artrite reactiva a inflamação está associada à infecção do tecido sinovial com bactérias pirogénicas ou com outros agentes infecciosos. Folkman *et al.*, 1973, *supra*, também observaram que há muitos tipos de artrite que evoluem de uma fase dominada por um infiltrado inflamatório na articulação até uma fase posterior em que um *pannus* neovascular invade a articulação e começa a destruir a cartilagem. Embora não haja certezas quanto ao facto de a angiogénese na artrite ser um componente causador da doença, e não um epifenómeno, há provas de que a angiogénese é necessária para a manutenção da sinovite na artrite reumatóide.

Embora os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (FAINE, em inglês NSAID), os corticóides e outras terapias tenham proporcionado bons resultados no tratamento da artrite, continua a ser necessário nesta especialidade que haja terapias mais eficazes para a artrite e para outras doenças inflamatórias.

Sabe-se agora que a inflamação e a angiogénese são separáveis mas que não são processos mutuamente exclusivos. Foram já descobertas proteínas angiogénicas específicas que estimulam a angiogénese sem inflamação, ao passo que os esteróides angiostáticos podem inibir a angiogénese sem diminuição da inflamação aguda. Ver Folkman, 1973, *supra*. É interessante saber que a endotoxina foi identificada como sendo o mais poderoso estimulador exógeno da angiogénese, devido ao facto de estimular as citocinas dos macrófagos e os factores de crescimento.

Proteína bactericida indutora da permeabilidade

A proteína bactericida indutora da permeabilidade é uma proteína isolada a partir dos grânulos dos PMN dos mamíferos, que são células do sangue essenciais na defesa contra os microrganismos invasores. A proteína BIP humana foi isolada a partir de neutrófilos polimorfonucleares por extracção ácida combinadamente com a cromatografia de permuta iónica [Elsbach, *J. Biol. Chem.*, 254:11000 (1979)] ou com a cromatografia de afinidade com *E. coli* [Weiss, *et al.*, *Blood*, 69:652 (1987)], sendo aqui designada por BIP natural, a qual possui uma poderosa actividade bactericida contra um espectro largo de bactérias gram-negativas. O peso molecular da proteína BIP humana é de aproximadamente 55 000 daltons (55 kD). A sequência de aminoácidos da proteína BIP humana completa e também a sequência de ADN que codifica a proteína estão explicitadas na figura 1 da obra de Gray *et al.*, '*J. Biol. Chem.*', 264:9505 (1989).

Comprovou-se que o efeito bactericida da proteína BIP é altamente específico para as espécies sensíveis gram-negativas, não sendo tóxica para outros microrganismos nem para as células eucarióticas. O mecanismo exacto pelo qual a proteína BIP aniquila as bactérias é ainda desconhecido, mas sabe-se que a proteína BIP tem de atacar em primeiro lugar a superfície das bactérias sensíveis gram-negativas. Esta ligação inicial da proteína BIP às bactérias implica interações electrostáticas entre a proteína BIP básica e os locais negativamente carregados dos lipopolissacáridos (LPS). Os LPS receberam a designação de “endotoxina” devido à potente resposta inflamatória que estimulam. Os LPS induzem a libertação de mediadores pelas células inflamatórias hospedeiras, o que em última instância pode ter como consequência um choque endotóxico irreversível. A proteína BIP liga-se ao lípido A que é o componente mais tóxico e mais biologicamente activo dos LPS.

Em bactérias sensíveis, presume-se que a ligação da proteína BIP destrua a estrutura dos LPS, levando à activação de enzimas bacterianas que degradam os fosfolípidos e os peptidoglicanos, alterando a permeabilidade da membrana exterior das células e iniciando fenómenos que em última instância conduzem à morte celular. Elsbach e Weiss, *Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates*, eds. Gallin *et al.*, Capítulo 30, Review Press, Ltd. (1992). Presume-se que a proteína BIP actue em duas fases. A primeira é uma fase subletal caracterizada por uma paragem imediata do crescimento, permeabilização da membrana exterior e activação selectiva das enzimas bacterianas que hidrolisam os fosfolípidos e os peptidoglicanos. Nesta fase, as bactérias podem ser resgatadas por aplicação sobre meios enriquecidos com albumina do soro. A segunda fase, definida pela inibição do crescimento, que não pode ser revertida pela albumina do soro, ocorre ao fim de uma exposição prolongada das bactérias à proteína BIP e caracteriza-se por profundas mudanças fisiológicas e estruturais, incluindo a penetração da membrana citoplásmica.

A proteína BIP também é capaz de neutralizar as propriedades endotóxicas dos LPS aos quais se liga. Devido às suas propriedades bactericidas gram-negativas e à sua capacidade para neutralizar os LPS, a proteína BIP também pode ser utilizada para o tratamento de mamíferos que padeçam de doenças provocadas por bactérias gram-negativas, tais como bacterímia ou sépsis.

Há um fragmento proteolítico, correspondente à parcela do terminal N da holoproteína BIP humana, que possui a actividade antibacteriana e de ligação do lípido A, existente na holoproteína humana de 55 kDa obtida naturalmente. Ao contrário da parcela do terminal N, a região do terminal C da proteína BIP humana isolada manifesta apenas uma actividade antibacteriana ligeiramente detectável. Ver a obra de Ooi *et al.*, *J. Exp. Med.*, 174:649 (1991). Há um fragmento do terminal N da proteína BIP, constituído aproximadamente pelos primeiros 199 aminoácidos da holoproteína BIP humana, designado por “BIPr₂₃” (em inglês “rBPI₂₃”) que foi produzido por meios recombinantes como proteína de 23 kDa. Gazzano-Santoro *et al.*, *Infect. Immun.* 60:4754-4761 (1992).

São importantes para o presente pedido as revelações que constam do pedido de patente de invenção internacional PCT/US91/05768, publicado com o nº WO 92/03535, respeitantes a composições que compreendem uma proteína BIP e um composto aniónico, onde se diz que tais composições (1) não têm nenhuma actividade bacteriana e (2) revelam actividade neutralizadora da endotoxina. Os compostos aniónicos são preferencialmente seleccionados entre proteínas, tal como a albumina do soro, mas também podem ser um proteoglicano, tal como a heparina. Além disso, Weiss *et al.*, em ‘*J. Clin. Invest.*’, 55:33-42 (1975) afirmam que o sulfato de heparina e os LPS se ligam para bloquear a expressão da actividade da proteína BIP, que faz aumentar a permeabilidade. No entanto, em nenhuma dessas obras há referências à neutralização da heparina por combinação com a proteína BIP.

288
9

O documento WO-A-90/09183 (INVITRON CORPORATION) divulga uma proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) capaz de inibir a estimulação de células mediada pelos lipopolissacáridos (LPS); o documento WO-A-92/09621 (NEW YORK UNIVERSITY) descreve fragmentos da proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) que possuem actividade neutralizadora dos lipopolissacáridos (LPS).

Continua a ser necessário, nesta especialidade, que haja novos produtos e métodos utilizáveis na neutralização da heparina, na inibição de tumores e da angiogénese, no combate à proliferação das células endoteliais e no tratamento de inflamações crónicas.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um produto de proteínas bactericidas indutoras da permeabilidade (BIP), utilizável como medicamento de ligação à heparina, e descreve também a utilização do produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a produção de um medicamento de ligação à heparina.

Dito de forma concreta, de acordo com um dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a produção de um medicamento de ligação à heparina para que se ligue à heparina terapeuticamente administrada a um paciente.

De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a produção de um medicamento de ligação à heparina, para neutralizar o efeito anticoagulante da heparina e proporciona também um método para neutralizar a actividade anticoagulante da heparina, o qual consiste em administrar uma quantidade eficaz de produto de proteína BIP *in vitro* a uma amostra de um fluido que contenha heparina.

De acordo com outro dos seus aspectos, a presente invenção proporciona a utilização de um produto de proteína BIP para a produção de um medicamento de ligação à heparina para inibir a proliferação de células endoteliais, mas que não se limite à proliferação de células endoteliais associadas à angiogénese. A invenção descreve métodos para inibir a angiogénese associada a diversos estados clínicos. Dito de modo concreto, a invenção prevê a utilização de um produto de proteína BIP para a produção de um medicamento de ligação à heparina para o tratamento do cancro, mediante a inibição da angiogénese associada à proliferação de tumores malignos, e para o tratamento de lesões do sarcoma de Kaposi e não só. Os cancros sensíveis ao tratamento por administração de produtos de proteína BIP são os melanomas, sarcomas e os carcinomas da mama, cólon, pulmão e próstata, mas sem que isso constitua qualquer limitação. Outras situações patológicas em que os produtos de proteína BIP podem ser administrados para inibir a angiogénese são a retinopatia ocular, a fibroplasia retrolental, a psoríase, os angiofibromas, a endometriose, os hemangiomas e não só. A invenção também descreve métodos de contracepção que consistem em administrar uma quantidade eficaz de um produto de proteína BIP de modo a impedir a implantação de um ovo fertilizado.

A invenção também proporciona a utilização de um produto de proteína BIP para a produção de um medicamento de ligação à heparina para o tratamento de estados patológicos inflamatórios crónicos, tais como artrite, psoríase, doença inflamatória dos intestinos, doença de Crohn, colite ulcerativa, lúpus eritematoso, uveíte autoimunitária, doença de Lyme e asma.

Assim, a invenção proporciona a utilização de um produto de proteína BIP para a produção de um medicamento de ligação à heparina e medicamentos de ligação à heparina para a neutralização das propriedades anticoagulantes da heparina, para a inibição da proliferação de células tumorais e endoteliais, para a inibição da angiogénese e para o tratamento de estados patológicos inflamatórios crónicos.

Tais medicamentos podem ser preparados para administração oral, para injeção ou para aplicação por via parentérica e contêm preferencialmente veículos e adjuvantes convencionais, aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, conforme é do conhecimento dos especialistas na matéria. Os medicamentos assumem preferencialmente a forma de doses unitárias contidas em formas de dosagem no estado sólido, semi-sólido e líquido, tais como comprimidos, pílulas, pós, soluções ou suspensões líquidas e soluções injectáveis e administráveis por infusão.

As doses eficazes estão compreendidas entre cerca de 100 µg/kg e cerca de 10 mg/kg de peso corporal.

Conforme aqui utilizada, a expressão “produto de proteína BIP” abrange a proteína bactericida indutora da permeabilidade produzida naturalmente e por via recombinante; os fragmentos polipeptídicos naturais, sintéticos, recombinantes e biologicamente activos da proteína bactericida indutora da permeabilidade; e os polipeptidos ou análogos biologicamente activos, incluindo as proteínas de fusão híbridas, quer da proteína bactericida indutora da permeabilidade quer dos seus fragmentos biologicamente activos.

DESCRIÇÃO ABREVIADA DAS FIGURAS

A figura 1 mostra um gráfico de um ensaio de ligação da heparina efectuado com a BIP₂₃ e com a BIP_r;

a figura 2 mostra um gráfico que ilustra o efeito da heparina sobre a ligação da BIP₂₃ ao lípido A da estirpe J5 de *E. coli*, comparativamente com diversas amostras de LPS e ácido teicóico;

a figura 3 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP₂₃ sobre a inibição da trombina por acção de ATIII/heparina;

a figura 4 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} sobre a inibição do factor Xa por acção de ATIII/heparina;

a figura 5 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} sobre a inibição do aumento do tempo da trombina no plasma humano, mediado pela heparina;

a figura 6 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} sobre o tempo parcial da tromboplastina;

a figura 7 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} e da proteína de controlo da taumatina nas avaliações artríticas num modelo de artrite induzida pelo colagénio, com artrite ligeira;

a figura 8 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} e da protamina sobre as avaliações artríticas no modelo de artrite induzida pelo colagénio, com artrite grave;

a figura 9 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} sobre a incidência da artrite no modelo de artrite induzida por *Yersinia*;

a figura 10 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} sobre a inibição da estimulação de tipo LPS no ensaio de LAL, com *Borrelia burgdorferi*;

a figura 11 mostra um gráfico que ilustra a sobrevivência de murganhos tratados com BIP ou com uma solução tampão no modelo de metástases de melanoma do murganho;

a figura 12 mostra um gráfico que ilustra o efeito da BIP_{r23} sobre a proliferação das células endoteliais capilares de tipo II nos murinos;

a figura 13 ilustra a ligação da BIP às células epiteliais;

a figura 14 mostra um gráfico de um ensaio de ligação da heparina no caso dos péptidos sintéticos de BIP;

a figura 15 mostra um gráfico de um ensaio de ligação do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) no caso dos péptidos sintéticos de BIP;

a figura 16 mostra um gráfico de um ensaio bactericida de difusão radial no caso dos péptidos sintéticos de BIP;

a figura 17 mostra um gráfico que ilustra um efeito dos péptidos sintéticos de BIP num ensaio de ligação da heparina;

as figuras 18a e 18b mostram um gráfico que ilustra o efeito dos péptidos sintéticos de BIP sobre a inibição da trombina por acção de ATIII/heparina;

as figuras 19a e 19b mostram um gráfico que ilustra o efeito dos péptidos sintéticos de BIP num ensaio de ligação de LAL;

as figuras 20a, 20b, 20c e 20d mostram gráficos que ilustram o efeito de péptidos sintéticos de BIP em ensaios bactericidas de difusão radial;

as figuras 20e e 20f mostram gráficos que ilustram o efeito dos péptidos sintéticos de BIP em ensaios de caldo de cultura de *E. coli*;

as figuras 21a e 21b mostram os resultados da absorvência na CLER no caso dos fragmentos proteolíticos de BIP₂₃;

a figura 22 mostra um gráfico de resultados de um ensaio de inibição de LAL no caso dos fragmentos proteolíticos da BIP₂₃; e

a figura 23 mostra os domínios funcionais da BIP₂₃.

DESCRIÇÃO MINUCIOSA

A presente invenção diz respeito à administração de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade (BIP) para o tratamento de diversos casos terapêuticos não directamente associados com uma infecção bacteriana.

Embora os produtos de proteína BIP aqui descritos sejam úteis como citotoxinas poderosas contra as bactérias gram-negativas e para neutralizar os efeitos adversos dos lipopolissacáridos

2814

associados às paredes celulares de bactérias gram-negativas, foi descortinado um conjunto vasto de efeitos terapêuticos para os produtos de proteína BIP não directamente associados com infecções bacterianas gram-negativas. Dito de forma concreta, a invenção diz respeito a métodos para tratar casos não directamente associados com infecções gram-negativas, incluindo a neutralização da actividade anticoagulante da heparina, a inibição da proliferação de células tumorais e endoteliais, incluindo a proliferação de células associadas à angiogénese, e o tratamento de estados patológicos inflamatórios crónicos, tais como a artrite.

Os produtos de proteína BIP que contêm fragmentos biologicamente activos da holoproteína BIP que se pretende administrar podem ser gerados e/ou isolados por todos os meios conhecidos na especialidade. O pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente e de que somos co-proprietários, com o nº de série 07/885 501, e a sua continuação parcial correspondente ao pedido de patente de invenção norte-americana com o nº de série 08/072 063, depositado a 19 de Maio de 1993 e publicado com o nº WO 93/23540 (pedido de patente de invenção europeia com o nº 93913992.9), descrevem métodos novos para purificar produtos de proteína BIP recombinante, expressos em células hospedeiras de mamíferos transformados geneticamente e nelas segregados quando estas são criadas em cultura, e descrevem a forma de produzir grandes quantidades de produtos de BIP recombinante, adequados para incorporação em preparações farmacêuticas estáveis e homogéneas.

Os fragmentos de BIP biologicamente activos compreendem as moléculas biologicamente activas que contêm a mesma sequência de aminoácidos de uma holoproteína BIP, com a excepção de a essas moléculas lhes faltarem os aminoácidos do terminal amino, os aminoácidos internos e/ou os aminoácidos do terminal carboxi da holoproteína. A título de exemplos não limitativos, tais fragmentos compreendem os aqui descritos e o fragmento natural de 25 kDa

já anteriormente mencionado e ainda um fragmento do terminal amino com 199 resíduos aminoácidos, de 23 kDa e recombinante, pertencente à holoproteína BIP humana designada por BIPr₂₃ (em inglês rBPI₂₃). Ver Gazzano-Santoro *et al.*, *Infect. Immun.* 60:4754-4761 (1992). Nessa publicação utilizou-se um vector de expressão como fonte de ADN codificador de um produto de expressão recombinante (BIPr₂₃) que possui a sequência de sinal de 31 resíduos e os primeiros 199 aminoácidos do terminal N da BIP humana perfeitamente desenvolvida (madura), conforme é explicitado nas SEQ ID NOS: 1 e 2 retiradas da obra de Gray *et al.*, *supra*, com a excepção de o resíduo valina na posição 151 ser especificado por GTG em vez de GTC e o resíduo 185 ser o ácido glutâmico (especificado por GAG) em vez de lisina (especificada por AAG). Também foi produzida a holoproteína recombinante aqui designada por BIPr ou BIPr₃₀ que possui a sequência explicitada nas SEQ ID NOS: 1 e 2 retiradas da obra de Gray *et al.*, *supra*, com as excepções assinaladas para a BIPr₂₃.

Há outros exemplos não limitativos de fragmentos biologicamente activos da BIP que compreendem os fragmentos, *v.g.*, da holoproteína BIP ou da BIPr₂₃ gerada quando se submete as proteínas a clivagem química com agentes tais como o brometo de cianogénio (CNBr) ou por digestão enzimática com agentes tais como a endoproteínase Asp-N. Os fragmentos da proteína BIP também podem ser fornecidos sob a forma de péptidos sintéticos lineares ou cíclicos que compreendem réplicas desde cerca de 5 até cerca de 50 aminoácidos contínuos no interior da holoproteína BIP e especialmente dentro da metade do terminal amino da proteína. Tais péptidos podem ser fornecidos numa forma monomérica, na forma de dímeros ou multímeros (em que o péptido replica uma região da BIP que possui resíduos cisteína) e sob a forma de dímeros ou multímeros “lineares” em que há uma sequência de BIP presente repetitivamente no péptido, com ou sem separação por meio de aminoácidos “separadores” que permitem uma apresentação conformacional escolhida.

Os análogos biologicamente activos da BIP compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, as proteínas de fusão híbridas recombinantes que contêm a holoproteína BIP ou os seus fragmentos biologicamente activos e pelo menos uma parcela de um outro polipeptido, pelo menos. Tais proteínas foram descritas por Theofan *et al.* no pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente e de que somos co-proprietários, com o nº de série 07/885 911 e numa sua continuação parcial correspondente ao pedido de patente de invenção norte-americana com o nº de série 08/064 693, depositado a 19 de Maio de 1993 e publicado com o nº WO 93/23434 (PCT/US93/04754), e incluem as proteínas de fusão híbridas que possuam, na extremidade do terminal amino, uma proteína BIP ou um seu fragmento biologicamente activo e que possuam na extremidade do terminal carboxi pelo menos um domínio constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou uma sua variante alélica.

Os análogos biologicamente activos da proteína BIP também compreendem, mas sem que isso constitua qualquer limitação, os produtos de proteína BIP em que um ou vários resíduos aminoácidos foram substituídos por um aminoácido diferente ou por aminoácidos atípicos. Por exemplo, o pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente e de que somos co-proprietários, com o nº de série 08/013 801 (Theofan *et al.*, "Stable Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Products and Pharmaceutical Compositions Containing the Same"), depositado a 2 de Fevereiro de 1993 e publicado com o nº WO 94/18323 (pedido de patente de invenção europeia com o nº 94908704.3), descreve análogos polipeptídicos de BIP e de fragmentos de BIP em que um resíduo cisteína na posição 132 ou na posição 135 é substituído por um aminoácido diferente. Um produto proteínico preferido, designado por BIP_{r23}Δcis (em inglês rBPI₂₃Δcis), compreende os primeiros 199 resíduos aminoácidos da holoproteína BIP mas em que o resíduo cisteína na posição 132 é substituído por um resíduo alanina.

A administração de um produto de proteína BIP realiza-se preferencialmente sob a forma de uma composição farmacêutica que incorpore um produto de proteína BIP e um diluente, adjuvante ou veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. A composição de produto de proteína BIP pode ser administrada simultaneamente ou não com antibióticos, agentes tensio-activos ou outros agentes quimioterapêuticos conhecidos. Uma composição farmacêutica preferida que contém produtos de proteína BIP incorpora a proteína BIP segundo uma concentração de 1 mg/mL em soluto salino tamponado com citrato (citrato 0,02 M, NaCl 0,15 M a pH 5,0) contendo 0,1% em peso de poloxâmero 188 (Pluronic F-68, BASF Wyandotte, Parsippany, NJ) e 0,002% em peso de polissorbato 80 (Tween 80, ICI Americas Inc., Wilmington, DE). Tais combinações preferidas estão descritas no pedido de patente de invenção norte-americana co-pendente e de que somos co-proprietários, com o nº de série 08/012 360 (McGregor *et al.*, "Improved Pharmaceutical Composition"), depositado a 2 de Fevereiro de 1993 e publicado com o nº WO 94/17819 (pedido de patente de invenção europeia com o nº 94907963.6).

As doses eficazes de proteína BIP e de produtos de proteína BIP, para a neutralização parcial ou total da actividade anticoagulante da heparina e de outros efeitos aqui descritos, podem ser determinadas facilmente pelos especialistas na matéria tomando em consideração parâmetros convencionais, incluindo a massa corporal do paciente, a quantidade de heparina administrada a esse paciente e o tempo decorrido desde a administração da heparina.

Há outros aspectos e vantagens da presente invenção que serão compreendidos tomando em consideração os exemplos ilustrativos a seguir descritos. O exemplo 1 aborda sistemas de ensaio para a quantificação da ligação da heparina pelos produtos de proteína BIP; o exemplo 2 descreve a capacidade relativa da heparina para bloquear a ligação dos LPS bacterianos aos produtos de proteína BIP; os exemplos 3 e 4 apresentam resultados de testes sobre a capacidade

dos produtos de proteína BIP para inibirem respectivamente a inactivação da trombina ou do factor Xa por acção dos complexos antitrombina III/heparina; e o exemplo 5 descreve o efeito dos produtos de proteína BIP sobre o aumento do tempo da trombina, mediado pela heparina. O exemplo 6 descreve o efeito de produtos de proteína BIP sobre o aumento do tempo parcial da tromboplastina, mediado pela heparina. Os exemplos 7-9 dizem respeito à administração de produtos de proteínas BIP em sistemas modelares de animais com artrite induzida pelo colagénio e por via bacteriana, exemplificando o tratamento de estados patológicos inflamatórios crónicos. Os exemplos 10 e 11 ilustram os testes efectuados com produtos de proteínas BIP para investigar os efeitos angiostáticos num sistema modelar de metástases de melanoma maligno no murganho. O exemplo 12 estuda os efeitos dos produtos de proteína BIP sobre a proliferação das células endoteliais e os possíveis mecanismos de ligação envolvidos. O exemplo 13 diz respeito à preparação de péptidos BIP sintéticos. Os exemplos 14-16 ilustram a ligação à heparina, a ligação aos LPS e as actividades bactericidas observadas com os péptidos BIP sintéticos do exemplo 13. O exemplo 17 descreve a preparação de outros péptidos BIP sintéticos. Os exemplos 18 a 21 abordam as propriedades dos péptidos do exemplo 17. O exemplo 22 descreve a preparação de péptidos do fragmento proteolítico BIP. O exemplo 23 descreve os efeitos bactericidas dos fragmentos proteolíticos BIP. O exemplo 24 descreve as propriedades de ligação à heparina existentes nos fragmentos proteolíticos BIP. O exemplo 25 descreve o efeito dos fragmentos proteolíticos BIP num ensaio com LAL.

Exemplo 1

LIGAÇÃO DA HEPARINA PELOS PRODUTOS DE PROTEÍNAS BIP

Foram realizados ensaios de ligação da heparina utilizando moléculas BIP recombinantes e naturais ligadas à membrana e heparina marcada radioactivamente. Dito de forma abreviada,

juntou-se BIPr₂₃ e holoproteína designada por BIPr ou BIPr₅₀ às cavidades de uma placa de microtitulação de 96 cavidades onde havia uma membrana 'Imobilon-P' (Millipore, Bedford, MA) disposta no fundo das cavidades. Juntou-se a cada cavidade 5 µg de proteína. Efectuou-se a secagem das cavidades que a seguir foram bloqueadas com albumina do soro de bovino a 1% (ASB) em soluto salino tamponado com fosfato a pH 7,4 (tampão de bloqueio). Foram preparadas diluições de ³H-heparina (DuPont, NEN, Wilmington, DE) no tampão de bloqueio que foram incubadas nas cavidades que continham a proteína BIP, durante 1 hora a 4°C. Aspirou-se a heparina não ligada e efectuou-se a lavagem das cavidades três vezes com tampão de bloqueio, secou-se e removeu-se para efeitos de quantificação num contador de cintilação em meio líquido. Os resultados de um ensaio típico estão apresentados de forma gráfica na figura 1. Apesar da ASB no tampão de bloqueio ter realmente uma capacidade e uma afinidade diminutas para se ligar à heparina, isso foi considerado fisiologicamente irrelevante e subtraiu-se sempre o valor espontâneo ao sinal do composto testado. A ligação da heparina marcada radioactivamente foi totalmente inibida por um excesso 100 vezes superior de heparina não marcada (dados não representados).

Em experiências semelhantes efectuou-se a comparação da ligação da heparina por acção das moléculas BIPr₂₃, BIPr₅₀ e da holoproteína natural (BIP) com os resultados obtidos com a proteína de contraprova taumatina (esta possui uma carga e dimensões semelhantes às da molécula BIPr₂₃) ou com uma contraprova de tampão de lavagem (ASB a 1%). Nestes ensaios observou-se uma menor ligação da heparina por acção das holoproteínas BIP naturais e recombinantes. A menor intensidade de ligação por acção das moléculas BIPr e BIPn pode ser eventualmente o resultado da contaminação das preparações de proteína com hidratos de carbono.

Além disso, foram determinadas as constantes de ligação utilizando como ligando ^3H -heparina, pelo método de minimização de funções não lineares com recurso à aplicação informática 'Grafit' (Erithicus Softward Ltd., Staines, UK) para as moléculas BIPr₂₃, BIPr₅₀, sulfato de protamina (Sigma Chemical Co.) e taumatina, estando os resultados agrupados no quadro 1 seguinte.

QUADRO 1

Constantes de ligação utilizando ^3H -heparina como ligando

PROTEÍNA	K_d	CAPACIDADE	COLUNA DE HEPARINA
			ELUIÇÃO COM NaCl
BIPr ₂₃	79 nM	2,63 μg	0,84 M
BIPr ₅₀	173 nM	1,30 μg	0,81 M
Protamina	8,1 nM	2,66 μg	1,33 M
Taumatina	Sem ligação		0,15 M

Exemplo 2

COMPETIÇÃO DA HEPARINA PELA LIGAÇÃO AO PRODUTO DE PROTEÍNA BIP

Avaliou-se a capacidade da heparina, do lípido A solúvel, dos LPS e dos ácidos teicóicos para competirem com o lípido A da estirpe J5 de *E. coli* imobilizada pela ligação à proteína BIPr₂₃ solúvel. Dito de forma concreta, foram utilizadas cavidades de microtitulação 'Imulon 2' (Dynatech, Chintilly, VA) recobertas com lípido A da estirpe J5 de *E. coli* numa concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ em metanol (volume de 50 μL). As cavidades foram depois bloqueadas durante 4 horas a 37°C com STP contendo 0,1% de ASB. As cavidades de contraprova foram tratadas com 50 μL de metanol absoluto e depois foram bloqueadas conforme se disse antes. As cavidades bloqueadas foram então aspiradas e lavadas duas vezes com STP/'Tween-20' a

0,05%. Introduziu-se nas cavidades concentrações variáveis de inibidores putativos, num volume de 25 µL de STP, seguindo-se a aplicação de proteína BIP_{r23} radioiodada a 200 000 cpm em 25 µL de STP contendo 0,1% de 'Tween 20'. As soluções testadas continham 'Ra LPS' de *Salmonella minnesota* R60 a 200 µg/mL; LPS regulares de *E. coli* 0113 (RIBI Immunochem., Hamilton, MT, #R318) a 200 µg/mL; ácido lipoteicóico proveniente de *Streptococcus faecalis* (Sigma, St. Louis, MO, #L-4015) a 400 µg/mL; ácido lipoteicóico proveniente de *Staphylococcus aureus* (Sigma #L-2525) a 400 µg/mL; e heparina sódica injectável de qualidade USP (Lypho-Med, Rosemont, IL, #9155-01) a 400 µg/mL. Esperou-se que a ligação tivesse lugar de um dia para o outro a 4°C com agitação suave, após o que as cavidades foram aspiradas e lavadas três vezes com STP/'Tween-20' a 0,05% e a seguir efectuou-se uma contagem. Os resultados estão ilustrados na figura 2 que mostra a afinidade elevada da proteína BIP_{r23} para a heparina e que também mostra que a heparina bloqueia a ligação da proteína BIP ao lípido A.

Exemplo 3

NEUTRALIZAÇÃO DA HEPARINA PELOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP: EFEITO DA PROTEÍNA BIP SOBRE A INACTIVAÇÃO DA TROMBINA PELOS COMPLEXOS DE ATIII/HEPARINA

Recorreu-se a um ensaio cromogénico para se determinar o efeito da proteína BIP_{r23} sobre a inactivação da trombina pelos complexos de ATIII/heparina. Dito de forma concreta, utilizou-se um estojo de ensaio anti-trombina de marca 'Chromostate™' (Organon Teknika Corp., Durham, NC) para se examinar a inibição da trombina purificada, por acção dos complexos previamente formados de ATIII/heparina no plasma.

O ensaio foi praticado em placas de microtitulação de 96 cavidades, em triplicado, com um volume final de 200 μL por cavidade. A ordem de adição dos componentes de ensaio foi a seguinte: 1) 50 μL de amostra (proteína BIP₂₃ ou taumatina, enquanto proteína de contra-prova) com concentrações finais de 100, 50, 25, 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{cavidade}$, em STP; 2) 50 μL de plasma a 1:100 em tampão; 3) 50 μL de trombina à razão de 1 nKat/mL, em tampão; e 4) 50 μL de substrato cromogénico na concentração de 1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, em H_2O . Deixou-se a reacção decorrer durante 10 minutos a 37°C e interrompeu-se por adição de 50 μL de ácido cítrico 0,1 M, tendo a reacção de cor sido quantificada num leitor de microplacas. Os resultados dos ensaios, ilustrados na figura 3, indicam que a proteína BIP₂₃ consegue neutralizar eficientemente os complexos de ATIII/heparina no plasma humano heparinizado, de uma forma dependente da dose. À medida que aumentou a concentração plásmica, aumentou também a actividade da trombina. Isto é devido a uma diminuição da quantidade de complexos inibitórios de ATIII/heparina no plasma acrescentado. Com a proteína de contraprova, a taumatina, não foi observado nenhum efeito neutralizador semelhante e verificou-se que era essencialmente equivalente ao tampão de contraprova para todas as concentrações de proteínas.

Exemplo 4

NEUTRALIZAÇÃO DA HEPARINA PELOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP: EFEITO DA PROTEÍNA BIP SOBRE A INACTIVAÇÃO DO FACTOR Xa PELOS COMPLEXOS DE ATIII/HEPARINA

Recorreu-se a um ensaio cromogénico para se determinar o efeito da proteína BIP₂₃ sobre a neutralização do factor Xa pelos complexos de ATIII/heparina. Dito de forma concreta, o ensaio foi efectuado utilizando um estojo de ensaio anti-factor Xa com heparina 'Chromostate'

(Organon Teknika Corp.) e foi praticado com concentrações fixas de factor Xa e de ATIII. Fez-se variar a concentração da heparina de modo a obter-se uma curva padrão para a heparina com as concentrações de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,063, 0,031, 0,016, 0,008, 0,004, 0,002 e 0 unidades/mL, em STP. O protocolo de ensaio permitiu medir a actividade funcional do factor Xa pela libertação de um composto cromogénico a partir de um substrato sintético. Os complexos de ATIII/heparina neutralizam a actividade do factor Xa, pelo que a quantidade de cromogénio libertado era inversamente proporcional à quantidade de actividade de heparina anti-factor Xa na amostra de ensaio.

O ensaio teve lugar em placas de microtitulação de 96 cavidades, em triplicado, com um volume final de 200 μL por cavidade. Os componentes de ensaio foram acrescentados às cavidades de microtitulação do modo seguinte: 1) amostras de 50 μL (proteína BIPr₂₃ ou taumatina, enquanto proteína de contraprova) com concentrações finais de 100, 50, 25, 10 e 1 $\mu\text{g/cavidade}$, em STP; 2) 50 μL de factor Xa a 0,14 nKat/mL, em H₂O; 3) 25 μL de ATIII a 0,5 U/mL, em H₂O; 4) 24 μL de heparina a 0,25 U/mL, em tampão; 5) 50 μL de substrato (3 $\mu\text{mol/mL}$). Deixou-se a reacção decorrer durante 10 minutos a 37°C e interrompeu-se com 50 μL de ácido cítrico 0,1 M, tendo então a reacção de cor sido quantificada num leitor de microplacas. Os resultados da experiência, ilustrados na figura 4, indicam que a proteína BIPr₂₃ consegue neutralizar eficientemente a heparina na inibição do factor Xa pelos complexos de ATIII/heparina. À medida que aumentou a concentração da heparina, a quantidade necessária de BIPr₂₃ para a neutralização da heparina também aumentou. Com a proteína de contraprova, a taumatina, não foi observado nenhum efeito neutralizador semelhante e verificou-se que era essencialmente equivalente ao tampão de contraprova para todas as concentrações de proteína.

Exemplo 5

NEUTRALIZAÇÃO DA HEPARINA PELOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP: EFEITO DA PROTEÍNA BIP SOBRE O PROLONGAMENTO DO TEMPO DA TROMBINA MEDIADO PELA HEPARINA

Examinou-se o efeito dos produtos de proteína BIP sobre o prolongamento do tempo da trombina mediado pela heparina, isto é, o tempo necessário para a coagulação de uma mistura de trombina e plasma. O tempo da trombina é aumentado pela presença de inibidores endógenos ou exógenos da formação da trombina, tais como a heparina administrada terapêuticamente. Os agentes que neutralizam os efeitos anticoagulantes da heparina reduzem o tempo da trombina medido no teste. Efectuou-se a incubação de plasma humano citrado (200 μ L) durante 1 minuto a 37°C, quer com 15 μ L de diluente (NaCl 0,15 M, Tris 0,1 M a pH 7,4), quer com 15 μ L de diluente contendo também heparina na concentração de 25 μ g/mL (187 unidades/mg). Foram acrescentadas diversas concentrações de proteína BIP₂₃ (desde 0,0 até 56 μ g/mL) num volume de 15 μ L, seguindo-se imediatamente a adição de 100 μ L de reagente de trombina (Sigma Chemical Co., N° 845-4). Mediu-se o tempo de coagulação (tempo da trombina) utilizando um fibrómetro 'BBL' (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD). Os resultados ilustrados na figura 5 permitem concluir que a proteína BIP₂₃ inibe o prolongamento do tempo da trombina mediado pela heparina. Na ausência de heparina, a proteína BIP₂₃ não teve nenhum efeito no ensaio, mesmo para concentrações da ordem de 56 μ g/mL.

Exemplo 6

NEUTRALIZAÇÃO DA HEPARINA PELOS PRODUTOS DA PROTEÍNA BIP: EFEITO DA PROTEÍNA BIP SOBRE O TEMPO PARCIAL DA TROMBOPLASTINA

Determinou-se o efeito da proteína BIP₂₃, ou do sulfato de protamina, sobre o tempo parcial da tromboplastina (TPT, em inglês PTT) em ratos heparinizados. O TPT é prolongado pela presença de inibidores endógenos ou exógenos da formação da trombina, tais como a heparina administrada terapeuticamente. Os agentes que neutralizam os efeitos anticoagulantes da heparina reduzem o TPT tal como medido no teste. Foram utilizados ratos da estirpe Sprague-Dawley, alojados segundo as regras 'NIH', aos quais se administrou heparina à razão de 100 unidades/kg por injeção intravenosa sob a forma de *bolus*, através da veia caudal de cada animal, seguindo-se a administração de proteína BIP₂₃ à razão de 5 mg/kg, ou sulfato de protamina ou tampão à razão de 5 mg/kg. Depois determinou-se o TPT a partir de amostras de sangue colhidas a partir da aorta abdominal dos animais previamente anestesiados. Determinou-se também o TPT dos animais não tratados. Os resultados ilustrados na figura 5 permitem concluir que tanto a proteína BIP₂₃ como a protamina tiveram um efeito intermédio sobre o TPT dos animais tratados. Os dados destes animais confirmam os efeitos dos produtos de proteína BIP neutralizadores da heparina, conforme descrito nos exemplos 2-5.

Os resultados conjuntos dos exemplos 1 a 6 permitem concluir que a proteína BIP₂₃ se liga à heparina no ensaio de ligação directa e que neutraliza eficientemente a inibição das proteases de coagulação por acção da heparina. Com base nestas características, antevê-se que os produtos de proteína BIP venham a ser úteis na neutralização clínica dos efeitos anticoagulantes da heparina em doses geralmente correspondentes à dose prática recomendada para o sulfato de protamina, mas não se prevê que possua os efeitos graves hipotensivos e de tipo anafiláticos dessa substância.

Exemplo 7EFEITOS TERAPÊUTICOS DOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP NA DOENÇA
INFLAMATÓRIA CRÔNICA: MODELO DE ARTRITE INDUZIDA COM COLAGÉNIO

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito à descoberta da utilidade da proteína BIP para tratar e evitar os efeitos de estados patológicos inflamatórios crónicos, tais como a artrite, incluindo a artrite reumatóide e a activa, a psoríase, a doença inflamatória dos intestinos, a doença de Crohn, a colite ulcerativa, o lúpus eritematoso, a uveíte de natureza autoimunitária, a doença de Lyme e a asma. São apresentados métodos exemplificativos para o tratamento de pacientes que padeçam de artrite, os quais consistem em administrar uma quantidade eficaz de um produto de proteína BIP com a finalidade de se evitar ou tratar a artrite. O produto de proteína BIP pode ser administrado por via tópica ou por injeção, por exemplo, intrarticular, intravenosa, intramuscular ou subcutânea, ou por outros métodos parentéricos e não parentéricos.

O efeito da administração dos produtos de proteína BIP foi estudado num modelo de artrite induzida pelo colagénio. Dito de forma concreta, induziu-se artrite em murganhos por imunização intradermal com colagénio de tipo II de bovino, com aplicação na base da cauda, em conformidade com o método de Stuart *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 69:673-683 (1982). De um modo geral, os murganhos começaram a desenvolver sintomas artríticos ao 21º dia após a imunização com o colagénio. As classificações artríticas dos murganhos tratados foram efectuadas de uma forma cega ao longo de um período de 120 dias, no caso dos murganhos tratados em cada um dos dias 21 a 25 com doses quer de proteína BIP₂₃, proteína de contraprova taumatina ou tampão, doses essas que foram injectadas por via intravenosa na veia caudal.

Dito de forma concreta, administrou-se colagénio de tipo II de bovino (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL), por injeção intradermal (0,1 mg/murganho), na base da cauda no dia 0 a grupos de 10 murganhos machos (murganho/DBA/1J), pesando cada um deles aproximadamente 20-25 g. Dissolveu-se a proteína BIP₂₃ em NaCl 0,5 M e acetato de sódio 20 mM a pH 6,0 e diluiu-se com tampão de STP (1 mg/mL) para administração à razão de 0,125 mg/murganho. Como contraprovas utilizou-se a proteína taumatina em STP (0,121 mg/murganho) ou apenas o tampão de STP (0,1 mL).

Os resultados apresentados na figura 7 demonstram que a proteína BIP₂₃ tem um efeito estatisticamente significativo na redução da avaliação artrítica dos murganhos tratados, comparativamente com os animais que receberam como contraprova tampão de STP e proteína taumatina.

Exemplo 8

EFEITOS TERAPÊUTICOS DOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP EM COMPARAÇÃO COM O SULFATO DE PROTAMINA NO CASO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA CRÓNICA: MODELO DE ARTRITE INDUZIDA PELO COLAGÉNIO

Utilizou-se o modelo de artrite induzida pelo colagénio, descrito no exemplo 7, para se avaliar os resultados de um produto de proteína BIP por comparação com o sulfato de protamina, utilizando como contraprovas quer a proteína taumatina quer o tampão. Dito de forma concreta, dissolveu-se a proteína BIP₂₃ em NaCl 0,5 M e acetato de sódio 20 mM a pH 6,0 e diluiu-se com tampão de STP (1 mg/mL) e administrou-se à razão de 0,125 mg/murganho. Os outros materiais testados foram administrados nas doses seguintes: sulfato de protamina (Sigma Chemical Co) (0,13 mg/murganho), taumatina (0,121 mg/murganho) e tampão de STP

(0,1 mL). Cada um de quatro grupos de 10 animais recebeu as substâncias de teste ou de contraprova por injeção intravenosa através da veia caudal em cada um dos dias desde o 28º até ao 32º. A figura 8 mostra os resultados das avaliações artríticas para os diversos protocolos de tratamento e de contraprova, com variações feitas nos dias 28º-80º. Os asteriscos (*) na figura 8 representam uma diferença estatisticamente significativa entre a proteína BIP₂₃ e o tampão, para um valor $p < 0,01$, ao passo que os sinais (+) representam uma diferença estatisticamente significativa entre a proteína BIP₂₃ e o tampão para um valor $p < 0,05$. Estes resultados demonstram que a proteína BIP₂₃ reduziu de forma significativa a classificação artrítica dos murganhos tratados no sistema modelar.

Exemplo 9

MODELOS DE ARTRITE REACTIVA INDUZIDA GRAM-NEGATIVA

O efeito da administração de produtos de proteína BIP para tratar a artrite reactiva foi estudado num modelo de artrite reactiva induzida por *Yersinia enterocolitica*, em conformidade com o método de Yong *et al.*, *Microbial Pathogenesis*, 4:305-310 (1988). Dito de forma concreta, efectuou-se a administração de produtos de proteína BIP a murganhos macho da estirpe DBA/2J aos quais se havia injectado previamente por via intravenosa, através da veia caudal, *Yersinia enterocolitica* cWA 0:8 T2 (isto é, faltava-lhe o plasmídeo da virulência, de acordo com Yong *et al.*, *supra*) segundo um regime de dosagem igual a 4×10^8 bactérias, valor este calculado para induzir nos murganhos artrite não séptica. Cada um de três grupos de 15 murganhos recebeu as substâncias de teste ou de contraprova por injeção intravenosa através da veia caudal. Administrou-se aos murganhos quer a proteína BIP₂₃, segundo um regime de dosagem de cerca de 5,0 mg/kg, dissolvida num tampão constituído por citrato de

sódio 20 mM, cloreto de sódio 150 mM, 0,1% de poloxâmero 188, 0,002% de polissorbato 80 a pH 5,0, quer a proteína taumatina, segundo um regime de dosagem de cerca de 5,0 mg/kg, dissolvida no tampão constituído por citrato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 150 mM, 0,1% de poloxâmero 188 e 0,002% de polissorbato 80 a pH 5,0, quer tampão por si só. Os resultados traduzidos na figura 9 mostram que o produto de proteína BIP reduziu de forma significativa a incidência de artrite reactiva comparativamente com o tampão ou com a proteína de contraprova taumatina.

O microrganismo *Borrelia burgdorferi* é o agente patogénico responsável pela doença de Lyme e pela artrite que lhe está associada e possui um complexo de tipo LPS nas suas paredes celulares que é diferente do complexo de *E. coli*, mas estruturalmente afim. Determinou-se o efeito da administração dos produtos de proteína BIP sobre a inibição de LPS de *Borrelia burgdorferi* num ensaio de inibição de lisado de amebócitos *Limulus* (LAL). Dito de forma concreta, realizou-se um ensaio de LAL, de acordo com o método do exemplo 15, medindo o efeito da proteína BIP₂₃ sobre os LPS de *Borrelia burgdorferi* administrados à razão de 2,5 µg/mL e sobre os LPS de *E. coli* 013 administrados à razão de 2 ng/mL. Os resultados traduzidos na figura 10 mostram que a proteína BIP₂₃ neutraliza os efeitos quer dos LPS de *Borrelia burgdorferi* quer dos LPS de *E. coli* 013 no ensaio de LAL.

Exemplo 10

EFEITO DA PROTEÍNA BIP NO MODELO DE MELANOMA MALIGNO DO MURGANHO

De acordo com este exemplo, testou-se um produto de proteína BIP, protamina e as duas substâncias de contraprova, proteína taumatina e tampão, para se avaliar a sua eficácia num modelo de metástases de melanoma maligno do murganho. Dito de forma concreta,

inoculou-se quatro grupos de 9 murganhos C57BL/6J com 10^5 células de melanoma maligno B16.F10 por injeção intravenosa na veia caudal no dia 0. Administrou-se por via intravenosa quer a proteína BIP_{r23} (0,13 mg/murganho) quer o sulfato de protamina (0,13 mg/murganho), quer a taumatina (0,13 mg/murganho), quer o tampão de STP (0,1 mL/murganho) na veia caudal dos murganhos nos dias 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17 e 19. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao 20º dia para observação dos tecidos pulmonares. Efectuou-se a perfusão dos lobos de cada pulmão que foram insuflados por injeção de 3 mL de água no pulmão através da traqueia. Depois efectuou-se a contagem dos nódulos dos tumores superficiais com o auxílio de um microscópio de dissecação e analisou-se o número de tumores encontrados em cada grupo para procurar diferenças estatisticamente significativas. Embora os dados não tivessem sido estatisticamente significativos, os animais tratados com a proteína BIP_{r23} revelaram a mais baixa carga tumoral, seguindo-se os animais tratados com a protamina, com a contraprova de proteína taumatina e com a contraprova de tampão. A falta de significação estatística (o número de tumores não reflectiu adequadamente o tamanho dos tumores) indica que seria necessária uma metodologia experimental mais específica para se determinar a carga tumoral.

Exemplo 11

EFEITO DA PROTEÍNA BIP NUM MODELO DE MELANOMA MALIGNO DO MURGANHO

Testou-se novamente um produto de proteína BIP, a protamina e as duas substâncias de contraprova, proteína taumatina e tampão, para se investigar a sua eficácia num modelo de metástases do melanoma maligno do murganho, de acordo com o exemplo 10. Dito de forma concreta, inoculou-se seis grupos de murganhos da estirpe C57BL/6J com 10^5 células do

melanoma maligno B16.F10 por injeção intravenosa na veia caudal no dia 0. Qualquer das substâncias BIPr₂₃ (0,125 mg/murganho), sulfato de protamina (0,125 mg/murganho), taumatina (0,125 mg/murganho) ou tampão de STP, de acordo com o explicitado no quadro 2 subsequente, foi administrada por via intravenosa na veia caudal dos murganhos nos dias 1, 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16 e 19. Todos os animais dos grupos A-D foram sacrificados por deslocamento cervical no 20º dia para observação dos tecidos pulmonares. Efectuou-se a remoção dos pulmões que foram colocados numa proveta com água fria. Os lobos de cada pulmão foram depois sujeitos a uma operação de perfusão e insuflados por injeção de 3 mL de água no pulmão através da traqueia. Depois efectuou-se a análise dos nódulos dos tumores superficiais para se pesquisar o seu conteúdo em melanina.

QUADRO 2

Grupo	Contraprova/Substância testada	Nº de animais
A	Tampão	10
B	Protamina	10
C	Taumatina	10
D	BIPr ₂₃	10
E	Tampão	5
F	BIPr ₂₃	5

Os grupos E e F, constituídos por animais tratados respectivamente com a substância tampão ou com a proteína BIPr₂₃, não foram sacrificados, mas foram observados uma vez por dia para se determinar a mortalidade. A figura 11 agrupa os dados de sobrevivência para os dois grupos de animais. Embora a totalidade dos 10 animais tenham morrido por volta do 43º dia, os murganhos tratados com a proteína BIPr₂₃ sobreviveram, de um modo geral, significativamente

mais do que os murganhos não tratados, significando isso que a proteína BIP teve um efeito antiangiogénico e que reduziu as metástases dos tumores do melanoma.

Pelo exposto, de acordo com um outro aspecto da invenção, os produtos de proteína BIP podem ser utilizados para inibir o sarcoma de Kaposi num sistema modelar, tal como o de Miles *et al.*, 'VII International Conference on AIDS', Florença, Itália, Documento 41(8), 1991.

Exemplo 12

EFEITO DA PROTEÍNA BIP SOBRE A PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS

ENDOTELIAIS

Fez-se passar células endoteliais (CE) dos capilares cerebrais dos murinos, conforme descrito por Bauer em *Microvascular Research* 37:148-161 (1989), por Meio 199 contendo sais de Earle, L-glutamina e bicarbonato de sódio na concentração de 2,2 g/L (Gibco, Grand Island, NY, #400-100EB) mais 10% de soro fetal de vitelo inativado termicamente (Irvine Scientific, Irvine, CA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, #600-5140AG). Efectuou-se a colheita das células confluentes por tripsinização com tripsina-EDTA (Gibco #610-5300PG) durante 3 minutos. Interrompeu-se a tripsinização juntando ao balão 10 mL de meio de passagem. Os ensaios de proliferação foram realizados com CE recém-colhidas em placas de microtitulação convencionais de 96 cavidades de fundo redondo. Em cada cavidade de ensaio manteve-se um volume final de 200 µL/cavidade. Acrescentou-se a cada cavidade um total de 4×10^4 CE com concentrações variáveis de proteína BIP₂₃, proteína de contraprova taumatina e tampão de contraprova. Decorridas 48 horas de cultura numa incubadora em atmosfera com 5% de CO₂, juntou-se a cada cavidade 1 µCi de [metil-³H]-timidina em 10 µL de Meio 199. Após um período de estimulação de 24 horas, efectuou-se a colheita das CE por tripsinização sobre

filtros de microfibras de vidro e quantificou-se a [^3H]-timidina incorporada, utilizando para tal um contador de radiação β em fase sólida, proporcional ao gás.

A inibição da proliferação das CE, dependente da concentração, por acção da proteína BIPr₂₃, está ilustrada na figura 12. Não foi observado efeito nenhum quando se acrescentou às cavidades concentrações semelhantes de taumatina ou volumes iguais de tampão. A primeira inibição de proliferação é observada para uma concentração da proteína BIPr₂₃ igual a 12,4 $\mu\text{g/mL}$ e parece que o efeito é máximo à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Sabe-se que o crescimento das CE depende do F-2CF (em inglês FGF-2) (FbCF, em inglês bFGF) no soro do vitelo e que o F-2CF necessita do heparano da superfície celular para a activação dos receptores (Yayon *et al.*, *Cell* 64:841-848, 1991). Sem se pretender estabelecer qualquer tipo de dependência de uma teoria da invenção, admite-se que a proteína BIPr₂₃ ligada ao heparano da superfície celular nas CE interfere com a activação das células por acção do F-2CF.

Foram efectuados estudos de ligação directa da proteína BIPr₂₃ sobre as CE colhendo as células que passaram 10 vezes, retiradas de um balão confluyente e recolocando as células tripsinizadas em suspensão em 12,5 mL de meio de cultura. Acrescentou-se 0,5 mL da suspensão a cada cavidade de uma placa convencional de cultura de tecidos de 24 cavidades e efectuou-se a incubação de um dia para o outro. Lavou-se a placa com albumina de soro de bovino a 0,1% em soluto salino tamponado com fosfato contendo cálcio e magnésio (Gibco). Após a lavagem acrescentou-se a cada cavidade 0,5 mL de ASB/STP. Experiências preliminares indicaram que a proteína BIPr₂₃ marcada com ^{125}I , na concentração de 50 ng/mL, acrescentada às cavidades, produziu uma resposta específica aproximadamente igual a 30 000 c.p.m. ao fim de um período de incubação de 3 horas a 4°C com lavagem três vezes em STP e lise com NaOH 1 M, por contagem da radiação γ do lisado.

Poder-se-ia ter desencadeado a competição pela ligação específica da proteína BIPr₂₃ “quente”, marcada com ¹²⁵I, na concentração de 50 ng/mL, às CE por adição de heparina na concentração de 20 µg/mL (Sigma, Grau I). Observou-se uma competição idêntica com a proteína BIPr₂₃ não marcada (“fria”), acrescentada à cultura de ligação. A combinação de proteína BIPr₂₃ não marcada e heparina (acrescentada simultaneamente ou previamente misturada antes da adição) não foi capaz de reduzir a ligação para valores abaixo da competição apenas com heparina (figura 13). Estes dados indicam que a proteína BIPr₂₃ se liga às células endoteliais através de uma molécula semelhante à heparina e que parece que esta ligação interfere com a proliferação das células endoteliais (CE), em presença de factor de crescimento de ligação à heparina (F2-CF).

Exemplo 13

PREPARAÇÃO DOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS PENTADECAMÉRICOS (15-MÉRICOS) DA PROTEÍNA BIP

Para se avaliar as propriedades biológicas de produtos do fragmento peptídico da proteína BIP, efectuou-se a preparação de péptidos sintéticos de aminoácidos pentadecaméricos (15-méricos), com base no fragmento do terminal amino de 23 kDa da proteína BIP e avaliou-se a sua actividade de ligação à heparina, a sua actividade num ensaio de inibição de lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) e a sua actividade bactericida. Dito de forma concreta, efectuou-se a preparação de 47 péptidos sintéticos, cada um deles constituído por 15 aminoácidos e sobrepondo-se aos péptidos adjacentes em 11 aminoácidos, sendo essa preparação feita em duplicado, com base na sequência da proteína BIPr₂₃ descrita *supra*.

Os péptidos foram sintetizados simultaneamente, em conformidade com os métodos de Maeji *et al.*, *Immunol. Methods*, 134:23-33 (1990) e Gammon *et al.*, *J. Exp. Med.*, 173:609-617

258

(1991), utilizando a tecnologia em fase sólida da empresa 'Cambridge Research Biochemicals Ltd.', sob licença da empresa 'Coselco Mimotopes Pty Ltd.'. Dito de forma abreviada, dividiu-se a sequência da proteína BIP₂₃ (1-199) em 47 péptidos pentadecaméricos diferentes, progredindo ao longo da sequência linear da BIP₂₃ e iniciando um péptido subsequente em cada 15 aminoácidos. Esta tecnologia da síntese de péptidos permite a síntese simultânea, em pequena escala, de vários péptidos sobre pinos separados num modelo em placa de 96 cavidades. Assim sendo, foram utilizados 94 pinos individuais para esta síntese e os pinos restantes (B, B) foram submetidos aos mesmos passos dos outros pinos, mas sem a adição de Fmoc-aminoácidos activados. Na clivagem final dos péptidos pentadecaméricos, para fora do suporte de pinos em fase sólida, utilizou-se um tampão alcalino aquoso (carbonato de sódio, pH 8,3). A ligação única ao pino experimenta uma ciclização quantitativa da dicetopiperazina nessas condições, daí resultando um péptido clivado com um radical ciclo(lisilprolilo) no terminal carboxilo de cada péptido. Os terminais amino não foram acilados, pelo que o grupo amino livre pode ter contribuído potencialmente para as reacções aniónicas de ligação. De cada cavidade recuperou-se em média cerca de 15 µg de cada péptido pentadecamérico.

Exemplo 14

LIGAÇÃO DA HEPARINA PELOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS PENTADECAMÉRICOS DA PROTEÍNA BIP

Submeteu-se os péptidos sintéticos do produto de proteína BIP, descritos *supra*, a um ensaio de ligação da heparina, em conformidade com os métodos descritos no exemplo 1. Os resultados, tal como se ilustra na figura 14, indicam a existência de 3 domínios funcionais independentes com actividade de ligação à heparina; o primeiro deles prolonga-se sensivelmente entre os aminoácidos 21 e 55; o segundo prolonga-se sensivelmente entre os aminoácidos 65 e

107; e o terceiro prolonga-se sensivelmente entre os aminoácidos 137 e 171. O material dos pinos virgens de contraprova não teve nenhuns efeitos de ligação à heparina.

Exemplo 15

EFEITO DOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS PENTADECAMÉRICOS DA PROTEÍNA BIP NUM ENSAIO COM LAL

Submeteu-se os péptidos sintéticos do produto de proteína BIP a um ensaio de inibição do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) para se determinar as propriedades de ligação aos LPS. Dito de forma concreta, misturou-se os péptidos sintéticos da proteína BIP, em tubos de Eppendorf, com uma concentração fixa de LPS de *E. coli* 0113 (4 ng/mL, concentração final) e fez-se a incubação a 37°C durante 3 horas com agitação ocasional. Testou-se também as contraprovas adicionadas na concentração de 0,05 µg/mL. A seguir à incubação, acrescentou-se a cada tubo 350 µL de D-STP (em inglês (D-PBS) para se obter uma concentração de LPS igual a 200 pg/mL para o ensaio de LAL. Transferiu-se cada amostra para tiras de 'Immulon II' (Dynaetch, Chantilly, VA) em volumes de 50 µL por cavidade.

Juntou-se a cada cavidade 50 µL de Lisado de Amebócitos de *Limulus* (estojo de LAL cromogénico quantitativo, Whitaker Bioproducts, Inc., Walkersville, MD) e manteve-se as cavidades a incubar à temperatura ambiente durante 25 minutos. Depois juntou-se então o substrato cromogénico à razão de 100 µL por cavidade e misturou-se bem. Após uma incubação durante 20 a 30 minutos à temperatura ambiente, interrompeu-se a reacção por adição de 100 µL de ácido acético a 25%. Mediu-se então a densidade óptica a 405 nm num leitor multiplacas (Vmax, Molecular Dynamics, Menlo Park, CA), estando os resultados apresentados na figura 15 em termos de percentagem da inibição dos LPS. Os dados da figura 15 indicam

que há pelo menos três domínios principais com inibição significativa do LAL; o primeiro constituído pelos aminoácidos 17 a 55; o segundo é constituído sensivelmente pelos aminoácidos 73 a 99 e o terceiro é constituído sensivelmente pelos aminoácidos 137 a 163. Há outros péptidos individuais que também inibem o LAL. Pelo contrário, o material dos pinos virgens de contraprova não manifestou nenhum efeito neutralizador dos LPS, tal como medido pelo ensaio de LAL.

Exemplo 16

EFEITOS BACTERICIDAS DOS PÉPTIDOS SINTÉTICOS PENTADECAMÉRICOS DA PROTEÍNA BIP

Testou-se os péptidos sintéticos do produto de proteína BIP para se pesquisar os seus efeitos bactericidas contra a bactéria irregular mutante da estirpe J5 de *E. coli* num ensaio de difusão radial. Dito de forma concreta, preparou-se uma cultura de estirpe J5 de *E. coli* de um dia para o outro e diluiu-se a 1:50 em caldo de soja tripsínica recente e manteve-se a incubar durante 3 horas a 37°C até ser atingida a fase logarítmica. As bactérias foram então reunidas por centrifugação a 3000 r.p.m. durante 5 minutos num aparelho 'Sorvall RT6000B'. Acrescentou-se 5 mL de tampão de fosfato de sódio 10 mM (pH 7,4) e centrifugou-se novamente a preparação. Decantou-se o sobrenadante e acrescentou-se 5 mL de tampão recente, preparou-se nova suspensão com as bactérias e determinou-se a sua concentração medindo a absorvência a 590 nm. A absorvência de $1,25 \times 10^9$ UFC/mL de suspensão era igual a 1,00. Diluiu-se as bactérias para 4×10^6 UFC/mL em 10 mL de gelose fundida da subcamada (aproximadamente 45°C) e inverteu-se a posição repetidas vezes para efectuar a mistura dentro de tubos de polipropileno de 15 mL utilizados para este fim.

Verteu-se a totalidade do conteúdo de cada tubo dentro de um prato de Petri quadrado, perfeitamente nivelado, e distribuiu-se uniformemente sacudindo o prato de lado a lado. A gelose endureceu em menos de 30 segundos e ficou com uma espessura uniforme de cerca de 1 mm. Depois perfurou-se um conjunto de cavidades através da gelose endurecida, utilizando para tal um punção estéril de 3 mm acoplado a um aspirador. O punção foi esterilizado com álcool puro (100%) e deixou-se secar ao ar.

Com uma pipeta introduziu-se cuidadosamente em cada cavidade 10 μ L dos péptidos sintéticos BIP. Como contraprovas, acrescentou-se tampão a pH 8,3 a uma cavidade independente (como contraprovas positivas acrescentou-se também proteína BIPr₂₃ nas concentrações de 5 μ g/mL e 1 μ g/mL). Além disso, testou-se como contraprovas os produtos dos pinos virgens B e B. Deixou-se a placa a incubar a 37°C durante 3 horas e depois juntou-se 10 mL de gelose fundida da sobrecamada (à temperatura aproximada de 45°C) ao prato de Petri nivelado, deixou-se endurecer e manteve-se a incubar de um dia para o outro a 37°C. Observou-se uma zona límpida contrastando com a zona ocupada pelas bactérias nas cavidades que possuíam actividade bactericida. Para se ver melhor esta zona, verteu-se sobre a gelose uma solução diluída de corante de Coomassie (azul brilhante de Coomassie a 0,002%, metanol a 27%, formaldeído a 15% (solução-mãe a 37%) e depois deixou-se contrastar durante 24 horas. As zonas bacterianas foram medidas com um micrómetro 'Mitutoyo'.

Os resultados da experiência estão ilustrados na figura 16 em que o único péptido sintético BIP com actividade bactericida foi um fragmento correspondente aos aminoácidos 85-99. As contraprovas positivas de proteína BIPr₂₃ também tiveram efeitos bactericidas, mas as contraprovas dos pinos virgens e do tampão não tiveram.

Exemplo 17

PREPARAÇÃO DE FRAGMENTOS DE PÉPTIDOS BIP

Com base nos resultados dos testes de péptidos sobrepostos nos exemplos 13 a 16, preparou-se fragmentos de péptidos de produto de proteína BIP por síntese de péptidos em fase sólida, em conformidade com os métodos de Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149 (1963) e Merrifield *et al.*, *Anal. Chem.* 38: 1905-1914 (1966), utilizando para tal um sintetizador de modelo 432 da 'Applied Biosystems Inc.'. Foram preparados 9 péptidos do produto de proteína BIP, designados por BIP-2 até BIP-10, a que correspondem as sequências de aminoácidos de parcelas de resíduos aminoácidos 1-199 da proteína BIP₂₃, conforme consta do quadro 3 subsequente. No caso dos péptidos BIP-7, BIP-9 e BIP-10, estes representavam repetições de sequência, parciais ou mesmo múltiplas. Dito de forma concreta, o péptido BIP-7 compreende um icosâmero (20-mero) constituído pelos resíduos aminoácidos 90-99 repetidos duas vezes numa única cadeia linear. O péptido BIP-10 compreende um tricontâmero (30-mero) constituído pelos resíduos aminoácidos 90-99 repetidos três vezes numa única cadeia linear. O péptido BIP-9 compreende um hexadecâmero (16-mero) constituído pelos resíduos aminoácidos 94-99 seguidos pelos resíduos 90-99 numa única cadeia linear.

QUADRO 3

Péptidos do produto de proteína BIP

Poli-peptido nº	Região dos aminoácidos	Resíduos aminoácidos	PM (daltons)
BIP-2	85-99	15	1828,16
BIP-3	73-99	27	3072,77
BIP-4	25-46	22	2696,51
BIP-5	142-163	22	2621,52
BIP-6	112-127	16	1569,82

QUADRO 3 (cont.)

Péptidos do produto de proteína BIP

Poli-peptido nº	Região dos aminoácidos	Resíduos aminoácidos	PM (daltons)
BIP-7	90-99, 90-99	20	2644,66
BIP-8	90-99	10	1316,8
BIP-9	94-99, 90-99	16	2131,34
BIP-10	90-99, 90-99, 90-99	30	3958,45

Exemplo 18

LIGAÇÃO DA HEPARINA PELOS PÉPTIDOS DO PRODUTO DE PROTEÍNA BIP

Neste exemplo submeteu-se os péptidos BIP-2, BIP-3, BIP-4, BIP-6, BIP-7 e BIP-8, conjuntamente com BIP-cis, do produto de proteína BIP, a um ensaio de ligação da heparina em conformidade com os métodos descritos no exemplo 1. Os resultados, conforme ilustrado na figura 17, indicam que os péptidos BIP-7 e BIP-8 possuem uma capacidade de ligação à heparina extremamente elevada, ao passo que os péptidos BIP-2 e BIP-3 possuem uma capacidade de ligação à heparina mais moderada e os péptidos BIP-4 e BIP-6 possuem fraca ou nenhuma capacidade de ligação à heparina.

Exemplo 19NEUTRALIZAÇÃO DA HEPARINA PELOS PÉPTIDOS DOS PRODUTOS DE
PROTEÍNA BIP

Neste exemplo submeteu-se os péptidos dos produtos de proteína BIP, designados por BIP-2, BIP-3, BIP-4, BIP-5, BIP-6, BIP-7 e BIP-8, conjuntamente com a proteína BIP₂₃, a um ensaio para se determinar os seus efeitos sobre a inactivação da trombina por acção dos complexos de ATIII/heparina, em conformidade com o método do exemplo 3. Para se determinar

os seus efeitos, foram administradas concentrações variáveis dos produtos de proteína BIP, variando entre 1,0 µg/mL e 100 µg/mL. Os péptidos de proteínas BIP, designados por BIP-7, BIP-3 e BIP-5, revelaram os efeitos mais significativos de neutralização da heparina, conforme ilustrado nas figuras 18a e 18b, as quais traduzem as concentrações das amostras apresentadas respectivamente em termos de concentrações em peso ou molares.

Exemplo 20

EFEITO DOS PÉPTIDOS DOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP NUM ENSAIO COM LAL

Neste exemplo submeteu-se os péptidos dos produtos de proteína BIP, designados por BIP-2, BIP-3, BIP-4, BIP-6, BIP-7 e BIP-8, conjuntamente com a proteína BIP₂₃, a um ensaio com LAL, em conformidade com o método do exemplo 15, para se determinar as suas propriedades de ligação e de inibição dos LPS. Os resultados demonstram que os péptidos BIP-7 e BIP-3 possuem propriedades significativas de inibição dos LPS, demonstram que os péptidos BIP-2 e BIP-8 possuem propriedades moderadas de inibição dos LPS e que os péptidos BIP-4 e BIP-6 não têm actividade significativa de inibição dos LPS, conforme traduzido nas figuras 19a e 19b que correspondem às concentrações das amostras calculadas respectivamente como concentrações em peso ou molares.

Exemplo 21

ENSAIO BACTERICIDA COM OS PÉPTIDOS DOS PRODUTOS DE PROTEÍNA BIP

Neste exemplo testou-se os péptidos dos produtos de proteína BIP, designados por BIP-2, BIP-3, BIP-4, BIP-5, BIP-6, BIP-7, BIP-8, BIP-9 e BIP-10, conjuntamente com a proteína BIP₂₃, para se pesquisar os seus efeitos bactericidas contra a estirpe mutante J5 de *E. coli*

(irregular) e contra a estirpe 011:B4 de *E. coli* (lisa) num ensaio de difusão radial, em conformidade com os métodos do exemplo 16. Os resultados traduzidos nas figuras 20a-20d comprovam que cada um dos péptidos BIP-2, BIP-3, BIP-5, BIP-7, BIP-8, BIP-9 e BIP-10, revela possuir um maior ou menor grau de actividade bactericida, ao passo que os péptidos BIP-4 e BIP-6 não manifestaram nenhuma actividade bactericida. Qualquer dos péptidos bactericidas revelou uma tendência para ser mais eficaz contra a estirpe irregular do que contra a estirpe lisa de *E. coli*.

De acordo com outro aspecto deste exemplo, foram efectuados ensaios bacterianos em caldo de cultura para se determinar a actividade bactericida de determinados péptidos BIP. Dito de forma concreta, seleccionou-se quer a estirpe J5 (irregular) da bactéria *E. coli* quer a estirpe 0111:B4 (lisa) da bactéria *E. coli* a partir de colónias singulares criadas em placas de gelose e que foram utilizadas para inocular placas de cultura a que se acrescentou diluições sequenciais, à razão de 1:10, dos péptidos dos produtos de proteína BIP. As placas ficaram a incubar de um dia para o outro e foram lidas com um leitor de placas, segundo o protocolo de EISLE, para se determinar as unidades formadoras de colónias sobreviventes. Os resultados desta experiência estão traduzidos nas figuras 20e (*E. coli* J5) e 20f (*E. coli* 0111:B4) que mostram que os péptidos dos produtos de proteína BIP, designados por BIP-3, BIP-7, BIP-9 e BIP-10 possuem uma actividade antibacteriana significativa.

Os resultados destes ensaios bactericidas, conjuntamente com os ensaios com LAL e de ligação à heparina, indicam que há pequenos péptidos BIP sintéticos que possuem um ou vários efeitos bactericidas, de ligação à heparina e neutralizadores dos LPS, e que há pelo menos três domínios funcionais separados distintos no interior do fragmento do terminal amino de 23 kDa. Um domínio está situado entre os resíduos aminoácidos 17 e 45. Um segundo domínio, o

mais activo deles, caracterizado pelo facto de demonstrar acitividade na totalidade dos três ensaios, está situado entre os aminoácidos 71 e 99. Um péptido específico de resíduos 86-99 demonstrou possuir actividade na totalidade dos três ensaios. Há um terceiro domínio constituído pelos resíduos 142-169.

Exemplo 22

PREPARAÇÃO DOS PÉPTIDOS DO FRAGMENTO PROTEOLÍTICO BIP

Neste exemplo, foram aplicados processos de clivagem química e de digestão enzimática à proteína BIP₂₃, produzida em conformidade com os procedimentos de Gazzano-Santoro *et al.*, *supra*, para se criar fragmentos proteolíticos da proteína recombinante, com diversos tamanhos.

A proteína BIP₂₃ foi reduzida e alquilada antes da proteólise, por meio de brometo de cianogénio (CNBr) ou de endoproteinase Asp-N. Trocou-se um sal por outro na proteína por precipitação em acetona fria (1:1, v/v) à temperatura de 4°C de um dia para o outro e reuniu-se por centrifugação (5000 x g) durante 10 minutos. A massa obtida de proteína BIP₂₃ foi lavada duas vezes com acetona fria e depois secou-se sob uma corrente de azoto. A seguir reconstituiu-se a proteína BIP₂₃ à concentração de 1 mg/mL em ureia 8 M/Tris 0,1M a pH 8,1 e reduziu-se por adição de ditioneitol 3,4 mM (Calbiochem, San Diego, CA) durante 90 minutos a 37°C. Efectuou-se a alquilação por adição de iodoacetamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) até uma concentração final de 5,3 milimolar, durante 30 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Fez-se precipitar com acetona a proteína reduzida e alquilada, centrifugou-se e lavou-se conforme descrito antes e dissolveu-se novamente a massa obtida para digestão com CNBr ou com Asp-N.

Antes da adição de CNBr, a massa que havia sido lavada foi dissolvida em ácido tri-fluoroacético a 70% (ATF) (de qualidade para a sequenciação de proteínas, Sigma) até uma concentração final de proteínas igual a 5 mg/mL. Dissolveu-se brometo de cianogénio (Baker Analyzed Reagent, VWR Scientific, San Francisco, CA) em ATF a 70% e juntou-se-lhe esta solução para se obter uma razão final entre CNBr e proteína igual a 2:1 (p/p). Isto representa aproximadamente um excesso molar 75 vezes superior de CNBr relativamente aos resíduos metionina na proteína. Limpou-se a mistura de reacção com azoto e deixou-se a operação prosseguir durante 24 horas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Interrompeu-se a reacção por adição de 9 volumes de água destilada e a seguir congelou-se (-70°) e liofilizou-se.

A proteína BIPr₂₃, reduzida e alquilada, foi solubilizada, segundo uma concentração de 5,0 mg/mL, em ureia 8 M/Tris 0,1 M a pH 8,1. Adicionou-se um volume igual de Tris 0,1 M a pH 8,1 de modo a que as condições finais correspondessem a uma concentração da proteína igual a 2,5 mg/mL em ureia 5 M/Tris 0,1 M a pH 8,1. Acrescentou-se a endoproteínase Asp-N obtida a partir de *Pseudomonas fragi* (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), segundo uma proporção entre enzima:substrato igual a 1:1000 (p/p) e deixou-se a digestão prosseguir durante 6 horas a 37°C. Interrompeu-se a reacção por adição de ATF até uma concentração final de 0,1% e depois efectuou-se o fraccionamento das amostras por CLER de fase inversa.

As misturas de fragmentos obtidas com CNBr e Asp-N foram purificadas numa coluna de tipo 'Zorbax Proetin Plus C₃' (4,6 x 250 mm, tamanho dos poros igual a 300 Å, MACMOD Analytical Inc., Chadsford, PA). Trabalhou-se com um gradiente variável entre acetonitrilo a 5% em ATF a 0,1% até acetonitrilo a 80% em ATF a 0,1% durante 2 horas, com um caudal de 1,0 mL/minuto. A eluição dos fragmentos foi monitorizada a 220 nm, utilizando para tal uma CLER de tipo 'Beckman System Gold'. O compartimento de aquecimento

da coluna foi mantido a 35°C e as fracções foram recolhidas manualmente, congeladas para -70°C e secas num concentrador de modelo 'Speed Vac'. Os fragmentos foram então solubilizados em acetato de sódio 20 mM a pH 4,0/NaCl 0,5 M antes de serem utilizados.

Efectuou-se uma espectrometria de massa por ionização por electropulverização num espectrómetro de massa de modelo 'VG Bio-Q', tendo este trabalho sido realizado pelo Dr. Francis Bitsch e pelo Sr. John Kim no laboratório do Dr. Cecric Shackleton na instituição 'Children's Hospital-Oakland Research Institute'. As massas moleculares foram obtidas por transformação matemática dos resultados.

Embora a sequência de ADN da proteína BIPr₂₃ codifique os resíduos aminoácidos 1-199 da proteína perfeitamente desenvolvida (madura), há uma porção significativa da proteína produzida que é truncada em Leu-193 e Val-195, conforme determinado por espectrometria de massa por ionização por electropulverização (EM-IEP). Estes truncamentos no terminal C foram verificados isolando os péptidos tripsínicos do terminal C que foram sequenciados e analisados por EM-IEP. Há seis resíduos metionina, nas posições 56, 70, 100, 111, 170 e 196, e a clivagem química por acção do brometo de cianogénio produziu seis fragmentos peptídicos principais, conforme previsto. Os resultados das experiências de clivagem com CNBr estão resumidos no quadro 4. Os fragmentos foram isolados por CLER de fase inversa (em C₃) (figura 21a) e as suas sequências do terminal N foram determinadas pelo método de degradação de Edman. Os dois fragmentos maiores (C1 e C5) não foram resolvidos pela coluna de CLER em C₃ e foram infrutíferas as outras tentativas feitas para os resolver por cromatografia de permuta iónica, presumivelmente devido ao facto de serem semelhantes em comprimento e em ponto isoeléctrico. As identidades dos fragmentos C1 e C5 na mistura foram determinadas por EM-IEP. A massa prevista para C1 é de 6269 (quadro 4), tomando em consideração a

perda de 30 u.a.m como resultado da conversão da metionina do terminal C em homoserina durante a reacção de clivagem com CNBr. A massa observada de $6251,51 \pm 0,34$ é consistente com a perda de uma molécula de água (18 u.a.m.) no intermediário lactona da homoserina, que pode ser favorecido em relação à formação da homoserina devido à hidrofobicidade dos aminoácidos do terminal C do fragmento C1. A massa prevista do fragmento C5 é de 6487 e a massa observada é de $6385,84 \pm 0,39$ (quadro 1). No caso do fragmento C5, os aminoácidos do terminal C são hidrofílicos, pelo que a hidrólise do intermediário lactona da homoserina é provavelmente favorecida. A partir dos resultados da sequenciação do terminal N e dos resultados do espectro de massa, o componente C5 representa aproximadamente 10%-25% do material na mistura C1/C5.

Foi efectuada uma clivagem proteolítica com a endoproteinase Asp-N para se obter outros fragmentos para as regiões contidas na mistura C1/C5 obtida com CNBr. Há seis resíduos de ácido aspártico na sequência da proteína BIP₂₃ nas posições 15, 36, 39, 57, 105 e 116. Os seis fragmentos principais obtidos com Asp-N e isolados por CLER em C₃ (figura 21B) foram sequenciados e as suas massas foram determinadas por EM-IEP (quadro 4). Recorreu-se a uma digestão de curta duração para uma razão entre a enzima:substrato igual a 1:1000 (p/p) para se eliminar as clivagens potenciais não específicas, particularmente no ácido glutâmico. É evidente que esta digestão não prosseguiu até ficar completa, na medida em que foi isolado um fragmento (1-38) em que os resíduos Asp (aminoácidos 15 e 35) não foram clivados. Os espectros de massa dos fragmentos obtidos com Asp-N foram consistentes com as massas previstas para cada um dos fragmentos individualizados. Ao contrário da clivagem com CNBr, em que o fragmento do terminal C foi exiguamente reduzido, o fragmento obtido com Asp-N a partir do aminoácido 116 até ao terminal C foi bem resolvido a partir de todos os outros fragmentos obtidos com Asp-N.

258
47

QUADRO 4

RESUMO DA ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DA CLIVAGEM DA PROTEÍNA BIP_{r23}

Fragmentos obtidos por clivagem com CNBr

MÁXIMO (PICO)	SEQUÊNCIA	D.I.	MASSA	
			medida	prevista
I	101-110	C4 (101-111)	Não determinada	1169
II	57-67	C2 (57-70)	Não determinada	1651
III	71-99	C3 (71-100)	Não determinada	3404
IV	171-194	C6 (171-196)	Não determinada	2929
V	1-25, 112-124	C1 (1-56)	6251,51 ± 0,34	6299
		C5 (112-170)	6485,84 ± 0,39	6403

Fragmentos proteolíticos obtidos com Asp-N

MÁXIMO (PICO)	SEQUÊNCIA	D.I.	MASSA	
			medida	prevista
A	1-14	A1 (1-14)	1465,5	1464
I	39-56	A3 (39-56)	2145,2	2145
II	15-38	A2 (15-38)	2723,6	2724
III	57-76	A4 (57-104)	5442,5	5442
IV	1-38	A1 A2 (1-38)	4171,4	4172
VI	116-134	A6a (116-193)	8800,3	8800
VII	116-128	A6b (116-195)	8997,1	8996

Exemplo 23

EFEITOS BACTERICIDAS DOS FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS BIP

Efectuou-se uma pesquisa dos fragmentos proteolíticos BIP, obtidos em conformidade com o exemplo 22, para se pesquisar os seus efeitos bactericidas sobre a bactéria da estirpe J5 mutante irregular de *E. coli* num ensaio de difusão radial, essencialmente em conformidade

com os procedimentos do exemplo 16. Não foi demonstrada a existência de nenhuma actividade bactericida para os fragmentos de proteína BIP₂₃ gerados por digestão com CNBr ou com Asp-N, quando testados até ao valor de 25 pmol/cavidade. Nesta experiência, a actividade bactericida mensurável detectada foi muito pequena, da ordem de 0,75 pmol de proteína BIP₂₃ por cavidade. A proteína BIP₂₃ reduzida e alquilada (até 100 pmol/cavidade) também não revelou ser bactericida, ao passo que a proteína BIP₂₃ alquilada conservou a actividade bactericida equivalente à da proteína BIP₂₃.

Exemplo 24

LIGAÇÃO DA HEPARINA PELOS FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS BIP

Nesta experiência foram utilizados fragmentos proteolíticos de proteína BIP₂₃ e BIP, produzidos em conformidade com o exemplo 22, em ensaios de ligação da heparina, essencialmente em conformidade com os procedimentos do exemplo 1.

Avaliou-se a ligação à heparina, por parte dos fragmentos obtidos com CNBr, utilizando 100 pmol de cada fragmento por cavidade com uma concentração saturante de ³H-heparina (20 µg/mL). Os resultados obtidos estão ilustrados no quadro 5 (médias obtidas com cavidades em duplicado ± a variação entre os dois valores) e indicam que os fragmentos obtidos com CNBr, que contêm os aminoácidos 71-100 (C3) e 1-56 e 112-170 (C1,5), se ligam à heparina com uma intensidade idêntica. O fragmento dos aminoácidos 171-193, obtido com CNBr, também se liga mais à heparina do que uma proteína de contraprova, a taumatina, ou uma proteína ou um fragmento de carga e peso molecular idênticos se liga à proteína BIP₂₃.

Também se demonstrou que os fragmentos obtidos com a Asp-N possuem múltiplas regiões de ligação à heparina na proteína BIP₂₃. Conforme se observa no quadro 5, o fragmento

de aminoácidos 57-104, obtido com Asp-N, ligou-se à quantidade mais elevada de heparina, sendo seguido pelos fragmentos de aminoácidos 1-38 e 116-193. Estes dados, em combinação com os dados respeitantes ao fragmento obtido com CNBr, indicam que há pelo menos três regiões independentes de ligação à heparina na proteína BIPr₂₃, estando a capacidade mais elevada situada entre os resíduos 71-100.

QUADRO 5

Ligação à heparina por parte dos fragmentos de proteína BIPr₂₃

Fragmentos	Região	Ligação de ³ H-heparina (c.p.m.)
<u>Digestão com CNBr</u>		
C1, C5	1-56, 112-170	82 918 ± 4 462
C2	57-70	6 262 ± 182
C3	71-100	81 655 ± 3 163
C4	101-111	4 686 ± 4
C6	171-196	26 204 ± 844
<u>Digestão com Asp-N</u>		
A1	1-38	17 002 ± 479
A2	15-38	3 042 ± 162
A3	39-56	8 664 ± 128
A4	57-104	33 159 ± 1 095
A6a	116-193	13 419 ± 309
BIPr ₂₃	1-193	51 222 ± 1 808
Taumatina		7 432 ± 83
Tampão de lavagem		6 366 ± 46

Exemplo 25

EFEITO DOS FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS BIP NUM ENSAIO COM LAL

Foram utilizados fragmentos proteolíticos BIP, produzidos em conformidade com o exemplo 22, num ensaio de inibição do LAL, essencialmente conforme descrito no exemplo 15, estando os resultados obtidos ilustrados na figura 22 em que: o triângulo a cheio representa a proteína BIP₂₃; o círculo em branco representa o fragmento A3 obtido com Asp-N; o círculo a cheio representa o fragmento A2 obtido com Asp-N; o quadrado em branco representa o fragmento A3 obtido com Asp-N; o quadrado a cheio representa o fragmento A1A2 obtido com Asp-N; o triângulo em branco representa o fragmento A6b obtido com Asp-N; o triângulo pequeno em branco representa o fragmento C3 obtido com CNBr; e o quadrado pequeno a cheio representa o fragmento C1/C5 obtido com CNBr.

As frações obtidas por digestão com CNBr, que contêm os fragmentos de aminoácidos 1-56 e 112-170, inibiram a reacção do LAL induzida com os LPS, segundo um valor CI_{50} aproximadamente igual a 100 nM. O valor CI_{50} é aproximadamente 10 vezes superior ao valor CI_{50} observado com a proteína BIP₂₃ (9 nM) no mesmo ensaio. Os outros fragmentos obtidos por digestão com CNBr foram não inibitórios.

Foi observado um resultado ligeiramente diferente com os fragmentos gerados na digestão com Asp-N, em que se concluiu que os fragmentos eram inibitórios num ensaio com LAL. O fragmento correspondente aos aminoácidos 116-193 revelou uma actividade inibitória de LAL semelhante à da proteína BIP₂₃ intacta, com inibição completa da reacção de LAL induzida pelos LPS, para uma concentração 15 nM. Os fragmentos correspondentes aos aminoácidos 57-104 e 1-38 também foram inibitórios num ensaio de LAL, mas foram necessárias quantidades 10 vezes superiores. Estes resultados, em combinação com os resultados da digestão

com CNBr, indicam que há pelo menos três regiões da molécula BIPr₂₃ que têm capacidade para neutralizar a activação da reacção de LAL com os LPS, presumindo-se que a região mais potente esteja no interior do fragmento dos aminoácidos 116-193.

Em estudos congéneres sobre os fragmentos proteolíticos do exemplo 22, envolvendo protocolos de EISLE, utilizando um anticorpo anti-BIPr₂₃ policlonal de coelho, capaz de bloquear as propriedades bactericidas da molécula BIPr₂₃ e de inibição do LAL, e utilizando também dois anticorpos monoclonais diferentes anti-BIPr₂₃ de murganho, não bloqueantes, concluiu-se que o anticorpo policlonal era imunorreactivo com os fragmentos de aminoácidos 116-193 e 57-104 obtidos por digestão com Asp-N e também com os fragmentos de aminoácidos 1-56 e 112-170 obtidos por digestão com CNBr, ao passo que os anticorpos monoclonais dos murinos reagiram apenas com um fragmento obtido com Asp-N, representando os resíduos 1-14 da molécula BIPr₂₃.

Acima de tudo, os resultados indicam que a proteína BIPr₂₃ contém três domínios funcionais que contribuem para a actividade biológica total da molécula. Presume-se que o primeiro domínio apareça na sequência de aminoácidos 17-45 e que seja destruído pela clivagem com Asp-N no resíduo 36. Este domínio é moderadamente activo tanto no ensaio de inibição da actividade de LAL induzida pelos LPS como no ensaio de ligação à heparina. Presume-se que o segundo domínio activo seja a região dos aminoácidos 56-99 e que a sua inibição da actividade de LAL induzida pelos LPS é diminuída por clivagem com CNBr no resíduo 70. Este domínio também revela a mais elevada capacidade de ligação à heparina e contém o péptido bactericida de resíduos 85-99. O terceiro domínio activo, entre os aminoácidos 142-169, é activo para inibir a estimulação dos LAL induzida pelos LPS e revela a mais baixa capacidade de ligação à heparina observada nas três regiões.

Há outras proteínas bactericidas, por exemplo, as cecropinas e as magaininas, que são caracterizadas por uma região contínua, anfipática em hélice α , região essa que é necessária para que haja actividade. Foi observado um elevado grau de afinidade entre o motivo hidrofóbico catiónico das moléculas bactericidas de ligação aos LPS e as sequências de consenso das proteínas de ligação à heparina. Há uma correlação excelente entre os péptidos BIP₂₃ sintéticos que se ligam à heparina e aqueles que inibem a reacção dos LAL induzida pelos LPS ($r = 0,75$, $p = 0,0001$, $n = 47$) (figuras 14 a 16). Estes dados sugerem que os LPS e a heparina podem apresentar, às proteínas com que interactivam, distribuições de carga semelhantes. Em consequência, outras proteínas, que se ligam avidamente aos LPS, também podem ligar-se fortemente à heparina.

Há inúmeras modificações e variantes na prática da invenção que se presume que possam ocorrer aos especialistas na matéria, tendo em consideração as suas variantes presentemente preferidas. Em consequência, as únicas limitações a observar no âmbito da presente invenção são as que constam das reivindicações anexas.

258
53

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: XOMA CORPORATION

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: "Utilizações terapêuticas de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade"

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 2

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇO: Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray & Borun

(B) RUA: 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive

(C) CIDADE: Chicago

(D) ESTADO: Illinois

(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL: 60606-6402

(v) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

(A) SUPORTE: disquete

(B) COMPUTADOR: CP compatível com IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25

(vi) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO:

(B) DATA DE DEPÓSITO:

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O REPRESENTANTE/AGENTE:

(A) NOME: Sharp, Jeffrey S.

(B) NÚMERO DO PEDIDO: 31 879

(C) REFERÊNCIA/NÚMERO DO PROCESSO: 31580

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: 312/474-6300

(B) TELEFAX: 312/474-0448

(C) TELEX: 25-3856

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1813 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CORDÃO: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 31..1491

(ix) PARTICULARIDADE:

(A) NOME/CÓDIGO: mat_péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 124..1491

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

CAGGCCTTGA GGTTTTGGCA GCTCTGGAGG								ATG Met -31	AGA Arg -30	GAG Glu	AAC Asn	ATG Met	GCC Ala	AGG Arg -25	GGC Glu	54
CCT Pro	TGC Cis	AAC Asn	GCG Ala -20	CCG Pro	AGA Arg	TGG Trp	GTC Val	TCC Ser -15	CTG Leu	ATG Met	GTC Val	CTC Leu	GTC Val -10	GCC Ala	ATA Ile	102
GGC Glu	ACC Thr	GCC Ala -5	GTC Val	ACA Thr	GCG Ala	GCC Ala	GTC Val 1	AAC Asn	CCT Pro	GGC Glu	GTC Val	GTC Val 5	GTC Val	AGG Arg	ATC Ile	150
TCC Ser 10	CAG Gln	AAG Lis	GCG Glu	CTG Leu	GAC Asp 15	TAC Tir	GCC Ala	AGC Ser	CAG Gln	CAG Gln 20	GGG Glu	ACG Thr	GCC Ala	GCT Ala	CTG Leu 25	198
CAG Gln	AAG Lis	GAG Glu	CTG Leu	AAG Lis 30	AGG Arg	ATC Ile	AAG Lis	ATT Ile	CCT Pro 35	GAC Asp	TAC Tir	TCA Ser	GAC Asp	AGC Ser 40	TTT Phe	246

AAG Lis	ATC Ile	AAG Lis	CAT His 45	CTT Leu	GGG Gli	AAG Lis	GGG Gli	CAT His 50	TAT Tir	AGC Ser	TTC Phe	TAC Tir	AGC Ser 55	ATG Met	GAC Asp	294
ATC Ile	CGT Arg	GAA Glu 60	TTC Phe	CAG Gln	CTT Leu	CCC Pro	AGT Ser 65	TCC Ser	CAG Gln	ATA Ile	AGC Ser	ATG Met 70	GTC Val	CCC Pro	AAT Asn	342
GTC Val	GGC Gli 75	CTT Leu	AAG Lis	TTC Phe	TCC Ser	ATC Ile 80	AGC Ser	AAC Asn	GCC Ala	AAT Asn	ATC Ile 85	AAG Lis	ATC Ile	AGC Ser	GGG Gli	390
AAA Lis 90	TGG Tir	AAG Lis	GCA Ala	CAA Gln	AAG Lis 95	AGA Arg	TTC Phe	TTA Leu	AAA Lis	ATG Met 100	AGC Ser	GGC Gli	AAT Asn	TTT Phe	GAC Asp 105	438
CTG Leu	AGC Ser	ATA Ile	GAA Glu	GGC Gli 110	ATG Met	TCC Ser	ATT Ile	TCG Ser	GCT Ala 115	GAT Asp	CTG Leu	AAG Lis	CTG Leu	GGC Gli 120	AGT Ser	486
AAC Asn	CCC Pro	ACG Thr	TCA Ser 125	GGC Gli	AAG Lis	CCC Pro	ACC Thr	ATC Ile 130	ACC Thr	TGC Cis	TCC Ser	AGC Ser	TGC Cis 135	AGC Ser	AGC Ser	534
CAC His	ATC Ile	AAC Asn 140	AGT Ser	GTC Val	CAC His	GTC Val	CAC His 145	ATC Ile	TCA Ser	AAG Lis	AGC Ser	AAA Lis 150	GTC Val	GGG Gli	TGG Tir	582
CTG Leu	ATC Ile 155	CAA Gln	CTC Leu	TTC Phe	CAC His	AAA Lis 160	AAA Lis	ATT Ile	GAG Glu	TCT Ser	GCG Ala 165	CTT Leu	CGA Arg	AAC Asn	AAG Lis	630
ATG Met 170	AAC Asn	AGC Ser	CAG Gln	GTC Val	TGC Cis 175	GAG Glu	AAA Lis	GTC Val	ACC Thr	AAT Asn 180	TCT Ser	GTA Val	TCC Ser	TCC Ser	AAG Lis 185	678
CTG Leu	CAA Gln	CCT Pro	TAT Tir	TTC Phe 190	CAG Gln	ACT Thr	CTG Leu	CCA Pro	GTA Val 195	ATG Met	ACC Thr	AAA Lis	ATA Ile	GAT Asp 200	TCT Ser	726
GTC Val	GCT Ala	GGA Gli	ATC Ile 205	AAC Asn	TAT Tir	GGT Gli	CTG Leu	GTC Val 210	GCA Ala	CCT Pro	CCA Pro	GCA Ala	ACC Thr 215	ACG Thr	GCT Ala	774
GAG Glu	ACC Thr	CTG Leu 220	GAT Asp	GTA Val	CAG Gln	ATG Met	AAG Lis 225	GGG Gli	GAG Glu	TTT Phe	TAC Tir	AGT Ser 230	GAG Glu	AAC Asn	CAC His	822
CAC His	AAT Asn 235	CCA Pro	CCT Pro	CCC Pro	TTT Phe	GCT Ala 240	CCA Pro	CCA Pro	GTC Val	ATG Met	GAG Glu 245	TTT Phe	CCC Pro	GCT Ala	GCC Ala	870
CAT His 250	GAC Asp	CGC Arg	ATG Met	GTA Val	TAC Tir 255	CTG Leu	GGC Gli	CTC Leu	TCA Ser	GAC Asp 260	TAC Tir	TTC Phe	TTC Phe	AAC Asn	ACA Thr 265	918

GCC Ala	GGG Gln	CTT Leu	GTA Val	TAC Tyr 270	CAA Gln	GAG Glu	GCT Ala	GGG Gln	GTC Val 275	TTC Leu	AAG Lys	ATG Met	ACC Thr	CTT Leu 280	AGA Arg	966
GAT Asp	GAC Asp	ATG Met	ATT Ile 285	CCA Pro	AAG Lys	GAG Glu	TCC Ser	AAA Lys 290	TTT Phe	CGA Arg	CTG Leu	ACA Thr	ACC Thr 295	AAG Lys	TTC Phe	1014
TTT Phe	GGA Gln	ACC Thr 300	TTC Phe	CTA Leu	CCT Pro	GAG Glu	GTG Val 305	GCC Ala	AAG Lys	AAG Lys	TTT Phe	CCC Pro 310	AAC Asn	ATG Met	AAG Lys	1062
ATA Ile	CAG Gln 315	ATC Ile	CAT His	GTC Val	TCA Ser	GCC Ala 320	TCC Ser	ACC Thr	CCG Pro	CCA Pro	CAC His 325	CTG Leu	TCT Ser	GTG Val	CAG Gln	1110
CCC Pro 330	ACC Thr	GGC Gln	CTT Leu	ACC Thr	TTC Phe 335	TAC Tyr	CCT Pro	GCC Ala	GTG Val	GAT Asp 340	GTC Val	CAG Gln	GCC Ala	TTT Phe	GCC Ala 345	1158
GTC Val	CTC Leu	CCC Pro	AAC Asn 350	TCC Ser	TCC Ser	CTG Leu	GCT Ala	TCC Ser	CTC Leu 355	TTC Phe	CTG Leu	ATT Ile	GGC Gln	ATG Met 360	CAC His	1206
ACA Thr	ACT Thr	GGT Gln 365	TCC Ser	ATG Met	GAG Glu	GTC Val	AGC Ser	GCC Ala 370	GAG Glu	TCC Ser	AAC Asn	AGG Arg	CTT Leu 375	GTT Val	GGA Gln	1254
GAG Glu	CTC Leu	AAG Lys 380	CTG Leu	GAT Asp	AGG Arg	CTG Leu	CTC Leu 385	CTG Leu	GAA Glu	CTG Leu	AAG Lys	CAC His 390	TCA Ser	AAT Asn	ATT Ile	1302
GGC Gln 395	CCC Pro	TTC Phe	CCG Pro	GTT Val	GAA Glu	TTG Leu 400	CTG Leu	CAG Gln	GAT Asp	ATC Ile	ATG Met 405	AAC Asn	TAC Tyr	ATT Ile	GTA Val	1350
CCC Pro 410	ATT Ile	CTT Leu	GTG Val	CTG Leu	CCC Pro 415	AGG Arg	GTT Val	AAC Asn	GAG Glu	AAA Lys 420	CTA Leu	CAG Gln	AAA Lys	GGC Gln	TTC Phe 425	1398
CCT Pro	CTC Leu	CCG Pro	ACG Thr 430	CCG Pro	GCC Ala	AGA Arg	GTC Val	CAG Gln	CTC Leu 435	TAC Tyr	AAC Asn	GTA Val	GTG Val	CTT Leu 440	CAG Gln	1446
CCT Pro	CAC His	CAG Gln	AAC Asn 445	TTC Phe	CTG Leu	CTG Leu	TTC Phe	GGT Gln 450	GCA Ala	GAC Asp	GTT Val	GTC Val	TAT Tyr 455	AAA Lys		1491
TGAAGGCACC AGGGGTGCCG GGGGCTGTCA GCCGCACCTG TTCCTGATGG GCTGTGGGGC																1551
ACCGGCTGCC TTTCCCAGG GAATCCTCTC CAGATCTTAA CCAAGAGCCC CTTGCAAAC																1611
TCTTCGACTC AGATTCAGAA ATGATCTAAA CACGAGGAAA CATTATTCAT TGGAAAAGTG																1671
CATGGTGTGT ATTTTAGGGA TTATGAGCTT CTTTCAAGGG CTAAGGCTGC AGAGATATTT																1731
CCTCCAGGAA TCGTGTTTCA ATTGTAACCA AGAAATTTCC ATTTGTGCTT CATGAAAAAA																1791
AACTTCTGGT TTTTTCATG TG																1813

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 487 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

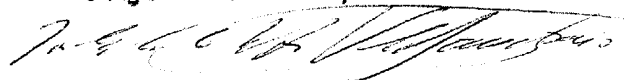
(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

Met -31	Arg -30	Glu	Asn	Met	Ala	Arg -25	Gli	Pro	Cis	Asn	Ala -20	Pro	Arg	Trp	Val
Ser -15	Leu	Met	Val	Leu	Val -10	Ala	Ile	Gli	Thr	Ala -5	Val	Thr	Ala	Ala	Val 1
Asn	Pro	Gli	Val	Val 5	Val	Arg	Ile	Ser 10	Gln	Lis	Gli	Leu	Asp 15	Tir	Ala
Ser	Gln	Gln 20	Gli	Thr	Ala	Ala	Leu 25	Gln	Lis	Glu	Leu	Lis 30	Arg	Ile	Lis
Ile	Pro 35	Asp	Tir	Ser	Asp	Ser 40	Phe	Lis	Ile	Lis	His 45	Leu	Gli	Lis	Gli
His 50	Tir	Ser	Phe	Tir	Ser 55	Met	Asp	Ile	Arg	Glu 60	Phe	Gln	Leu	Pro	Ser 65
Ser	Gln	Ile	Ser	Met 70	Val	Pro	Asn	Val	Gli 75	Leu	Lis	Phe	Ser	Ile 80	Ser
Asn	Ala	Asn	Ile 85	Lis	Ile	Ser	Gli	Lis 90	Trp	Lis	Ala	Gln	Lis 95	Arg	Phe
Leu	Lis	Met 100	Ser	Gli	Asn	Phe	Asp 105	Leu	Ser	Ile	Glu	Gli 110	Met	Ser	Ile
Ser	Ala 115	Asp	Leu	Lis	Leu	Gli 120	Ser	Asn	Pro	Thr	Ser 125	Gli	Lis	Pro	Thr
Ile 130	Thr	Cis	Ser	Ser	Cis 135	Ser	Ser	His	Ile	Asn 140	Ser	Val	His	Val	His 145
Ile	Ser	Lis	Ser	Lis 150	Val	Gli	Trp	Leu	Ile 155	Gln	Leu	Phe	His	Lis 160	Lis
Ile	Glu	Ser	Ala 165	Leu	Arg	Asn	Lis	Met 170	Asn	Ser	Gln	Val	Cis 175	Glu	Lis
Val	Thr	Asn 180	Ser	Val	Ser	Ser	Lis 185	Leu	Gln	Pro	Tir	Phe 190	Gln	Thr	Leu

Pro	Val	Met	Thr	Lis	Ile	Asp	Ser	Val	Ala	Gli	Ile	Asn	Tir	Gli	Leu
	195					200					205				
Val	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Thr	Ala	Glu	Thr	Leu	Asp	Val	Gln	Met	Lis
210					215					220					225
Gli	Glu	Phe	Tir	Ser	Glu	Asn	His	His	Asn	Pro	Pro	Pro	Phe	Ala	Pro
				230					235					240	
Pro	Val	Met	Glu	Phe	Pro	Ala	Ala	His	Asp	Arg	Met	Val	Tir	Leu	Gli
			245					250					255		
Leu	Ser	Asp	Tir	Phe	Phe	Asn	Thr	Ala	Gli	Leu	Val	Tir	Gln	Glu	Ala
		260					265					270			
Gli	Val	Leu	Lis	Met	Thr	Leu	Arg	Asp	Asp	Met	Ile	Pro	Lis	Glu	Ser
	275					280					285				
Lis	Phe	Arg	Leu	Thr	Thr	Lis	Phe	Phe	Gli	Thr	Phe	Leu	Pro	Glu	Val
290					295					300					305
Ala	Lis	Lis	Phe	Pro	Asn	Met	Lis	Ile	Gln	Ile	His	Val	Ser	Ala	Ser
				310					315					320	
Thr	Pro	Pro	His	Leu	Ser	Val	Gln	Pro	Thr	Gli	Leu	Thr	Phe	Tir	Pro
			325					330					335		
Ala	Val	Asp	Val	Gln	Ala	Phe	Ala	Val	Leu	Pro	Asn	Ser	Ser	Leu	Ala
		340					345					350			
Ser	Leu	Phe	Leu	Ile	Gli	Met	His	Thr	Thr	Gli	Ser	Met	Glu	Val	Ser
	355					360					365				
Ala	Glu	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Gli	Glu	Leu	Lis	Leu	Asp	Arg	Leu	Leu
370					375					380					385
Leu	Glu	Leu	Lis	His	Ser	Asn	Ile	Gli	Pro	Phe	Pro	Val	Glu	Leu	Leu
				390					395					400	
Gln	Asp	Ile	Met	Asn	Tir	Ile	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Leu	Pro	Arg	Val
			405					410					415		
Asn	Glu	Lis	Leu	Gln	Lis	Gli	Phe	Pro	Leu	Pro	Thr	Pro	Ala	Arg	Val
		420					425					430			
Gln	Leu	Tir	Asn	Val	Val	Leu	Gln	Pro	His	Gln	Asn	Phe	Leu	Leu	Phe
	435					440					445				
Gli	Ala	Asp	Val	Val	Tir	Lis									
450					455										

Lisboa, 14 de Setembro de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1269-063 LISBOA

258
4

Reivindicações

1. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para se ligar à heparina terapêuticamente administrada a um paciente.
2. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para neutralizar o efeito anticoagulante da heparina.
3. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para inibir a angiogénese.
4. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para inibir a angiogénese associada à retinopatia ocular.
5. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para inibir a proliferação das células endoteliais.
6. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para tratar a endometriose mediante a inibição da proliferação das células endoteliais.

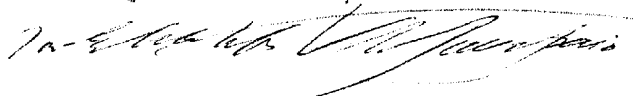
288

7. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para inibir a proliferação de células de tumores malignos.
8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o tumor maligno é o sarcoma de Kaposi.
9. Utilização de um produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) para a preparação de um medicamento de ligação à heparina para tratar uma doença inflamatória crónica.
10. Utilização de acordo com a reivindicação 9, em que a doença inflamatória crónica é a artrite.
11. Utilização de acordo com a reivindicação 10, em que a doença inflamatória artrítica é a artrite reumatóide.
12. Utilização de acordo com a reivindicação 10, em que a doença inflamatória artrítica é a artrite reactiva.
13. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o produto proteínico é um fragmento biologicamente activo da proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP).

14. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12, em que o produto proteínico é um análogo biologicamente activo da proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP).
15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o análogo da proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) é um fragmento de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) em que um resíduo cisteína na posição 132 é substituído por um aminoácido diferente.
16. Método realizado *in vitro* para neutralizar o efeito anticoagulante da heparina numa amostra de um fluído, o qual consiste em fazer contactar a referida amostra com uma quantidade eficaz de produto de proteína bactericida indutora da permeabilidade (BIP) de ligação à heparina.

Lisboa, 14 de Setembro de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, 1.º e-Drt.,
1269-063 LISBOA

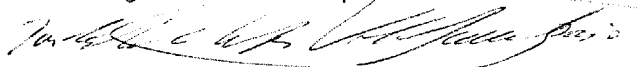
Resumo

“Utilizações terapêuticas de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade”

A presente invenção proporciona métodos terapêuticos para o tratamento de estados patológicos, incluindo a neutralização da actividade anticoagulante da heparina, a inibição da angiogénese, a proliferação de células endoteliais e tumorais e o tratamento de doenças inflamatórias crónicas, mediante a administração de produtos de proteína bactericida indutora de permeabilidade (BIP).

Lisboa, 14 de Setembro de 2001

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.

1269-063 LISBOA

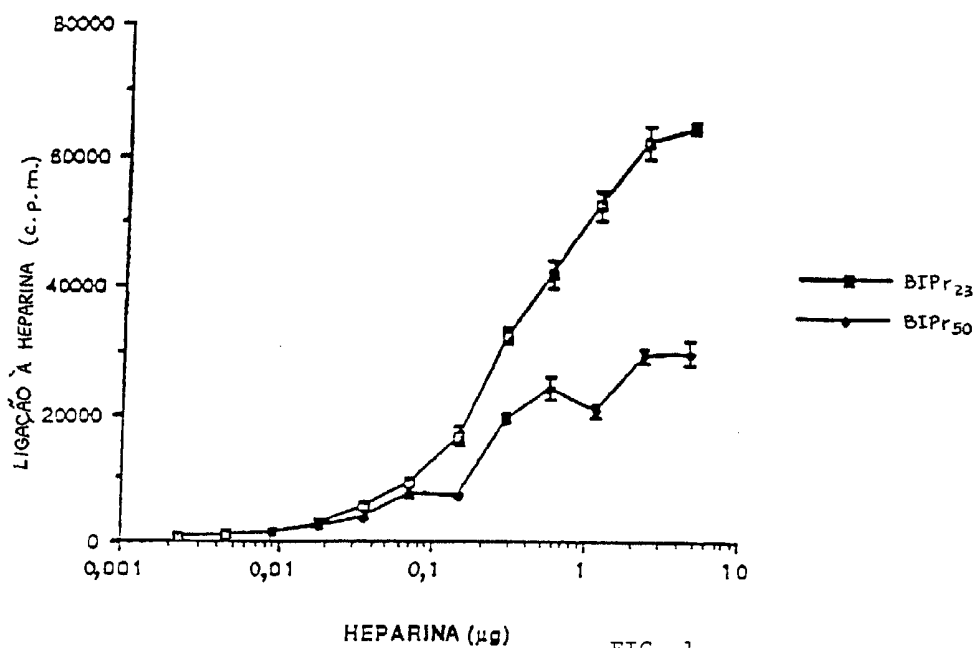


FIG. 1

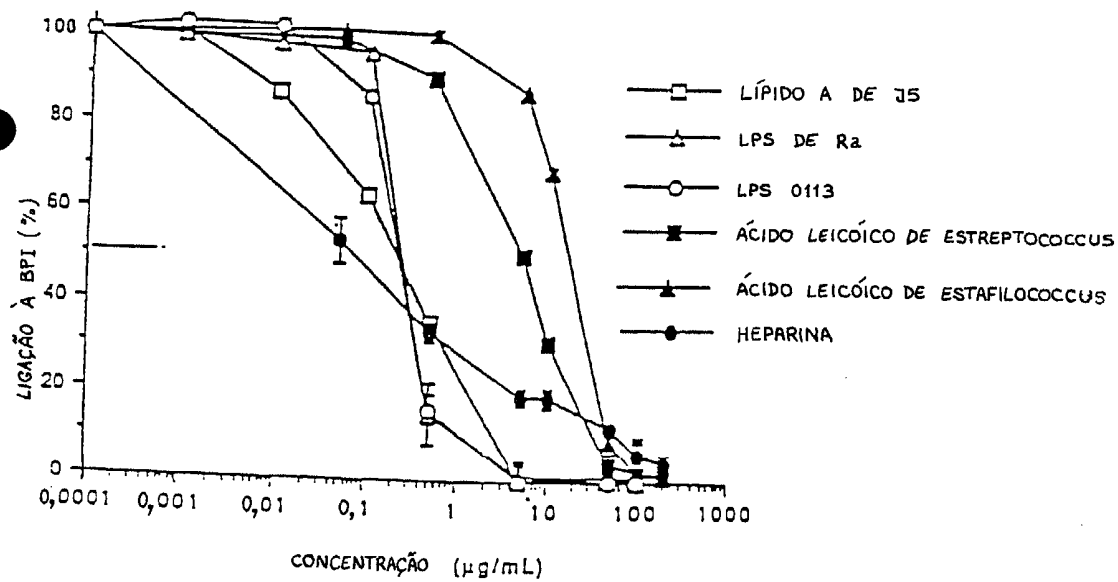


FIG. 2

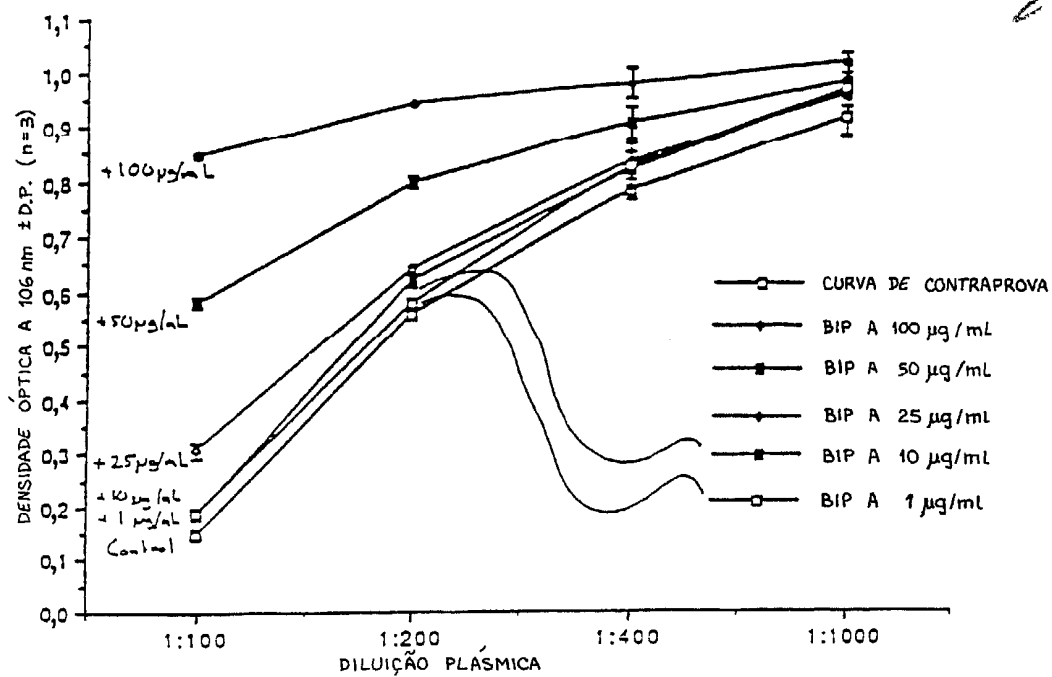


FIG. 3

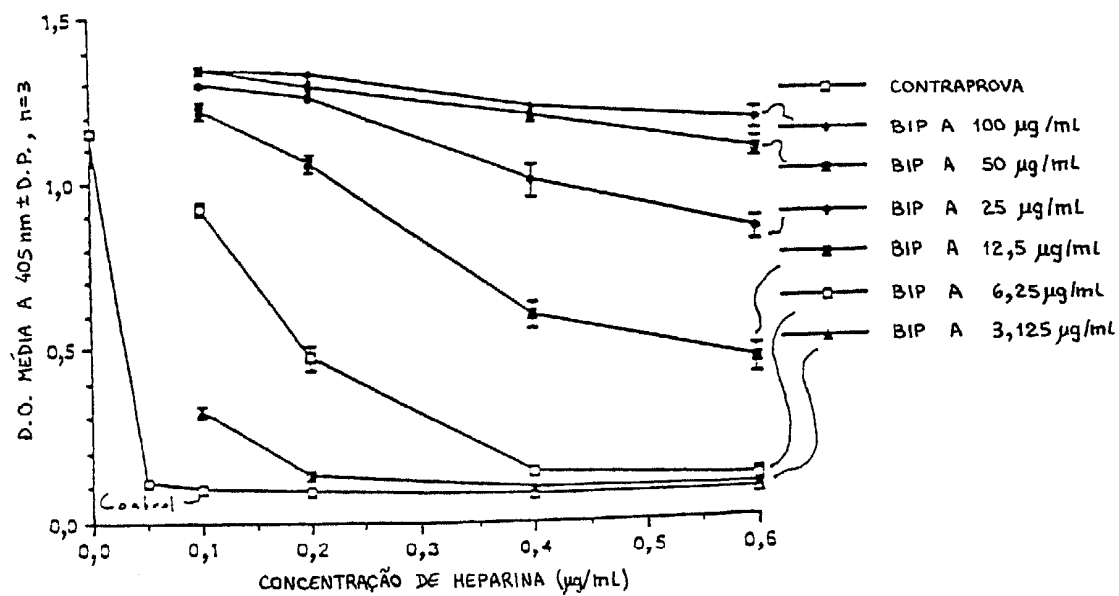


FIG. 4

258

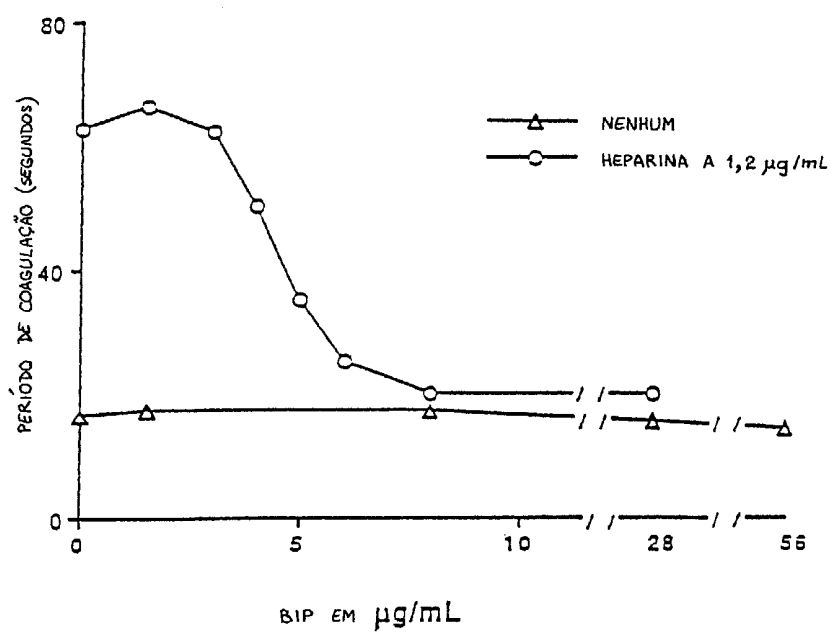


FIG. 5

258

4/22

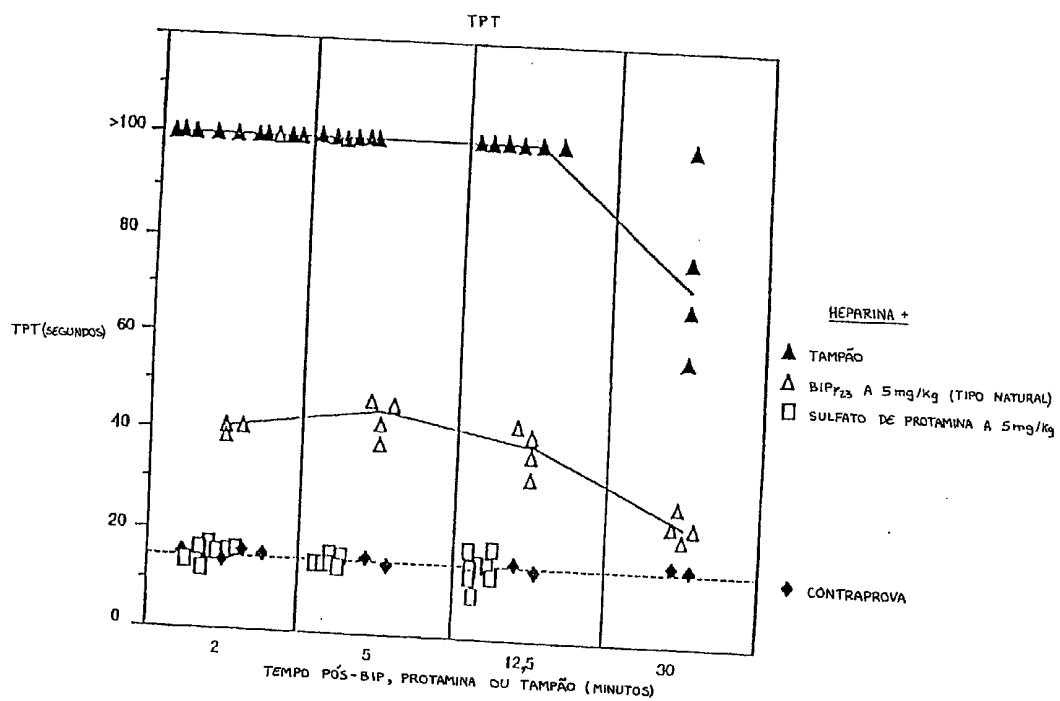


FIG. 6

258

5/22

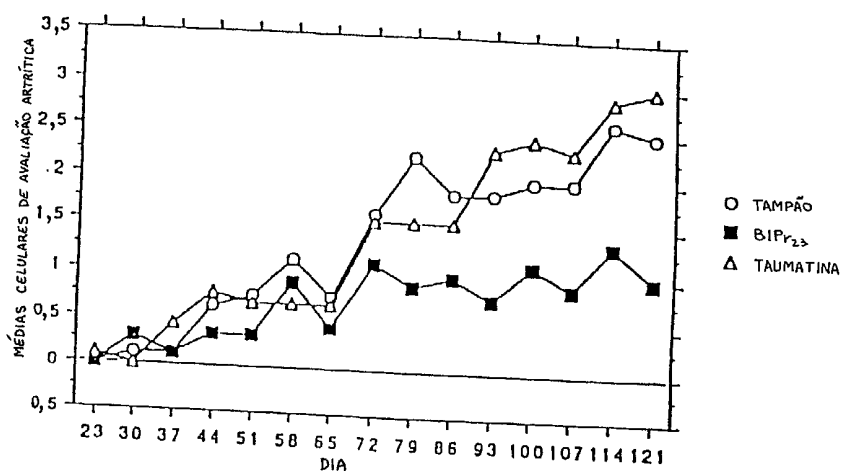


FIG. 7

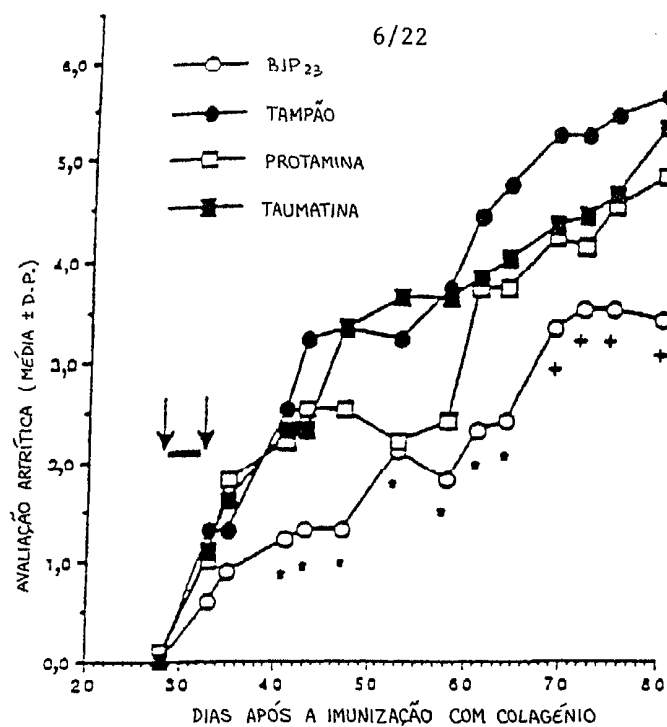


FIG. 8

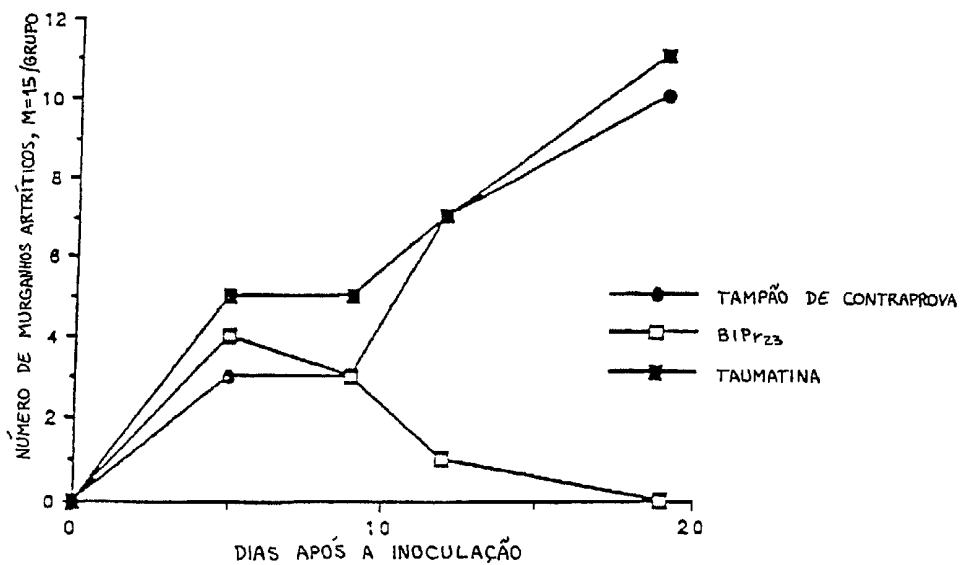


FIG. 9

7/22

258

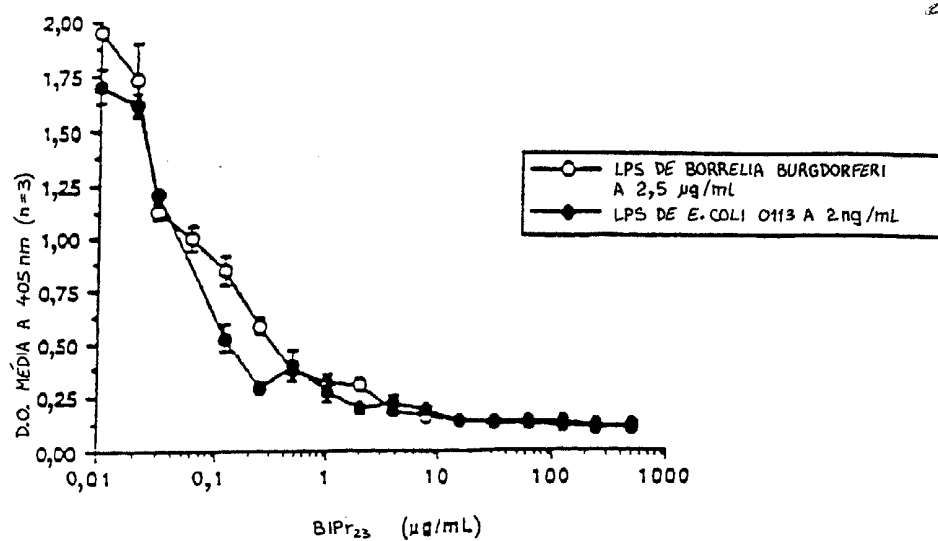


FIG. 10

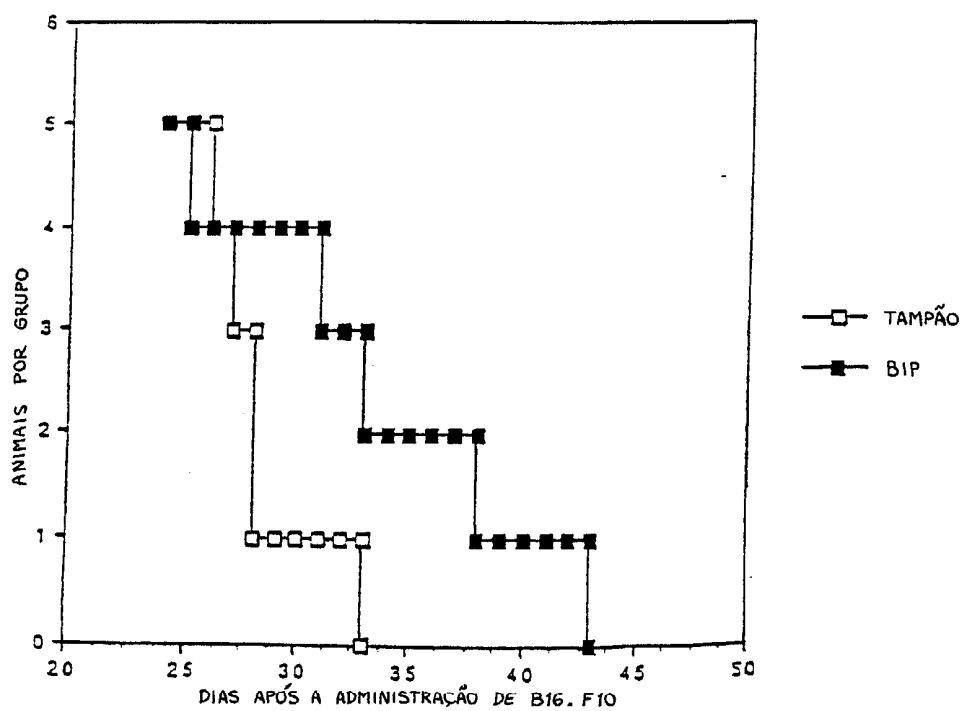


FIG. 11

258

8/22

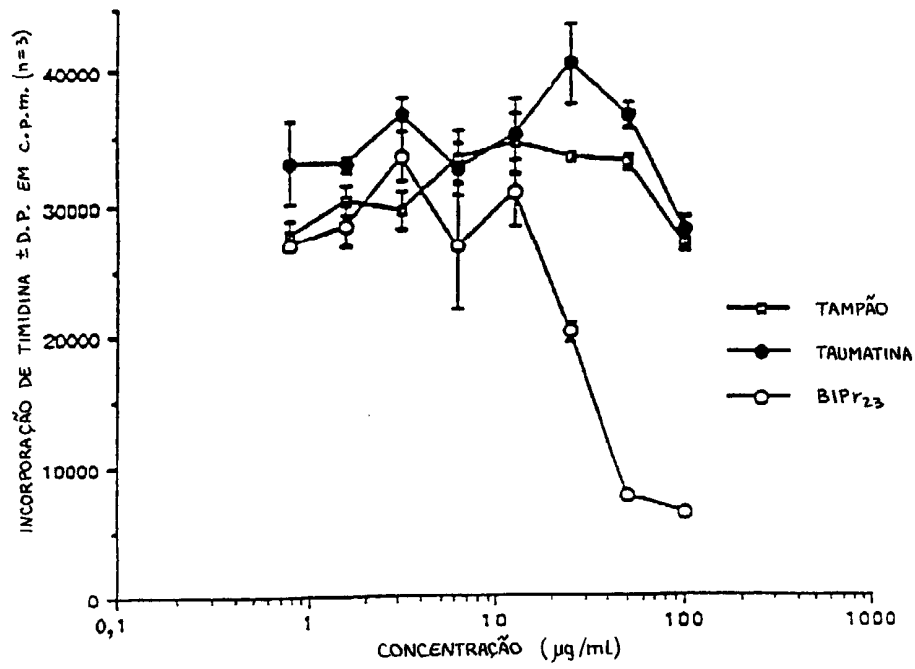


FIG. 12

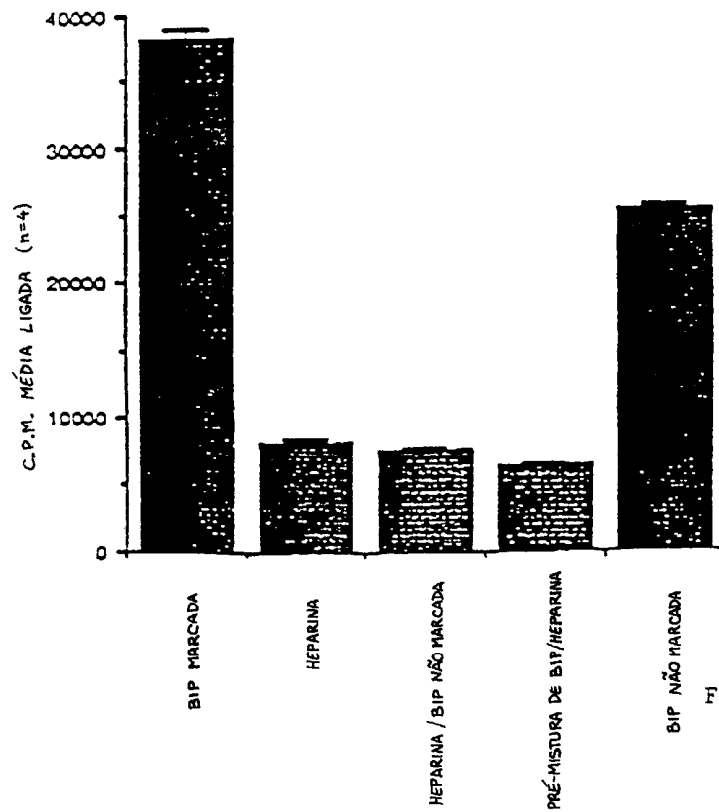
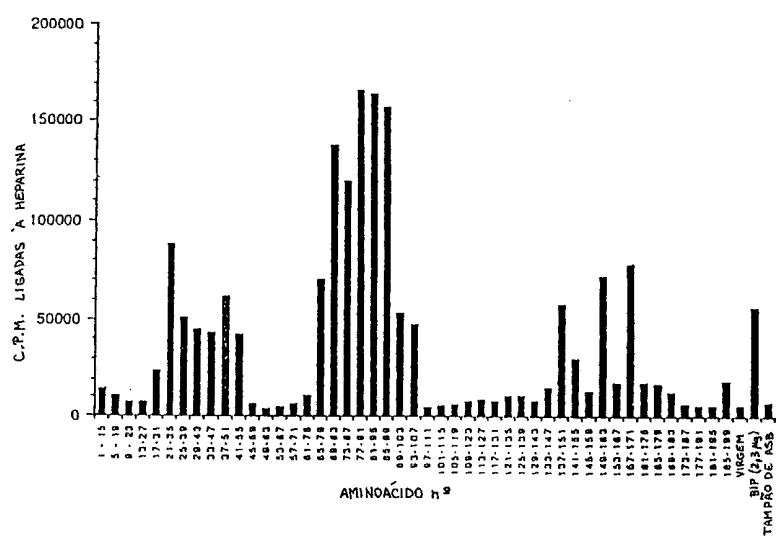


FIG. 13

258

9/22



288

10/22

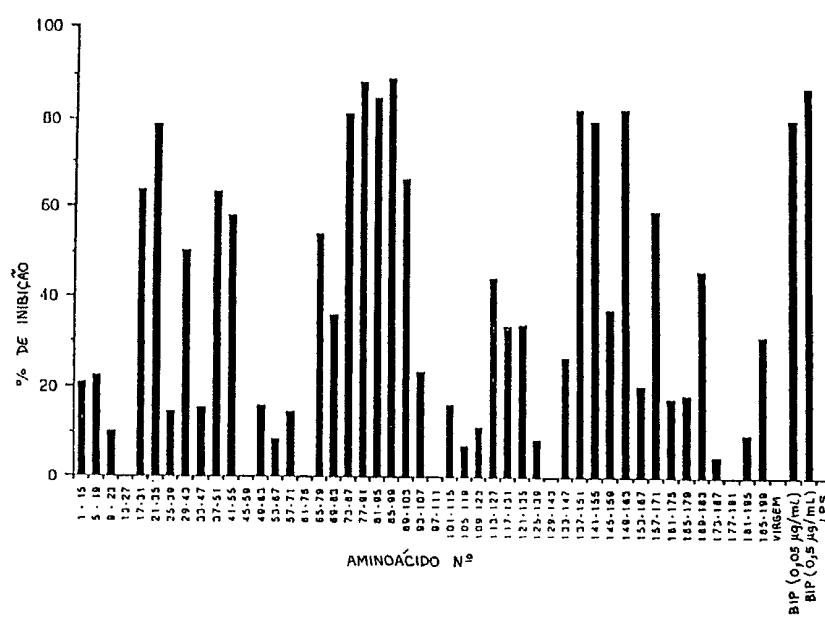


FIG. 15

288

11/22

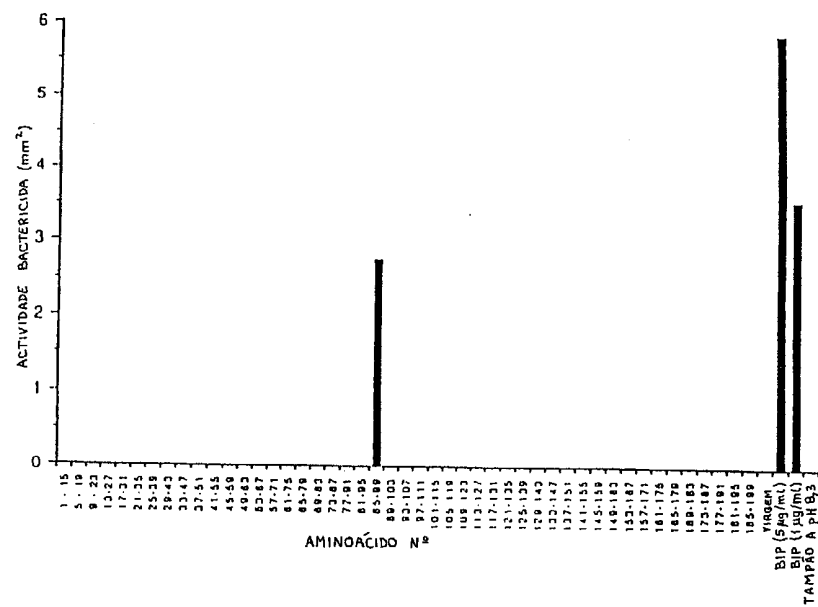


FIG. 16

12/22

258

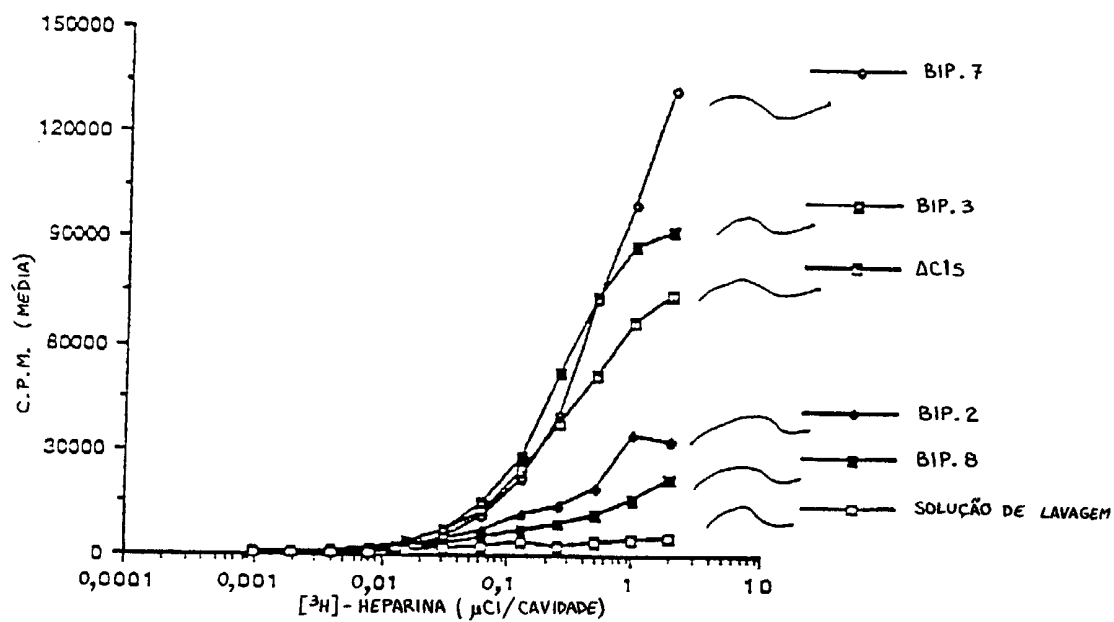


FIG. 17

258

13/22

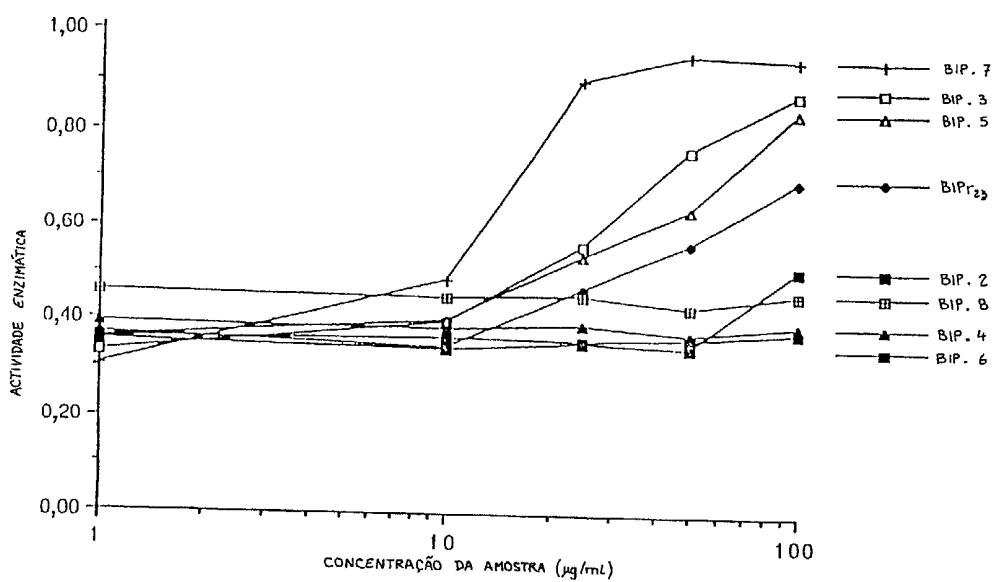


FIG. 18a

258

14/22

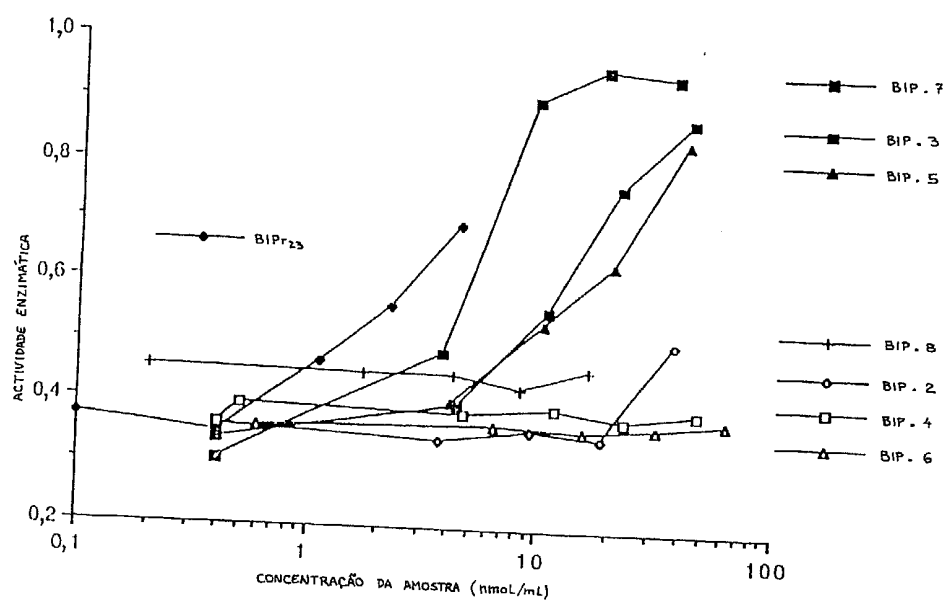


FIG. 18b

288

15/22

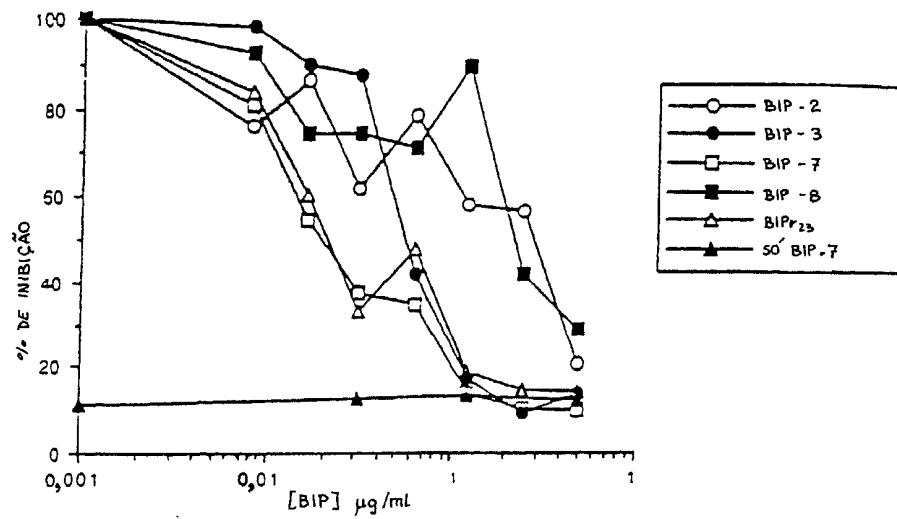


FIG. 19a

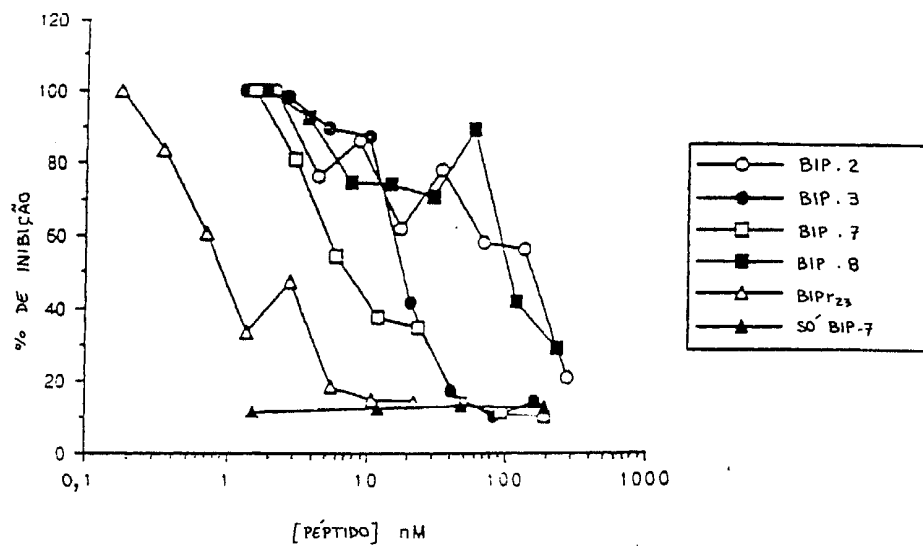


FIG. 19b

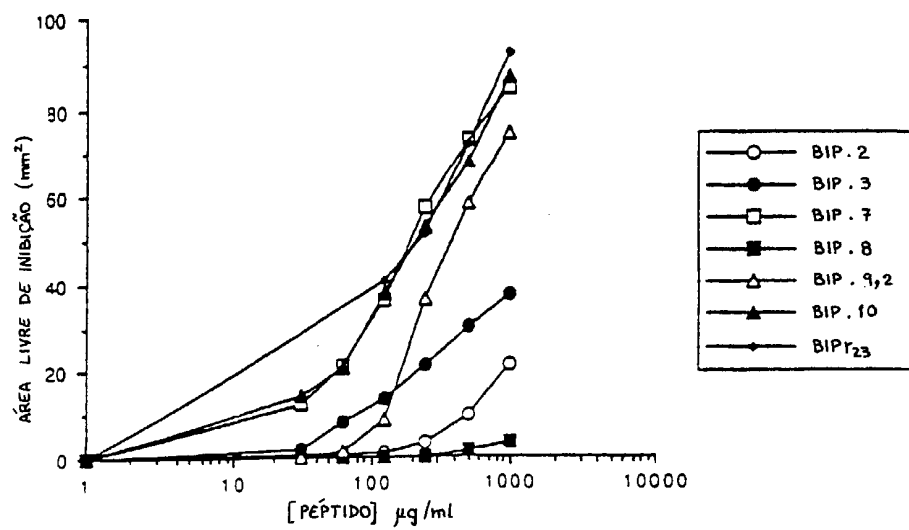


FIG. 20a

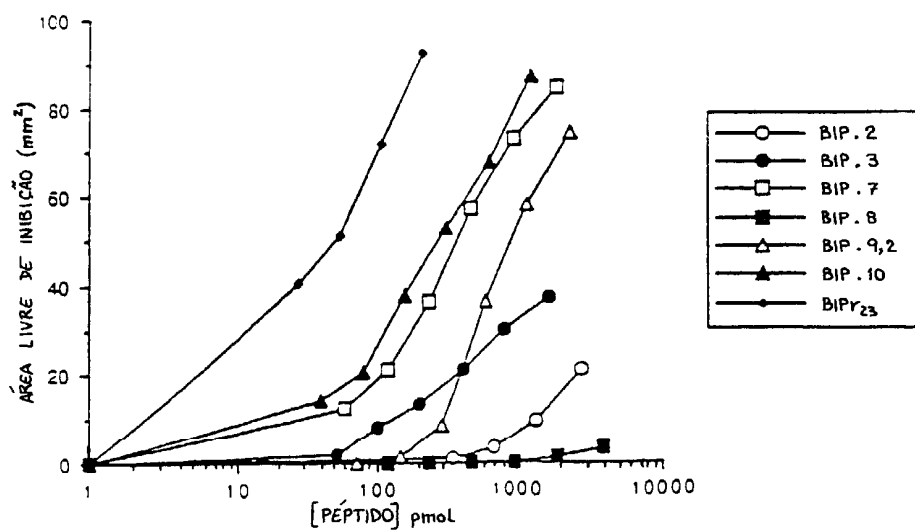
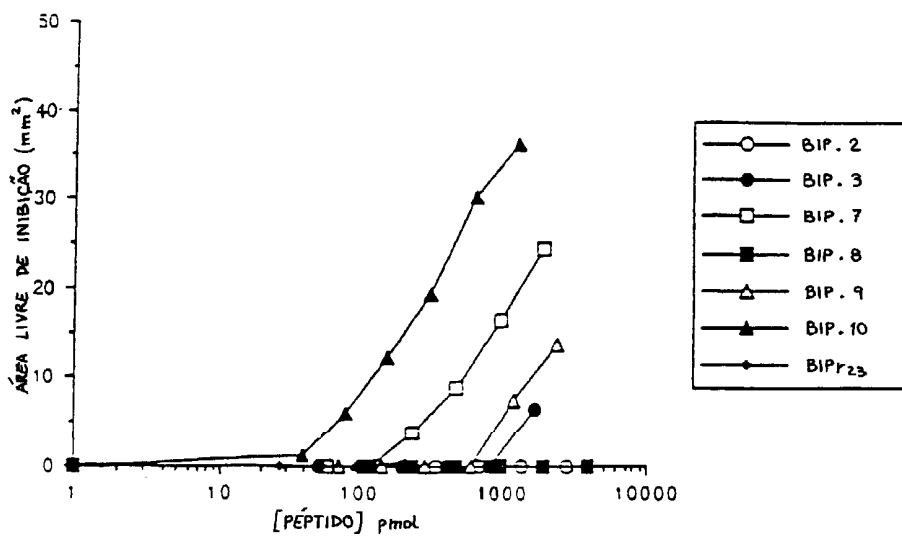
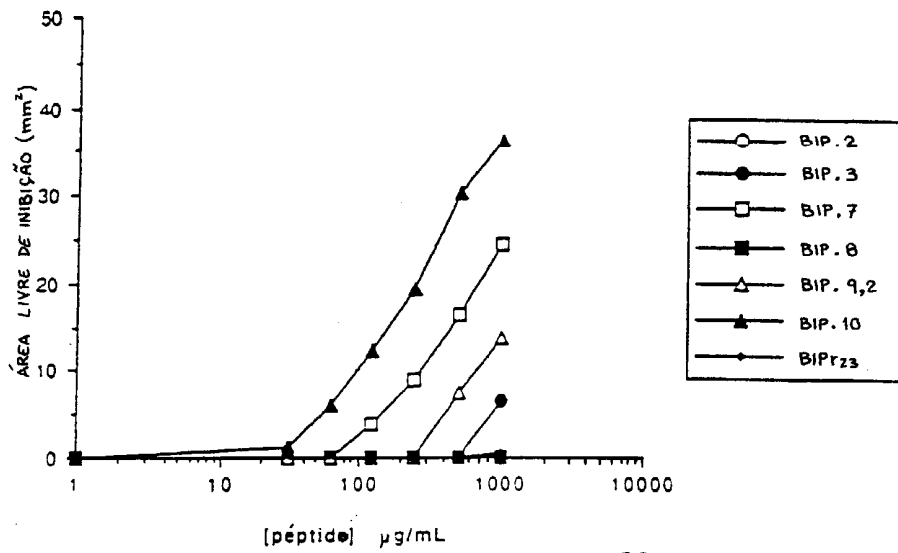


FIG. 20b



258

18/22

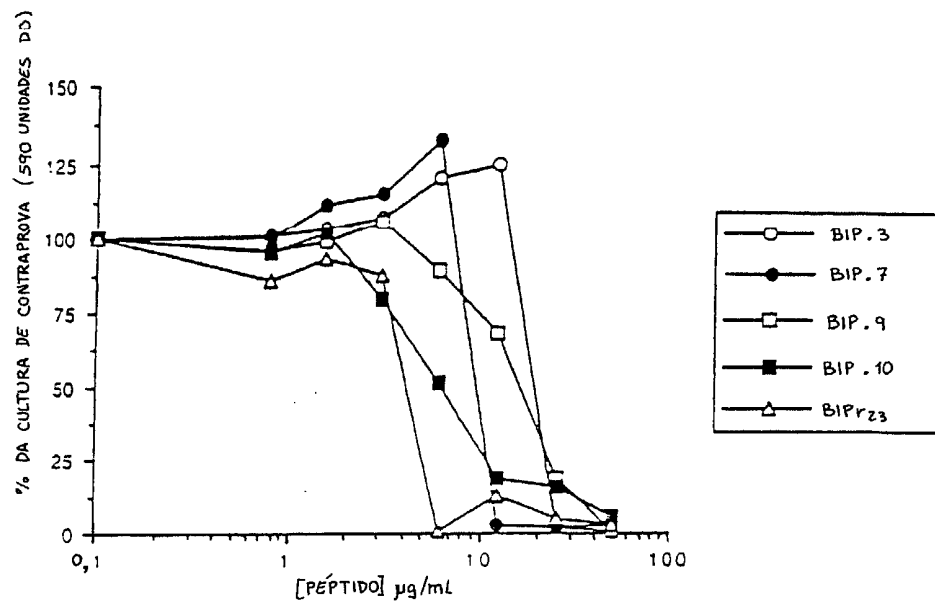


FIG. 20e

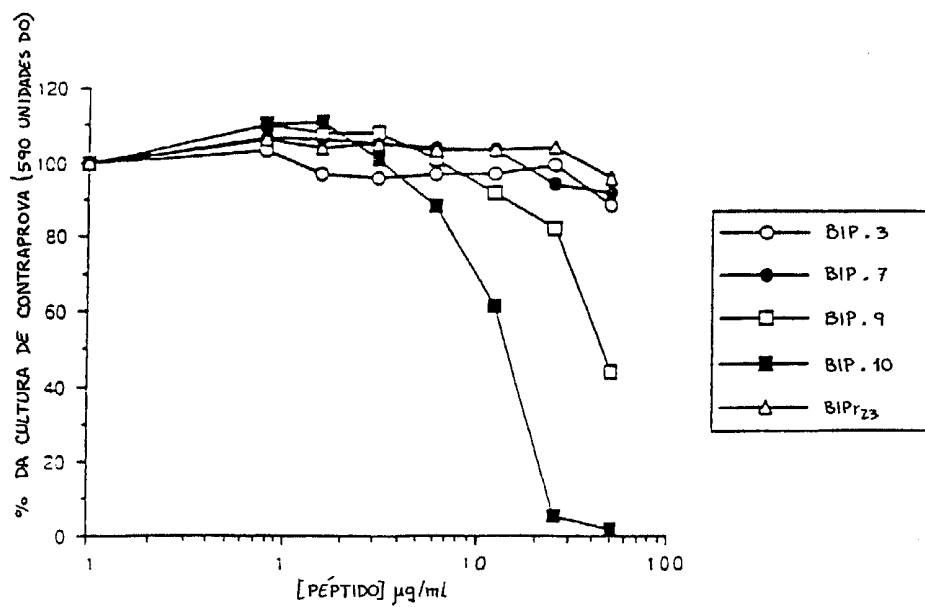


FIG. 20f

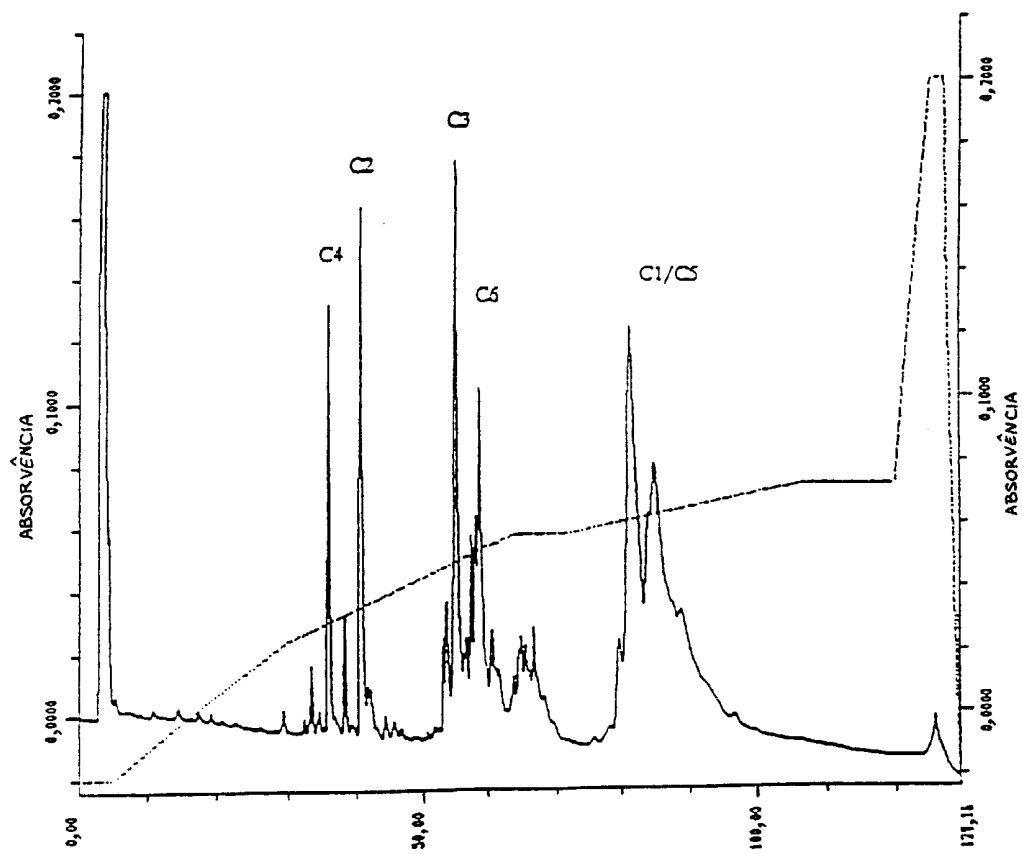


FIG. 21a

258

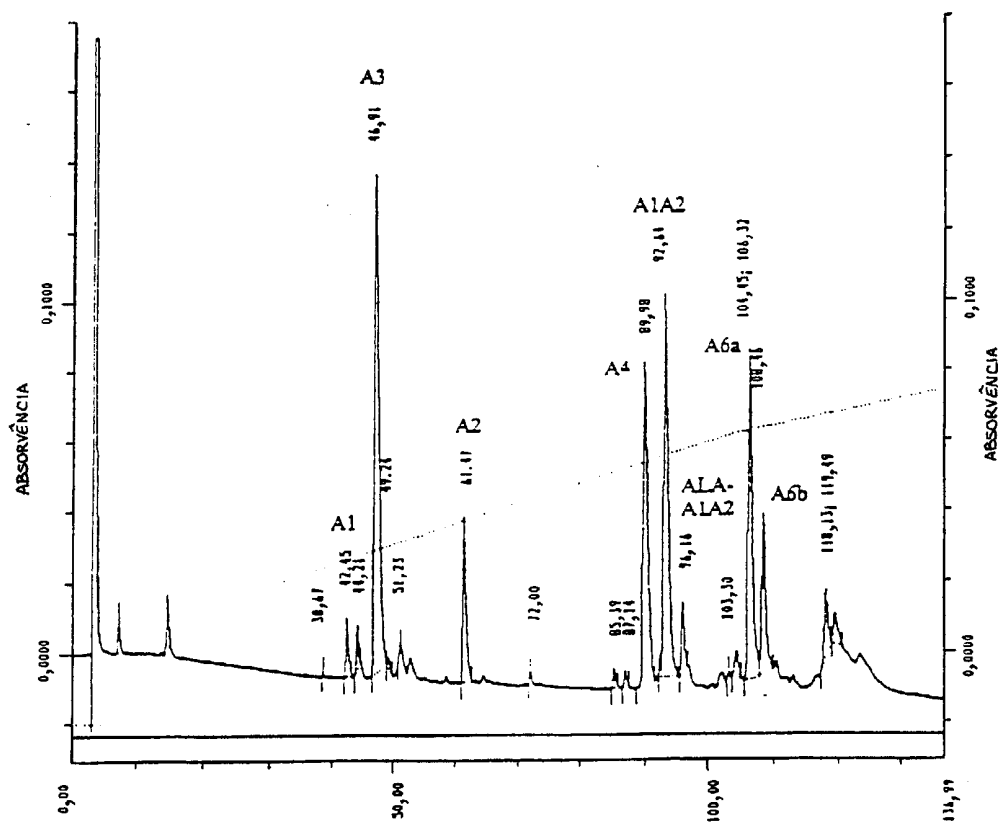


FIG. 21b

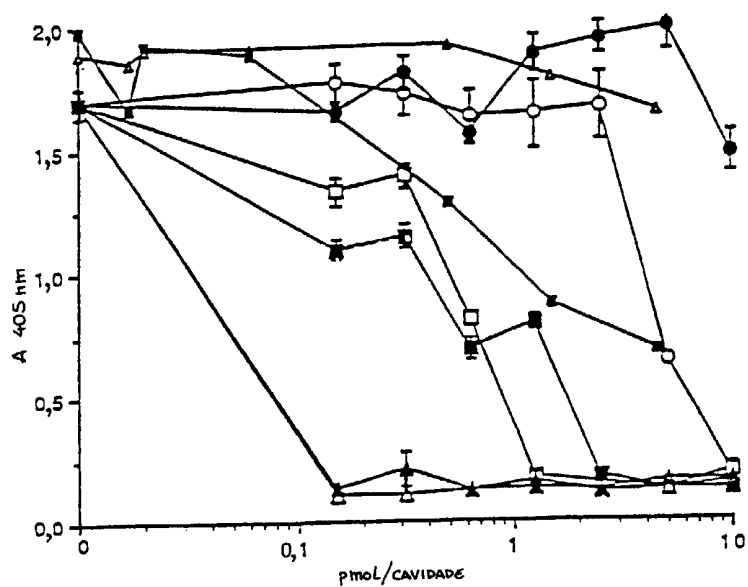


FIG. 22

258

22/22

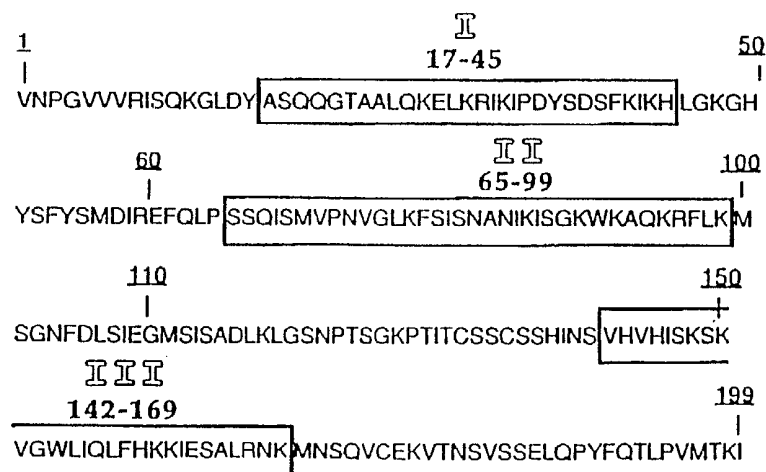


FIG. 23