República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0615247-3 A2**

BRPI0615247A2

(22) Data de Depósito: 31/08/2006
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/00
C07K 16/36

(54) Título: **ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA FVII E USO DESSES**

(30) Prioridade Unionista: 31/08/2005 EP 05 107963.0

(73) Titular(es): NOVO NORDISK HEALTH CARE AG

(72) Inventor(es): Else Marie Nicolaisen, Hans Kurt Pingel, Janus Krarup

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006065864 de 31/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/026000de 08/03/2007

(57) Resumo: ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA FVII E USO DESSES. A presente invenção refere-se a novos anticorpos contra FVII, uso para determinar a quantidade de FVII corretamente enovelado e intacto em uma amostra, assim como para purificação e otimização de processo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA FVII E USO DESSES".**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos anticorpos contra FVII, uso para determinar da quantidade de FVII corretamente enovelado e intacto em uma amostra assim como para purificação e processo de otimização.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Para a produção industrial de proteínas é desejável ser capaz de determinar a concentração de um polipeptídeo de FVII em uma amostra em um ensaio conveniente e fácil. Um modo de fazer isso é por anticorpos específicos que se ligarão ao polipeptídeo de FVII e que podem ser subseqüentemente quantificados pela reação enzimática de uma enzima conjugada. Esse ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) é bem-conhecido na técnica para detecção de proteínas específicas em uma amostra. Para uma determinação mais precisa da concentração de antígeno, onde as quantidades absolutas de um antígeno em uma amostra devem ser determinadas e um antígeno padrão está disponível, o ELISA "sanduíche" é muito útil.

Para utilizar esse ensaio, um anticorpo (o anticorpo de "captura") é purificado e ligado a uma fase sólida. O antígeno é então adicionado e deixado complexar com o anticorpo ligado. Produtos não ligados são então removidos com uma lavagem e um segundo anticorpo marcado (o anticorpo de "detecção") é deixado se ligar ao antígeno, completando assim o "sanduíche". O ensaio é então quantificado pela medida da quantidade do segundo anticorpo marcado ligado à matriz, através do uso de um substrato colorimétrico. A maior vantagem dessa técnica é que o antígeno não precisa ser purificado antes do uso e também que esses ensaios são muito específicos. Entretanto, nem todos os anticorpos podem ser usados. Combinações de anticorpo monoclonal devem ser qualificadas em "pares combinados", significando que elas podem reconhecer epítopos separados sobre o antígeno.

A sensibilidade do ELISA sanduíche é dependente de quatro fatores: O número de moléculas do primeiro anticorpo que estão ligadas à fase só-

lida; a afinidade do primeiro anticorpo pelo antígeno; a afinidade do segundo anticorpo pelo antígeno; a atividade específica do segundo anticorpo.

A afinidade dos anticorpos pelo antígeno pode, especialmente, ser alterada apenas pela substituição por outros anticorpos. Assim, anticorpos com grande afinidade por um polipeptídeo de FVII particular são desejáveis.

Muitas proteínas requerem modificações pós-traducionais a fim de se tornarem ativas. Essas modificações incluem a clivagem de pró-peptídeos e o enovelamento correto do polipeptídeo maduro.

Uma família particular de proteínas é reconhecida por uma organização modular característica e requer vitamina K para sua biossíntese. O domínio de ligação a membrana amino-terminal contém resíduos de ácido glutâmico gama-carboxilado (GLA), modificados pós-traducionalmente por uma carboxilase em uma reação dependente de vitamina K. A gama-carboxilação dessas proteínas afeta seu enovelamento apropriado e portanto também suas atividades.

Durante a produção de proteínas que pertencem a essa família, às vezes é desejável purificar líquidos de cultura de uma maneira muito eficiente pela aplicação de colunas de imuno-afinidade. Também a fim de otimizar o rendimento do polipeptídeo de FVII ativo na cultura, pode ser desejável controlar melhor o processo de cultivo. Esse objetivo pode ser alcançado pela identificação de anticorpos monoclonais muito eficientes e um ensaio fácil e rápido para a determinação da proporção de proteína ativa (corretamente processada: gama-carboxilação levando a formação de epítopos estruturais) de interesse em relação a quantidade total do polipeptídeo de FVII na cultura. Dessa maneira, o processo pode ser monitorado e ajustado para condições ótimas tais como permitir a coleta da cultura no momento ótimo durante a cultura.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Anticorpos monoclonais específicos que têm alta afinidade na presença de um cátion divalente, tal como cálcio, direcionados ao domínio de GLA de FVII foram agora identificados.

Esses anticorpos podem ser utilizados em métodos para boas determinações da concentração absoluta de um polipeptídeo de FVII e ainda, quando esses anticorpos de alta afinidade estão combinados com anticorpos que reconhecem epítopos diferentes expostos sobre o polipeptídeo de FVII, foi desenvolvido um método que é capaz de determinar a proporção de polipeptídeo de FVII corretamente processado em relação ao total de polipeptídeo de FVII em uma amostra. Esse método pode ser usado para otimizar o rendimento do polipeptídeo de FVII ativo durante a produção.

Além disso, esses novos anticorpos específicos que têm alta afinidade na presença de cálcio direcionados para o domínio de GLA podem ser usados para métodos de purificação muito eficientes e simples.

Assim, em um amplo aspecto, a presente invenção refere-se a identificação de anticorpos monoclonais de alta eficiência contra FVII humano selvagem.

Um primeiro aspecto da presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente.

Um segundo aspecto da invenção refere-se a uma molécula de ácido nucléico que codifica um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um vetor que compreende a molécula de ácido nucléico que codifica um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a uma célula que compreende um vetor que compreende a molécula de ácido nucléico que codifica um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII

humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente,

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao primeiro anticorpo para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) deixar o primeiro complexo de anticorpo em contato com um segundo anticorpo monoclonal detectável específico para um segundo epítopo presente sobre o polipeptídeo de FVII, o segundo epítopo sendo diferente do epítopo do primeiro anticorpo monoclonal,

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue ao segundo anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo, pela detecção da quantidade do segundo anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra em contato com um segundo anticorpo monoclonal específico para um epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o epítopo sendo diferente do epítopo identificado por um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-

carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente,

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao segundo anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal detectável que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente,

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue ao primeiro anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo, pela detecção da quantidade do primeiro anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para determinar a proporção de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em relação a quantidade total de polipeptídeos de FVII em uma amostra compreendendo as etapas de:

a) determinar a quantidade dos polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto pelo uso do método de acordo com a invenção e

b) determinar a quantidade total de polipeptídeo de FVII presente em uma amostra.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se ao uso de um método de acordo com a invenção para otimizar o rendimento do polipeptídeo de FVII funcional durante a produção.

Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método para a purificação de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto a partir de uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) acoplamento de um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente a uma coluna de purificação por imunoafinidade,

b) aplicar a amostra à coluna na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente,

c) eluir os polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio intacto de GLA da coluna pela remoção do cátion divalente da coluna.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A invenção é explicada em detalhes abaixo com referência aos desenhos, nos quais

Figura 1 mostra a seqüência de aminoácidos completa do Fator VII da coagulação humano nativo (SEQ ID NO: 1).

Figura 2 mostra as seqüências de nucleotídeos e as seqüências de aminoácidos das regiões variável leve (VL) e variável pesada (VH) maduras de anticorpos exemplares de acordo com a invenção.

Figura 3 mostra uma curva-padrão típica para o ensaio ELISA descrito.

Figura 4 mostra uma curva-padrão típica ln/ln para o ensaio ELISA descrito.

Figura 5 mostra CDI como uma função do tempo (em dias) para diferentes cultivos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se em um amplo aspecto à identificação de novos anticorpos específicos contra o domínio de GLA de FVII.

Esses anticorpos monoclonais específicos têm uma alta afinidade em relação ao domínio de GLA de FVII na presença de um cátion divalente tal como cálcio.

Os anticorpos podem ser utilizados em métodos para boas determinações de concentração absoluta de um polipeptídeo de FVII com um domínio de GLA intacto e ainda, quando esses anticorpos de alta afinidade estão combinados com anticorpos que reconhecem epítopos diferentes ex-

postos sobre o polipeptídeo de FVII, foi desenvolvido um método que é capaz de determinar a proporção de polipeptídeo de FVII corretamente processado em relação ao total de polipeptídeo de FVII em uma amostra. Esse método pode ser usado para otimizar o rendimento do polipeptídeo de FVII ativo durante a produção.

Além disso, esses novos anticorpos específicos que têm alta afinidade na presença de um cátion divalente, tal como cálcio, direcionados para o domínio de GLA podem ser usados para métodos de purificação muito eficientes e simples.

Em um aspecto da invenção, os anticorpos de acordo com a invenção são usados para determinação de quantidades de polipeptídeos de FVII com um domínio de GLA intacto. Isso é tipicamente obtido com um ensaio, tal como um ensaio ELISA, em que um primeiro anticorpo, anticorpo de captura, é acoplado a um suporte sólido seguido pela ligação ao anticorpo ao polipeptídeo de FVII sob dadas condições apropriadas. Após uma etapa de lavagem, o polipeptídeo de FVII ficará retido sobre o suporte sólido. Produtos não ligados são removidos pela lavagem e o segundo anticorpo marcado (anticorpo de "detecção") é deixado se ligar ao polipeptídeo de FVII, assim completando o "sanduíche". A quantidade de antígeno é então quantificada pela medida da quantidade de segundo anticorpo marcado ligado à matriz. No caso de um anticorpo de detecção ligado a uma enzima, um ensaio colorimétrico pode ser realizado e uma mudança na cor determinada. Havendo um padrão apropriado do polipeptídeo de FVII com concentração conhecida, a quantidade absoluta do polipeptídeo de FVII presente na amostra pode ser determinada.

Em uma modalidade da invenção, quando o anticorpo de detecção está ligado a uma enzima, o método da invenção refere-se a um método ELISA sanduíche.

Na presente invenção, o termo "anticorpo de captura" significa o primeiro anticorpo de um ELISA sanduíche, diluído em tampão, que é acoplado passivamente à fase sólida na incubação. O acoplamento ativo tam-

bém pode ser usado, por exemplo, pelo uso de um anticorpo biotinilado que é adicionado a uma fase sólida revestida com estreptavidina.

Na presente invenção, o termo "anticorpo de detecção" significa o segundo anticorpo de um ELISA sanduíche, diluído em um tampão, que é adicionado após o antígeno. O segundo anticorpo pode ser conjugado como em um ELISA direto ou um conjugado anti-espécie como em um ELISA sanduíche clássico. O conjugado anti-espécie se liga a espécie do soro a partir da qual o segundo anticorpo foi preparado.

FVII plasmático humano consiste em quatro domínios discretos: um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) amino terminal (N-terminal) (aminoácidos de 1-38), dois domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e um domínio serina protease. A enzima ativa de duas cadeias é gerada pela clivagem específica após Arg152 (Hagen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 2412-2416).

O domínio de GLA N-terminal se liga às superfícies de fosfolipídios; o domínio serina protease C-terminal confere a atividade enzimática; os dois domínios semelhantes a EGF são espaçadores entre eles; todos os quatro domínios contribuem para a interação com o fator tecidual (TF).

Os íons de cálcio se ligam a três domínios em FVII (Banner *et al.*, Nature 1996; 380:41-46). Sem os íons de cálcio, FVII virtualmente não tem atividade biológica. Sete sítios de cálcio estão localizados no domínio de GLA e eles necessitam estar ocupados para FVII se ligar a membranas celulares (Person & Petersen, Eur J Biochem 1995; 234: 293-300) e também para uma interação apropriada com TF.

A sensibilidade e assim boas determinações do conteúdo absoluto e concentração de moléculas de FVII com e sem o domínio de GLA intacto em uma amostra de cultura é, entre outros fatores, dependentes de bons anticorpos que têm alta afinidade contra seu antígeno alvo. Em uma modalidade particular, os anticorpos da invenção para uso na determinação da quantidade de moléculas de FVII com um domínio de GLA intacto são selecionados como os anticorpos que têm uma afinidade muito alta em relação ao polipeptídeo na presença de um cátion divalente, tal como Ca^{2+}.

Outros anticorpos de alta afinidade contra epítopos diferentes em polipeptídeos de FVII do que o domínio de GLA também podem ser usados nesses métodos.

Os anticorpos usados para boas determinações do conteúdo absoluto e concentração de todas as moléculas de FVII com e sem o domínio de GLA intacto devem preferivelmente reconhecer epítopos que estão sempre presentes no antígeno independentemente do antígeno estar apropriadamente enovelado ou ativado. No fator VIIa, epítopos encontrados dentro dos domínios semelhantes a EGF são particularmente adequados para esse propósito.

Como usado aqui, os termos "polipeptídeo de Fator VII" ou "polipeptídeo de FVII" significam qualquer proteína que compreende a seqüência de aminoácidos 1-406 do fator VIIa humano selvagem (isto é, um polipeptídeo que tem a seqüência de aminoácidos descrita na Patente U.S. No. 4.784.950), variantes desse assim como derivados do Fator VII e conjugados do Fator VII. Isso inclui variantes de FVII, derivados do Fator FVII e conjugados do Fator FVII que exibem substancialmente a mesma atividade biológica ou atividade biológica melhorada em relação ao Fator VIIa humano selvagem. Tais variantes do Fator VII podem exibir propriedades diferentes com relação ao Fator VII humano, incluindo estabilidade, ligação a fosfolipídio, atividade específica alterada e semelhantes.

Os termos "Fator VII" ou "FVII" significam polipeptídeos de Fator VII na sua forma não clivada (zimogênio). Tipicamente, o Fator VII é clivado entre os resíduos 152 e 153 para produzir o Fator VIIa. "FVII humano selvagem" é a forma de zimogênio não clivado de FVIIa humano selvagem na sua forma bioativa funcional.

Os termos "Fator VIIa" ou "FVIIa" significam polipeptídeos de Fator VII que foram processados proteoliticamente para produzir suas respectivas formas bioativas funcionais.

Como usado aqui, o termo "FVIIa humano selvagem" é um polipeptídeo que tem a seqüência de aminoácido descrita na Patente U.S. No. 4.784.950 na sua forma bioativa funcional.

O termo "derivado do Fator VII" como usado aqui, pretende designar um polipeptídeo de FVII que exibe substancialmente a mesma atividade biológica ou atividade biológica melhorada em relação ao Fator VII selvagem, no qual um ou mais dos aminoácidos do peptídeo de origem foram sido geneticamente e/ou quimicamente e/ou enzimaticamente modificados, por exemplo, por alquilação, glicosilação, PEGuilação, acilação, formação de éster ou formação de amida ou semelhantes. Isso inclui, mas não é limitado ao Fator VIIa PEGuilado humano, Fator VIIa cisteína-PEGuilado humano e variantes desses. Exemplos não limitantes de derivados de Fator VII incluem derivados de Fator VII Glico-PEGuilados como descrito em WO 03/31464 e nos pedidos de Patente US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557, e US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.); conjugados de FVII como descrito em WO 01/04287, pedido de Patente US 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) e WO 02/02764, pedido de Patente US 20030211094 (University of Minnesota).

O termo "atividade biológica melhorada" refere-se a polipeptídeos de FVII com i) atividade proteolítica substancialmente igual ou aumentada em comparação com o Fator VIIa recombinante humano de tipo selvagem ou ii) a polipeptídeos de FVII com atividade de ligação a TF substancialmente igual ou aumentada em comparação com o Fator VIIa recombinante humano selvagem ou iii) a polipeptídeos de FVII com meia-vida no plasma sanguíneo substancialmente igual ou aumentada em comparação com o Fator VIIa recombinante humano selvagem. O termo "Fator VIIa humano PEGuilado" significa um Fator VIIa humano que tem uma molécula de PEG conjugada com um polipeptídeo de Fator VIIa humano. Deve ser compreendido que a molécula de PEG pode estar acoplada em qualquer parte do polipeptídeo de Fator VIIa incluindo qualquer resíduo de aminoácido ou porção de carboidrato do polipeptídeo de Fator VIIa. O termo "Fator VIIa humano cisteína-PEGuilado" significa um Fator VIIa que tem uma molécula de PEG conjugada a um grupo sulfidrila de uma cisteína introduzida no Fator VIIa humano.

Exemplos não limitantes de variantes do Fator VII que têm atividade proteolítica substancialmente igual ou aumentada em comparação com o Fator VIIa humano recombinante selvagem incluem S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino *et al.*, Arch. Biochem. Bio-phys. 352: 182-192, 1998); variantes de FVIIa que exibem estabilidade proteolítica aumentada como descrito na Patente U.S. No. 5.580.560; Factor VIIa que foi proteoliticamente clivado entre os resíduos 290 e 291 ou entre os resíduos 315 e 316 (Mollerup *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 48: 501-505, 1995); formas oxidadas de Fator VIIa (Kornfelt *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 363:43-54, 1999); variantes de FVII como descrito em PCT/DK02/00189 (que corresponde ao WO 02/077218); e variantes de FVII que exibem estabilidade proteolítica aumentada como descrito em WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes de FVII que têm um domínio Gla modificado e que exibem ligação a membrana aumentada como descrito em WO 99/20767, patentes US 6017882 e US 6747003, pedido de patente US 20030100506 (University of Minnesota) e WO 00/66753, pedidos de patente US 20010018414, US 2004220106, e US 200131005, patentes US 6762286 e US 6693075 (University of Minnesota); e variantes de FVII como descrito em WO 01/58935, patente US 6806063, pedido de patente US 20030096338 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS), WO 04/029091 (Maxygen ApS), WO 04/083361 (Maxygen ApS), e WO 04/111242 (Maxygen ApS), assim como em WO 04/108763 (Canadian Blood Services).

Exemplos não limitantes de variantes de FVII que têm atividade biológica aumentada em comparação com FVIIa selvagem incluem variantes de FVII como descrito em WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, PCT/DK02/00635 (que corresponde a WO 03/027147), pedido de patente dinamarquês PA 2002 01423 (que corresponde a WO 04/029090), pedido de patente dinamarquês PA 2001 01627 (que corresponde a WO 03/027147); WO 02/38162 (Scripps Research Institute); e variantes de FVIIa com atividade aumentada como descrito em JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.). Exemplos de variantes de Fator VII incluem, sem limitação, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII,

V158T/M298Q- FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, e S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V- FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V- FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q- FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII, S314E/V158D-FVII, S314E/E296V- FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII, K316H/L305V-FVII, K316H/K337A- FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII, K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII, K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII, S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII, S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A- FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q- FVII,

K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII, K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q- FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q- FVII, K316H/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII, K316H/L305V/V158 D/E296V/M298Q/K337A FVII,K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q- FVII, K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q- FVII, K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q- FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A -FVII, K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII, F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII, F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII, F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V- FVII, F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII, F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E- FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII, F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII, F374Y/E296V/M298Q- FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII, F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-

FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII, F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII, F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII, F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E- FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M 298Q/K337A -FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E- FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E- FVII, F374Y/V158D/M298Q/K337 A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158 D/E296V/M298Q- FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305 V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E- FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T /K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374 Y/V158T/E296V/K337A/S314E- FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A- FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,

F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,
F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Fator VII, S60-Fator VII; R152E-Fator VII, S344A-Fator VII, T106N-FVII, K143 N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; e FVII que têm substituições, adições ou deleções na seqüência de aminoácidos de 233Thr a 240Asn; FVII que tem substituições, adições ou deleções na seqüência de aminoácidos de 304Arg a 329Cys; e FVII que tem substituições, adições ou deleções na seqüência de aminoácidos de 153Ile a 223Arg.

Os anticorpos usados para determinações de concentração de moléculas de FVII com um domínio de GLA intacto reconhecem um epítopo no domínio de GLA. Um epítopo preferido no domínio de GLA é um epítopo que compreende um ou mais dos resíduos de aminoácidos Phe4, Leu5, Gla6, Gla7, Leu8, Pro10, Gly11, Gla14, Argl5, Gla16, Cys17, Gla19, Gla20, Cys22, Gla25, Gla26, Ala27, Gla29, Phe31, Lys32, Gla35 de SEQ ID NO: 1.

A expressão "um domínio de GLA intacto" como usada aqui pretende significar um domínio de GLA que tem uma ligação de dissulfeto que corresponde a ligação de dissulfeto entre Cys17 e Cys22 de FVII humano.

A expressão "polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto" como usada aqui pretende significar polipeptídeos de FVII em que um domínio de GLA intacto está covalentemente ligado ao resto da molécula de FVII.

Dentro do contexto dessa invenção, o termo um anticorpo que "se liga" a um determinante designa que o anticorpo se liga ao determinante com especificidade e/ou afinidade.

"Ligação específica" ou "especificidade" refere-se a habilidade de um anticorpo ou outro agente de se ligar de forma detectável a um epíto-

po apresentado sobre um antígeno, tal como um polipeptídeo de FVII, embora tendo reatividade relativamente pouco detectável com outras proteínas ou estruturas. A especificidade pode ser relativamente determinada por ensaios de ligação ou de ligação competitiva, usando, por exemplo, instrumentos Biacore, como descrito aqui em outro lugar. A especificidade pode ser exibida, por exemplo, por uma razão de cerca de 10:1, cerca de 20:1, cerca de 50:1, cerca de 100:1, 1000:1 ou maior de afinidade/avidez na ligação ao antígeno específico versus a ligação inespecífica a outras moléculas irrelevantes (nesse caso o antígeno específico é um polipeptídeo de FVII).

Um "epítopo" é uma área ou região sobre um antígeno à qual o peptídeo de ligação ao antígeno (tal como um anticorpo) se liga especificamente. Um epítopo de proteína pode compreender resíduos de aminoácidos envolvidos diretamente na ligação (também chamados componente imunodominante do epítopo) e outros resíduos de aminoácidos que não estão envolvidos diretamente na ligação, tais como resíduos de aminoácidos que estão efetivamente bloqueados pelo peptídeo de ligação específica ao antígeno (em outras palavras, o resíduo de aminoácido está dentro do "footprint" do peptídeo de ligação específica ao antígeno). O termo epítopo aqui inclui ambos os tipos de aminoácidos em qualquer região particular de um polipeptídeo de FVII que se liga especificamente a um anticorpo anti-FVII. Polipeptídeos de FVII podem compreender vários epítopos diferentes, que podem incluir, sem limitação, (1) determinantes antigênicos de peptídeo linear, (2) determinantes antigênicos conformacionais que consistem em um ou mais aminoácidos não contíguos localizados próximos um do outro em uma conformação de polipeptídeo de FVII maduro; e (3) determinantes antigênicos pós-traducionais que consistem, tanto no todo quanto em parte, de estruturas moleculares covalentemente ligadas a um polipeptídeo de FVII, tais como grupos de carboidratos.

A expressão que um primeiro anticorpo se liga "substancialmente" ou "pelo menos parcialmente" ao mesmo epítopo que um segundo anticorpo significa que o sítio de ligação do epítopo para o primeiro anticorpo compreende pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

ou mais dos resíduos de aminoácidos do antígeno que constitui o sítio de ligação do epítopo do segundo anticorpo. Ainda, que um primeiro anticorpo que se liga substancialmente ou parcialmente ao mesmo epítopo que um segundo anticorpo significa também que os primeiro e segundo anticorpos competem pela ligação ao antígeno, como descrito acima. Assim, o termo "se liga substancialmente ao mesmo epítopo ou determinante que" o anticorpo monoclonal FVII-3F3A4 significa que um anticorpo "compete" com FVII-3F3A4. Geralmente, um anticorpo que "se liga substancialmente ao mesmo epítopo ou determinante que" o anticorpo monoclonal de interesse (por exemplo, FVII-3F3A4, FVII-3F20A1, FVII-3F11A3) significa que o anticorpo "compete" com o anticorpo de interesse pela ligação com um ou mais polipeptídeos de FVII.

O termo "determinantes antigênicos de peptídeo linear" é definido como um epítopo composto de resíduos de aminoácidos que são contíguos na seqüência linear de aminoácidos (estrutura primária).

O termo "determinantes antigênicos conformacionais" é definido como um epítopo composto de resíduos de aminoácidos que não são todos contíguos e assim representam partes separadas da seqüência linear de aminoácidos que são trazidas para a proximidade uma da outra pelo enovelamento da molécula (estruturas secundária, terciária e/ou quaternária). Um epítopo conformacional é dependente da estrutura tridimensional. O termo "conformacional" é, portanto, geralmente usado intecambiavelmente com "estrutural".

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, em que o epítopo compreende um ou mais dos resíduos de aminoácidos Phe4, Leu5, Gla6, Gla7, Leu8, Pro10, Gly11, Gla14, Arg15, Gla16, Cys17, Gla19, Gla20, Cys22, Gla25, Gla26, Ala27, Gla29, Phe31, Lys32, Gla35 de SEQ ID NO: 1.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de áci-

do gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, cujo anticorpo monoclonal compete com um anticorpo que compreende:

(a) uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; ou

(c) uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, cujo anticorpo monoclonal compreende:

(a) uma região variável CDR1 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 24-34 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, uma região variável CDR2 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 50-56 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, uma região variável CDR3 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 89-95 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e uma região variável CDR1 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 33-35 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, uma região variável CDR2 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 50-64 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, uma região variável CDR3 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 99-112 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

(b) uma região variável CDR1 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 24-34 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, uma região variável CDR2 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 50-56 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, uma região variável CDR3 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 89-95 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 e uma região variável CDR1 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 33-35 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, uma região variável CDR2 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 50-64 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, uma região variável CDR3 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 99-112 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; ou

(c) uma região variável CDR1 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 24-34 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, uma região variável CDR2 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 50-56 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, uma região variável CDR3 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 89-95 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 e uma região variável CDR1 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 33-35 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, uma região variável CDR2 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 50-64 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:13, uma região variável CDR3 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde aos resíduos 99-112 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de áci-

do gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, cujo anticorpo monoclonal compreende:

(a) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO: 5;

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO: 9; ou

(c) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO: 13.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, cujo anticorpo monoclonal compreende:

(a) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; ou

(c) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de áci-

do gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, cujo anticorpo monoclonal é um anticorpo IgGI, IgG2, IgG3, ou IgG4.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente, cujo anticorpo monoclonal é um anticorpo IgG4

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se liguem ao primeiro anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo em contato com um segundo anticorpo monoclonal detectável específico para um segundo epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o segundo epítopo sendo diferente do epítopo do primeiro anticorpo monoclonal,

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue a um segundo anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do segundo anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que o segundo epítopo está presente no domínio 1 semelhante a EGF ou domínio 2 semelhante a EGF do polipeptídeo de FVII.

Em uma modalidade a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutamico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao primeiro anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo em contato com um segundo anticorpo monoclonal detectável específico para um segundo epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o segundo epítopo sendo diferente do epítopo do primeiro anticorpo monoclonal,

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue a um segundo anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do segundo anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que o cátion divalente é Ca^{2+} presente na faixa de cerca de 0,05 mM a cerca de 50 mM, tal como entre cerca de 0,1 mM a cerca de 30 mM, tal como entre cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, tal como entre cerca de 5 mM a cerca de 10 mM.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-

carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao primeiro anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo em contato com um segundo anticorpo monoclonal detectável específico para um segundo epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o segundo epítopo sendo diferente do epítopo do primeiro anticorpo monoclonal,

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue a um segundo anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade de segundo anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que a detecção do anticorpo detectável é realizada por um método selecionado a partir de ELISA, ressonância de plasma de superfície e biossensores piezoelétricos.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra em contato com um segundo anticorpo monoclonal específico para um epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o epítopo sendo diferente do epítopo identificado por um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao segundo anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro

anticorpo monoclonal detectável que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutamico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue ao primeiro anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do primeiro anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que o segundo epítopo está presente em um domínio 1 semelhante a EGF ou domínio 2 semelhante a EGF do polipeptídeo de FVII.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra em contato com um segundo anticorpo monoclonal específico para um epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o epítopo sendo diferente do epítopo identificado por um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano de tipo selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se liguem ao segundo anticorpo monoclonal para formar o primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal detectável que se ligue a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutamico (GLA) de FVII humano de tipo selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue a um primeiro anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do primeiro anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que o segundo epítopo está presente em um domínio 1 semelhante a EGF ou domínio 2 semelhante a EGF do polipeptídeo de FVII.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio intacto de GLA em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra em contato com um segundo anticorpo monoclonal específico para um epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o epítopo sendo diferente do epítopo identificado por um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) intacto de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao segundo anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal detectável que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutamico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue ao primeiro anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do primeiro anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que o cátion divalente é Ca^{2+} presente na faixa de cerca de 0,05 mM a cerca de 50 mM, tal como de cerca de 0,1 mM a cerca de 30 mM, tal como de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, tal como de cerca de 5 mM a cerca de 10 mM.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto em uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) colocar a amostra em contato com um segundo anticorpo monoclonal específico para um epítopo presente no polipeptídeo de FVII, o epítopo sendo diferente do epítopo identificado por um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano de tipo selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao segundo anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo,

c) colocar o primeiro complexo de anticorpo na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente em contato com um primeiro anticorpo monoclonal detectável que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

d) permitir que o primeiro complexo de anticorpo se ligue a um primeiro anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo, e

e) detectar a quantidade do segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade de primeiro anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo, em que a detecção do anticorpo detectável é realizada por um método selecionado a partir de ELISA, ressonância de plasma de superfície e biossensores piezoelétricos.

Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um método para a purificação de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto de uma amostra, o método compreendendo as etapas de:

a) acoplamento de um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico

(GLA) de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente a uma coluna de purificação por imunoafinidade,

b) aplicar a amostra à coluna na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente,

c) eluir os polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de GLA intacto da coluna pela remoção do cátion divalente da coluna,

em que o cátion divalente é Ca^{2+} presente na faixa de cerca de 0,05 mM a cerca de 50 mM, tal como entre cerca de 0,1 mM a cerca de 30 mM, tal como entre cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, tal como entre cerca de 5 mM a cerca de 10 mM.

O termo "domínio 1 semelhante a EGF" como usado aqui significa a seqüência de aminoácidos 46-82 de SEQ ID NO: 1. O termo "domínio 2 semelhante a EGF" como usado aqui significa a seqüência de aminoácidos 87-128 de SEQ ID NO: 1

O enovelamento apropriado e a atividade de FVII são dependentes da presença de cálcio e foi descoberto agora que certos epítopos em FVII são expostos apenas na presença de cátions divalentes tais como íons de cálcio. A presença de íons de metal é essencial para a formação e exposição de epítopos no domínio de GLA reconhecidos pelos anticorpos de acordo com a invenção. Em uma modalidade, o cátion divalente é um íon de metal. Em uma modalidade o cátion divalente é selecionado a partir da lista que consiste em Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Sm^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Sm^{2+}, e Uo^{2+}. Em uma modalidade o cátion divalente é cálcio. Em uma modalidade o cátion divalente é Zn^{2+}. Em uma modalidade o cátion divalente é Mg^{2+}.

A quantidade correta de cátion divalente pode ser facilmente determinada pelo versado na técnica, entretanto, normalmente a concentração de cátion deve ser de pelo menos 0,05 mM, tal como pelo menos 0,1 mM, tal como pelo menos 1 mM.

Em uma modalidade particular, o cátion divalente está presente em uma quantidade acima de 0,05 mM, tal como acima de 0,1 mM, tal como acima de 0,6 mM, tal como acima de 1 mM, tal como acima de 5 mM.

Em uma modalidade particular, o cátion divalente está presente em uma quantidade na faixa de cerca de 0,05 mM a cerca de 50 mM, tal como de cerca de 0,1 mM a cerca de 30 mM, tal como de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, tal como de cerca de 5 mM a cerca de 10 mM.

Em uma modalidade particular, Ca^{2+} está presente em uma quantidade na faixa de 0,05 mM a cerca de 50 mM, tal como de cerca de 0,1 mM a cerca de 30 mM, tal como de cerca de 0,6 mM a cerca de 30 mM, tal como de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, tal como de cerca de 5 mM a cerca de 10 mM.

Anticorpos

A presente invenção fornece novos anticorpos e fragmentos e derivados desses que se ligam ao antígeno com alta afinidade a epítopos presentes em domínios de forma independente do enovelamento apropriado e a anticorpos que se ligam a epítopos expostos no antígeno em um antígeno/polipeptídeo corretamente processado. Esses últimos anticorpos reconhecem epítopos expostos na presença de cálcio.

O termo "anticorpo" como usado aqui refere-se a anticorpos policlonais e monoclonais. Dependendo do tipo de domínio constante nas cadeias pesadas, anticorpos são designados para uma das cinco classes principais: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Várias dessas são ainda divididas em subclasses ou isotipos, tais como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, e semelhantes. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados "alfa", "delta", "épsilon", "gama" e "mu", respectivamente. As estruturas de subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de anticorpos são bem-conhecidas. IgG e/ou IgM são as classes preferidas de anticorpos empregados nessa invenção porque eles são os anticorpos mais comuns na situação fisiológica e porque eles são produzidos mais facilmente em um ambiente laboratorial. Preferivelmente, o anticorpo dessa invenção é um anticorpo monoclonal.

Os anticorpos dessa invenção podem ser produzidos por uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica. Tipicamente, eles podem ser produzidos por imunização de um animal não humano, preferivel-

mente um camundongo, com um imunógeno que compreende o polipeptídeo de FVII.

Alternativamente um anticorpo específico pode ser expresso como proteínas recombinantes. Os anticorpos específicos da presente invenção são pretendidos como exemplos de anticorpos adequados e que podem ser produzidos a partir de seqüências específicas das regiões variáveis, particularmente as regiões hipervariáveis conhecidas como Regiões de Determinação de Complementaridade (CDR). Uma pessoa versada irá a partir da seqüência das regiões de CDR ser capaz de expressar recombinantemente um anticorpo monoclonal completo como também ilustrado nos exemplos.

O polipeptídeo de FVII pode compreender a seqüência de extensão completa, ou um fragmento ou derivado dessa, tipicamente um fragmento imunogênico, isto é, uma porção do polipeptídeo de FVII que compreende um epítopo exposto.

A etapa de imunizar um mamífero não-humano com um antígeno pode ser realizada de qualquer maneira bem-conhecida na técnica para estimular a produção de anticorpos em um camundongo (ver, por exemplo, E. Harlow & D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). O imunógeno é então suspenso ou dissolvido em um tampão, opcionalmente com um adjuvante, tal como adjuvante de Freund completo. Métodos para determinar a quantidade de imunógeno, tipos de tampões e quantidades de adjuvante são bem-conhecidos daqueles versados na técnica e não são limitantes de nenhuma maneira na presente invenção. Esses parâmetros podem ser diferentes para imunógenos diferentes, mas são facilmente elucidados.

De forma semelhante, a localização e freqüência de imunização suficientes para estimular a produção de anticorpos também são bem-conhecidas na técnica. Em um protocolo de imunização típico, os animais não humanos são injetados intraperitonealmente com um antígeno no dia 1 e novamente cerca de uma semana depois. Isso é seguido por injeções de memória (recall) do antígeno em torno do dia 20, opcionalmente com um

adjuvante tal como adjuvante de Freund incompleto. As injeções de memória são realizadas intravenosamente e podem ser repetidas por vários dias consecutivos. Isso é seguido por uma injeção de reforço no dia 40, tanto intravenosamente como intraperitonealmente, tipicamente sem adjuvante. Esse protocolo resulta na produção de células B antígeno-específicas produtoras de anticorpo após cerca de 40 dias. Outros protocolos também podem ser utilizados contanto que eles resultem na produção de células B expressando um anticorpo direcionado para o antígeno usado na imunização.

Para preparação de anticorpo policlonal, o soro é obtido de um animal não humano imunizado e os anticorpos presentes nele são isolados por técnicas bem-conhecidas. O soro pode ser purificado por afinidade usando qualquer um dos grupos de imunógenos descrito acima ligados a um suporte sólido a fim de obter anticorpos que reagem com o polipeptídeo de FVII, particularmente com Fator VIIa.

Em uma modalidade alternativa, linfócitos de um mamífero não-humano não-imunizado são isolados, cultivados *in vitro,* e então expostos ao imunógeno na cultura celular. Os linfócitos são então colhidos e a etapa de fusão descrita abaixo é realizada.

Para anticorpos monoclonais, a próxima etapa é o isolamento de esplenócitos do mamífero não-humano imunizado e a subseqüente fusão desses esplenócitos com uma célula imortalizada a fim de formar um hibridoma produtor de anticorpo. O isolamento de esplenócitos de um mamífero não-humano é bem-conhecido na técnica e envolve tipicamente remover o baço de um mamífero não-humano anestesiado, cortá-lo em pequenos pedaços e comprimir os esplenócitos a partir da cápsula esplênica e através de uma malha de náilon de uma peneira de células para um tampão apropriado a fim de produzir uma única suspensão celular. As células são lavadas, centrifugadas, e ressuspensas em um tampão que lisa qualquer célula vermelha. A solução é centrifugada novamente e os linfócitos remanescentes no precipitado são finalmente ressuspensos em tampão novo.

Uma vez isolados e presentes em uma única suspensão celular, os linfócitos são fundidos a uma linhagem celular imortalizada. Essa é

tipicamente uma linhagem celular de mieloma de camundongo, embora muitas outras linhagens celulares imortais úteis para criar hibridomas sejam conhecidas na técnica. Linhagens de mieloma murino preferidas incluem, mas não são limitadas, às derivadas de tumores de camundongo MOPC-21 e MPC-11 disponíveis pelo Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. U.S.A., células X63 Ag8653 e SP-2 disponíveis pela American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U.S.A. A fusão é efetuada usando polietileno glicol ou semelhante. Os hibridomas resultantes são então cultivados em meio seletivo que contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não têm a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), cujas substâncias evitam o crescimento de células deficientes em HGPRT. Os hibridomas são tipicamente cultivados em uma camada matriz (feeder) de macrófagos. Os macrófagos são preferivelmente de filhotes (littermates) do mamífero não-humano usado para isolar os esplenócitos e são tipicamente primados com adjuvante de Freund incompleto, ou semelhante, vários dias antes do plaqueamento dos hibridomas. Métodos de fusão são descritos em (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células são deixadas crescer no meio de seleção por tempo suficiente para a formação de colônias e produção de anticorpo. Isso ocorre geralmente entre 7 e 14 dias. As colônias de hibridoma são então testadas quanto a produção de anticorpos que se ligam especificamente ao polipeptídeo de FVII. O ensaio é tipicamente um ensaio ELISA colorimétrico, embora qualquer ensaio que possa ser adaptado às cavidades nas quais os hibridomas são cultivados pode ser empregado. Outros ensaios incluem imunoprecipitação e radioimunoensaio. As cavidades positivas para a produção do anticorpo desejado são examinados para determinar se uma ou mais colônias distintas estão presentes. Se mais de uma colônia estiver presente, as células podem ser re-clonadas e cultivadas para garantir que apenas uma

única célula tenha dado origem à colônia que produz o anticorpo desejado. Cavidades positivas com uma única colônia aparente são tipicamente re-clonados e re-testados para garantir que apenas um anticorpo monoclonal está sendo detectado e produzido.

Anticorpos também podem ser produzidos por seleção de bibliotecas combinatórias de imunoglobulinas, como descrito, por exemplo, em Ward *et al.* (Nature 341 (1989) 544).

Produção recombinante

Anticorpos também podem ser preparados por expressão recombinante em organismos unicelulares, tais como levedura; ou em culturas de células bacterianas (tal como em *E. coli*); ou em cultura de célula eucariótica (por exemplo, em uma cultura de células de mamíferos) usando técnicas-padrão.

Dessa forma, de acordo com uma modalidade alternativa, o DNA que codifica as cadeias pesada e leve de um anticorpo anti-FVII é isolado do hibridoma dessa invenção e colocado em um vetor de expressão apropriado para transfecção em um hospedeiro apropriado. O hospedeiro é então usado para a produção recombinante do anticorpo, ou variantes desse, tais como uma versão humanizada daquele anticorpo monoclonal, fragmentos ativos do anticorpo, ou anticorpos quiméricos que compreendem a porção de reconhecimento de antígeno do anticorpo.

O DNA que codifica os anticorpos monoclonais da invenção é facilmente isolado e seqüenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, por usar sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos ou humanos). Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, células de ovário de hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem de outra maneira a proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. A expressão recombinante em bactéria de DNA que codifica fragmentos do anticorpo é bem-conhecida na técnica (veja, por

exemplo, Skerra *et al.,* Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993); e Pluckthun, Immunol. Revs. 130, pp. 151 (1992).

Adicionalmente, a produção recombinante de anticorpos de cadeias pesada variável (VH) e leve variável (VL), e regiões constantes humanas conhecidas foi descrita por, por exemplo, Ruker *et al.* (Annals of the New York Academy of Sci- ences. 1991; 646: 212-219), que relatam a expressão de um anticorpo anti-HIV-1 monoclonal humano em células CHO. Bianchi *et al.* (Biotechnology and Bioengineer- ing. 2003; 84: 439-444), que descrevem alto nível de expressão de anticorpos de extensão completa usando vetores de expressão trans-complementares, No Soo Kim *et al.* (Biotechnol. Prog. 2001; 17: 69-75), que descrevem determinantes chave na ocorrência de variação clonal na expressão de anticorpo humanizado de células CHO durante amplificação gênica mediada por diidrofolato redutase; King *et al.* (Biochemical Journal. 1992; 281: 317-323), que relatam a expressão, purificação e caracterização de um anticorpo quimérico e fragmento Fab' quimérico camundongo-humano; WO 2003064606 que descreve anticorpos monoclonais humanos isolados que compreendem uma região variável de cadeia pesada humana e uma de cadeia leve humana, ambas compreendendo seqüências FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4; e WO 2003040170 que descreve anticorpos monoclonais quiméricos ou humanos e porções de ligação de antígeno desses que se ligam especificamente e ativam CD40 humano.

As seqüências de DNA inteiras que codificam as regiões constantes de IgG humana podem ser encontradas nas seguintes entradas do GenBank, cada uma das quais está incorporada por referência na sua totalidade, acessadas em 6 de janeiro de 2005: Região constante de cadeia pesada de IgG1 humana: acesso do GenBank n°: J00228 Região constante de cadeia pesada de IgG2 humana: acesso do GenBank n°: J00230 Região constante de cadeia pesada de IgG3 humana: acesso do GenBank n°: X04646 Região constante de cadeia pesada de IgG4 humana: acesso do GenBank n°: K01316 Região constante de cadeia leva kappa humana: acesso do GenBank n°: J00241.

Como discutido acima, anticorpos adequados para uso em certos métodos de acordo com a invenção devem ser usados em "pares combinados" significando que os dois anticorpos reconhecem e se ligam a epítopos diferentes sobre o polipeptídeo de FVII. A determinação se anticorpos específicos se ligam a epítopos diferentes pode ser facilmente realizada usando qualquer um de uma variedade ensaios de rastreamento imunológicos nos quais a competição dos anticorpos pode ser avaliada. Todos os tais ensaios são rotina na técnica (veja, por exemplo, Pat. U.S. No. 5.660.827, depositado em 26 de agosto de 1997).

De acordo com as técnicas descritas acima, vários anticorpos monoclonais específicos foram isolados e testados (para detalhes sobre a expressão desses anticorpos veja os exemplos e listagens de seqüências) e três anticorpos, FVII-3F11A3, FVII-3F3A4, e FVII-3F20A1 foram mostrados tendo afinidade muito alta em relação ao domínio alvo que é o domínio de GLA do polipeptídeo de FVII. Esses anticorpos reconhecem epítopos que estão presentes no polipeptídeo de forma dependente de íons de cálcio e são referidos como ligação dependente de cálcio.

Em uma modalidade da invenção o método para determinação das quantidades de polipeptídeos de FVII com um domínio de GLA intacto é realizada usando qualquer um de FVII-3F3A4, FVII-3F11A3, e FVII-3F20A1 como anticorpos monoclonais específicos para um epítopo presente no domínio de GLA.

A seqüência de aminoácidos da cadeia leve variável (VL) do anticorpo FVII-3F3A4 é dada na SEQ ID NO: 3. A seqüência de aminoácidos da cadeia pesada variável (HL) do anticorpo FVII-3F3A4 é dada na SEQ ID NO: 5.

A seqüência de aminoácidos da cadeia leve variável (VL) do anticorpo FVII-3F20A1 é dada na SEQ ID NO: 7. A seqüência de aminoácidos da cadeia pesada variável (HL) do anticorpo FVII-3F20A1 é dada na SEQ ID NO: 9. A seqüência de aminoácidos da cadeia leve variável (VL) do anticorpo FVII-3F11A3 é dada na SEQ ID NO: 11. A seqüência de aminoáci-

dos da cadeia pesada variável (HL) do anticorpo FVII-3F11A3 é dada na SEQ ID NO: 13.

O método da invenção foi descoberto ser muito conveniente para obter uma medida rápida e confiável da qualidade do produto, o peptídeo de FVII, durante a cultura de uma célula hospedeira que produz o polipeptídeo.

Pela aplicação do método da invenção é possível determinar a quantidade de polipeptídeo de FVII funcional, que no presente contexto significa um polipeptídeo de FVII corretamente processado que compreende um domínio de GLA gama carboxilado intacto, assim como a quantidade total do polipeptídeo de FVII presente no líquido da cultura.

Em uma modalidade a presente invenção refere-se portanto a um método para determinar a proporção de polipeptídeo de FVII corretamente processado em relação a quantidade total do polipeptídeo de FVII em uma amostra, que compreende as etapas de:

a) determinar quantidade do polipeptídio de FVII que compreende um domínio de GLA gama-carboxilado que tem uma ligação de dissulfeto entre cys17 e cys22; e

b) determinar a quantidade total do polipeptídeo de FVII presente na amostra.

A proporção de polipeptídeo processado corretamente em relação ao polipeptídeo de FVII total em uma amostra pode assim ser calculada, e a proporção é na presente invenção chamada de índice dependente de cálcio (CDI).

O processamento correto de polipeptídeos que compreendem um domínio gama-carboxilado, domínio de GLA, foi mostrado ser dependente de cálcio, possivelmente para enovelamento correto. Essa alteração conformacional induzida na presença de cálcio poderia expor epítopos no polipeptídeo enovelado que não estão presentes nas formas de pró-peptídeo, formas sem domínio GLA ou formas não-gama carboxiladas do polipeptídeo de FVII.

Em uma modalidade a determinação das diferentes formas do polipeptídeo de FVII é feita pela ligação de anticorpos específicos a domí-

nios diferentes no polipeptídeo e detecção da quantidade dos anticorpos detectados.

Diferentes sistemas de detecção para detectar a ligação de anticorpos a um antígeno alvo são bem-conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, enzimas conjugadas (ELISA) e anticorpos ligados a fluorescência.

Em uma modalidade adicional a presente invenção refere-se portanto a um método para determinar a proporção de um polipeptídeo de FVII corretamente processado em relação a quantidade total do polipeptídio de FVII em uma amostra, em que a quantidade do polipeptídeo de FVII que compreende um domínio de GLA corretamente processado, e a quantidade total do polipeptídeo de FVII presente na amostra são determinadas pela detecção da ligação de um anticorpo detector específico direcionado contra um epítopo exposto na presença de Ca^{2+} sobre o domínio de GLA corretamente processado no polipeptídio de FVII e pela detecção da ligação de outro anticorpo de detector específico direcionado contra outro epítopo em um domínio diferente no polipeptídeo de FVII, respectivamente.

Caso uma técnica "sanduíche" seja empregada, na qual um anticorpo ou anticorpos de captura imobilizados sobre um suporte sólido são aplicados junto com um anticorpo ou anticorpos detectores, várias combinações possíveis de anticorpos podem ser consideradas.

Em uma modalidade o anticorpo de captura poderia ser qualquer anticorpo que tem uma alta afinidade em relação ao antígeno/polipeptídeo e cujo anticorpo se ligará a todas ou a maioria das formas do polipeptídeo de FVII. Tal anticorpo poderia, por exemplo, se ligar a epítopos no domínio semelhante a EGF do polipeptídeo de FVII; os anticorpos detectores deveriam então ser capazes de discriminar entre as diferentes formas presentes e um dos anticorpos detectores deveria ser específico para um epítopo exposto sobre um domínio de GLA na presença de Ca^{2+} e outro anticorpo detector deveria ser específico para um epítopo sobre um domínio que não é um domínio de GLA e cujo epítopo sobre o domínio não-GLA é diferente do epítopo reconhecido pela anticorpo de captura.

A detecção de ligação dos anticorpos de detecção, que mede o antígeno corretamente processado ou o total é realizada de forma conveniente em duas amostras separadas como será o caso quando uma técnica de ELISA sanduíche for usada, entretanto, realizar a detecção de ambos os anticorpos de detecção na mesma amostra poderia ser considerado no caso onde uma molécula fluorescente sobre o anticorpo de detecção é medida diretamente. Seria então necessário usar dois comprimentos de onda diferentes.

Quando, por outro lado, dois anticorpos de captura diferentes são aplicados no método, duas amostras separadas são sempre empregadas. Nesse caso os dois anticorpos de captura são um anticorpo de captura específico para um epítopo exposto sobre um domínio-GLA na presença de Ca^{2+} e outro anticorpo de captura específico para um primeiro epítopo em um domínio que não é um domínio-GLA, e o anticorpo de detecção é um anticorpo específico para um segundo epítopo em um domínio que não é um domínio-GLA, em que o segundo epítopo é diferente do primeiro epítopo.

Como um exemplo uma modalidade poderia ser F1 e F9 como anticorpos de captura e F7 como anticorpo de detecção.

Como descrito acima, uma maneira de detectar a ligação do anticorpo de detecção é por ELISA, no qual um anticorpo conjugado a uma enzima é empregado e a quantidade de anticorpo ligado é determinada por um ensaio colorimétrico. Particularmente o ELISA é um ELISA sanduíche. Entretanto, outros meios para detectar ligação de anticorpo podem ser empregados.

Uma técnica bem-conhecida para monitorar interações biomoleculares é por ressonância de plasma de superfície (SPR). Ressonância de plasma de superfície é um fenômeno que ocorre quando a luz é refletida de finos filmes de metal. Uma fração da energia de luz incidente em um ângulo exatamente definido pode interagir com elétrons deslocalizados no filme de metal (plasma) assim reduzindo a intensidade de luz refletida. O ângulo preciso de incidência no qual isso ocorre é determinado por vários fatores, mas nos aparelhos da Pharmacia BIAcore o determinante principal se torna o índice refrativo próximo da parte posterior do filme de metal, a qual molécu-

las alvo são imobilizadas e direcionadas por ligantes em uma fase móvel que corre pela célula de fluxo. Se a ligação ao alvo imobilizado ocorre, o índice refrativo local muda, levando a uma mudança no ângulo de SRP, que pode ser monitorado em tempo real pela detecção de mudanças na intensidade da luz refletida, produzindo um sensorgrama. As taxas de alteração do sinal de SPR podem ser analisadas para produzir constantes de taxa aparente para as fases de associação e dissociação da reação. A razão desses valores dá a constante de equilíbrio aparente (afinidade). O tamanho da alteração no sinal de SPR é diretamente proporcional à massa que está sendo imobilizada e assim pode ser interpretado de forma bruta em termos da estequiometria da interação. Os sinais são facilmente obtidos a partir de quantidade de sub-micrograma de material. Já que o sinal de SPR depende apenas da ligação do molde imobilizado, é possível estudar eventos de ligação de moléculas em extratos, isto é, não é necessário ter componentes altamente purificados.

Interações biomoleculares que ocorrem na superfície do sensor alteram a concentração de soluto e assim o índice refrativo dentro da faixa de penetração da onda evanescente. O ângulo de incidência necessário para criar o fenômeno de SPR (o ângulo de SPR) é, portanto alterado e essa é a alteração que é medida no sinal de resposta. SPR fornece assim um detector de massa que é essencialmente independente da natura dos elementos que interagem. A técnica não requer marcação.

Outros meios possíveis adequados para detectar interações entre anticorpo e antígeno são biossensores piezoelétricos nos quais o parâmetro que é medido é resistência, corrente ou voltagem. O alvo, o polipeptídeo de FVII, é imobilizado sobre um cantiléver montado no resistor pieso, e a ligação do anticorpo de detecção induzirá um dobramento que tenciona o resistor piezo e assim altera o valor do resistor. Outro meio possível de detecção pode ser facilmente considerado por uma pessoa versada, por exemplo, biossensores-SAW (ondas acústicas de superfície) etc.

Em uma modalidade, portanto, a detecção de ligação do anticorpo/anticorpos de detecção é realizada por ELISA, ressonância de plasma de superfície, biossensores piezoelétricos ou biossensores-SAW.

O CDI da invenção pode ser determinado para qualquer proteína que tem um domínio de GLA, o processamento correto da qual se correlaciona com a atividade da proteína e em que o enovelamento apropriado é afetado pela presença de cálcio. Tais proteínas incluem o Fator VII, VIIa, IX, IXa, X, Xa, proteína C, proteína S, proteína Z, osteocalcina, proteína de matriz de GLA, proteínas de GLA ricas em prolina 1 e 2.

O método de calcular o CDI tem a vantagem de que formas indesejáveis do polipeptídeo, por exemplo, Fator VIIa, tal como FVII sem domínio de GLA, pro-FVII, FVII não-gama carboxilado e outras formas de FVII com domínio de GLA degradado, que poderiam ser detectadas em um ELISA sanduíche normal, podem ser discriminadas e assim um indicador de qualidade da cultura pode ser obtido.

Foi surpreendentemente descoberto que o índice CDI durante a produção de FVII varia bastante durante o período de cultura e o conhecimento do CDI é, portanto de grande importância para se obter o melhor rendimento do produto.

Um segundo aspecto da invenção refere-se, portanto a um uso do método da invenção para otimizar o rendimento do polipeptídeo de FVII funcional durante a produção.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Produção recombinante de anticorpos

Em uma modalidade exemplar, para produzir mAb recombinante a partir de seqüências de VH e VL de anticorpos de FVII, o seguinte protocolo pode ser aplicado. As etapas 1-3 descrevem a recuperação das regiões VH e VL de um hibridoma ou outra célula que produz anticorpo monoclonal de FVII. Alternativamente, o cDNA que codifica as seqüências de VH e VL do anticorpo de FVII a ser usado na etapa 4, pode ser preparado a partir da informação da seqüência fornecida na Figura 2, usando técnicas bem estabelecidas para a síntese de fragmentos de cDNA. Os fragmentos de VH

e VL do anticorpo desejado, ou mutantes ou derivados desses, também podem ser clonados em qualquer um de vários vetores de expressão descritos na literatura científica ou vetores de expressão disponíveis comercialmente, que contêm uma região constante da subclasse de Ig desejada, a fim de expressar um anticorpo de extensão completa. Adicionalmente, fragmentos de VH e VL do anticorpo desejado ou mutantes ou derivados disso podem ser clonados em vetores que codificam regiões constantes truncadas a fim de expressar fragmentos de anticorpo (por exemplo, fragmentos Fab). Um exemplo de um vetor disponível comercialmente é pASK84, disponibilizado pela ATCC (American Type Culture Collection, número de catálogo 87094).

(1) Isolamento de RNA total de células de hibridoma:

$4x10^6$ células de hibridoma secretando anticorpos contra FVII são usadas para o isolamento de RNA total usando o RNeasy Mini Kit da Qiagen de acordo com as instruções do fabricante, e resumidamente descritas aqui: As células são precipitadas por centrifugação por 5 min a 1000 rpm e rompidas pela adição de 350 µl de tampão RTL contendo 10 µl/ml de β-mercaptoetanol. O lisado é transferido para uma coluna QIAshredder da Qiagen e centrifugado por 2 min em velocidade máxima. O filtrado ("flow-through") é misturado com um volume igual de etanol a 70%. Até 700 µl da amostra são aplicados por coluna RNeasy spin (Qiagen) e centrifugado a 14000 rpm, e o filtrado é descartado. 700µl de tampão RW1 são aplicados por coluna que é centrifugada a 14000 rpm. por 15s para lavar a coluna. A coluna é lavada duas vezes com 500 µl de tampão RPE e centrifugada a 14000 rpm por 15s. Para secar a coluna, ela é centrifugada por 2 min adicionais a 14000 rpm. A coluna é transferida para um novo tubo coletor e o RNA é eluído com 50 µl de água livre de nuclease e centrifugada por 1 min a 14000 rpm. A concentração de RNA é medida por absorbância em OD=260 nm. O RNA é armazenado a -80^0C até ser necessário.

(2) Síntese de cDNA:

1 µg de RNA é usado para a síntese da primeira fita de cDNA usando o Kit SMART RACE cDNA Amplification da Clontech. Para a preparação de cDNA 5'-RACE-Ready, uma mistura de reação é preparada con-

tendo RNA isolado como descrito acima, e o iniciador reverso 5'-CDS primer back, e SMART II A oligo e essa mistura é incubada a 72ºC por cerca de 2 min e subseqüentemente resfriada em gelo por cerca de 2 min. Antes de adicionar o tampão "First-Strand" 1x, DTT (20 mM), dNTP (10 mM) e Transcriptase Reversa PowerScript. A mistura da reação é incubada a 42ºC por 1,5 horas e o tampão Tricina-EDTA é adicionado e incubado a 72ºC por 7 min. Nesse ponto, as amostras podem ser armazenadas a -20ºC.

(3) Amplificação por PCR e clonagem de cadeias leve variável humana (VL) e pesada variável humana (VH):

Uma mistura de reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) contendo uma mistura de tampão Advantage HF 2 PCR 1x, dNTP (1 mM) e polimerase Advantage HF 2 1x é estabelecida para separar a amplificação de regiões variáveis de de VL e VH do cDNA feito como acima.

Para amplificação de VL os seguintes iniciadores são usados:

UPM (Mistura Universal de Iniciador):
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 14)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 15)
VK RACE2:
5'-GCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTC-3' (SEQ ID NO: 16)

Para amplificação de VH os seguintes iniciadores são usados:
UPM (Mistura Universal de Iniciador):
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO: 17)
5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 18)
AB90RACE:
5'-GTGCCAGGGGGAAGACCGATGGG-3' (SEQ ID NO: 19)

Três rodadas de PCR são conduzidas. Rodada 1: PCR é corrido por 5 ciclos a 94 ºC por 5s e 72 ºC por 3 min. Rodada 2: PCR é corrido por 5 ciclos a 94 ºC por 5s, 70 ºC por 10s, e 72 ºC por 1 min. Rodada 3: PCR é corrido por 28 ciclos a 94 ºC por 5s, 68 ºC por 10s, e 72 ºC por 1 min.

Os produtos de PCR são analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e o DNA purificado a partir do gel usando o kit de extração de gel de agarose QIAEXII da Qiagen. Os produtos de PCR purificados são introduzidos no vetor PCR4-TOPO usando o kit TOPO TA Cloning da Invitrogen e usados para a transformação de células competentes TOP 10.

Uma quantidade adequada de colônias são analisadas por PCR de colônia usando Taq polimerase, tampão de Taq polimerase 1x, dNTP (10 mM) e os seguintes iniciadores e programa de PCR:

Iniciador M13 direto: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 20)

Iniciador M13 reverso: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO: 21)

Programa de PCR:

25 ciclos são corridos a 94 ºC por 30s, 55 ºC por 30s, e 72 ºC por 1 min. DNA plasmidial dos clones que compreendem insertos de VL e VH, respectivamente, é extraído e seqüenciado usando o iniciador M13 direto e M13 reverso listados acima. No caso de um mAb de FVII, as seqüências que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve são mostradas na Figura 2.

(4) Subclonagem de genes de anticorpo em vetores de expressão de mamíferos:

Baseado nos dados de seqüência para cDNAs que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada e leve de mAb, iniciadores são desenhados para amplificação dos genes da cadeia leve variável (VL) e pesada variável (VH), respectivamente. As regiões variáveis são formatadas por PCR para incluir uma seqüência de Kozak, seqüência líder e sítios únicos de enzima de restrição. Para a VL, isso é obtido pelo desenho de iniciadores de PCR 5' para introduzir um sítio HindIII, a seqüência de Kozak e para ser homólogos à extremidade 5' da seqüência líder da região da cadeia leve variável. O iniciador 3' é homólogo a extremidade 3' da região variável e introduziu um sítio BsiWI no limite 3' da região variável. A região VH é gerada de uma maneira similar exceto que um sítio NotI e NheI são introduzidos em 5' e 3' em vez de HindIII e BsiWI, respectivamente.

Os produtos gênicos amplificados são clonados em um vetor de expressão eucariótico que contém as regiões constantes da cadeia leve e pesada, usando técnicas-padrão. Os fragmentos de DNA de VL são digeridos com HindIII e BsiWI e ligados em um vetor de expressão eucariótico que contém o gene de beta-lactamase que codifica a resistência a ampicilina e uma origem de replicação de *E. coli* (pUC); o plasmídeo resultante é designado VLCL. Os fragmentos de DNA de VH são digeridos com NotI e NheI e introduzidos no vetor de VLCL que resulta da introdução de fragmento VL como descrito acima. O plasmídeo resultante contém cassetes de expressão funcionais que codificam ambas as cadeias pesada e leve do anticorpo do mesmo plasmídeo. O plasmídeo ligado é usado para transformar *E. coli*. DNA de plasmídeo é preparado a partir dessas populações bacterianas resistentes a ampicilina e usado para transfecção em células de ovário de hamster chinês ou outras linhagens celulares de mamífero. Transfecção e cultura celular são feitas por métodos padronizados, como descrito por exemplo em "Molecular Cloning", Sambrook *et al.* O resultado são linhagens celulares transfectadas que expressam e secretam estavelmente a molécula do anticorpo de interesse, tal como FVIImAb ou um mAb que compreende as regiões VH e VL de Ab de FVII.

Variantes do anticorpo podem ser geradas facilmente. Por exemplo, um anticorpo com exatamente a mesma especificidade que, por exemplo, FVII-3F11A3, FVII-3FA4 e FVII-3F20A1, mas de um isotipo diferente de IgG4, pode ser obtido pela subclonagem do cDNA que codifica VL e VH do Ab de interesse em plasmídeos que contêm cDNA que codifica as regiões constantes kappa da cadeia leve e as regiões constantes de IgG1, IgG2 ou IgG3. Dessa forma, um anticorpo assim gerado pode possuir qualquer isotipo e o anticorpo pode então ter o isotipo trocado usando técnicas convencionais. Tais técnicas incluem o uso de técnicas recombinantes diretas (veja, por exemplo, Patente US 4.816.397), técnicas de fusão célula-célula (veja, por exemplo, Patente US 5.916.771) e outras técnicas adequadas conhecidas. Conseqüentemente, a função efetora de anticorpos fornecidos pela invenção pode ser "trocada" com relação ao isotipo de um anticorpo

parental pela troca de isotipo para, por exemplo, um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, ou IgM para vários usos, incluindo aqueles terapêuticos.

Exemplo 2. Determinação da concentração total de Fator VIIa em uma amostra por ELISA sanduíche.

A determinação da concentração total do Fator VII em uma amostra pode ser determinada por um ELISA sanduíche usando dois anticorpos monoclonais contra dois epítopos diferentes, tais como anticorpos anti-domínios EGF.

Uma microplaca de 96 cavidades (placa C96 maxisorp Nunc-Immuno de Nalgene Nunc International) foi revestida durante a noite a 4ºC com 1 µg de F9 monoclonal anti-FVII (primário) em 100 µl de tampão de revestimento ($NaHCO_3$ 0,1 M, pH 9.8) por cavidade. Após a incubação, a placa foi lavada 4 vezes usando 350 µl de tampão de lavagem (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, Tween 80 0,02%, pH 7.4). Após a lavagem, os cavidades foram bloqueados por 2,5 horas, usando 350 µl de tampão de bloqueio (Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, BSA 1%, Tween 80 0,02%). O bloqueio foi realizado usando uma placa agitadora em temperatura ambiente.

100 µl, 1 µg/ml de anti-FVII monoclonal F7 (secundário) conjugado a peroxidase foram adicionados a cada cavidade.

As amostras foram diluídas para aproximadamente 20 ng de FVII/ml em um tampão de diluição (Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, BSA 2 mg/ml, Tween 80 0,02%) e 20 µl foram aplicados nas respectivas cavidades. Uma série padrão de duplicatas a 0, 5, 10, 20, 30 e 50 ng/ml e uma série de controles também foram adicionadas. Após a aplicação, a placa foi incubada por duas horas a temperatura ambiente em uma placa agitadora.

O esquema da placa foi configurado como se segue:

Tabela 1. Esquema da placa de ELISA. Std xx = padrão xx ng/ml, C = controle, U = amostra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bran-co	Std30	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std20
B	Bran-co	Std30	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std20
C	Std5	Std50	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Bran-co	Std30
D	Std5	Std50	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Bran-co	Std50
E	Std10		U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std5	Std50
F	Std10		U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std5	Std50
G	Std20	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std10	

Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes usando 350 µl de tampão de lavagem (Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, Tween 80 0,02%, pH 7.4). 100 µl de substrato (OPD (orto-fenilendiamina) 100 mM, H_2O_2 1 mM em NaAc 50 mM, $CaCl_2$ 1mM, pH 5.2) foram adicionados a cada cavidade e a placa foi deixada desenvolver sobre uma placa agitadora em temperatura ambiente e paralisada pela adição de H_2SO_4 1,25 M uma vez que o controle maior tenha alcançado uma OD de aproximadamente 1,2. A placa foi lida em um leitor de placa de ELISA usando um filtro de 492 nm.

A curva-padrão mostrada na Figura 3 foi usada para determinar as concentrações de FVII em cavidades individuais.

Exemplo 3. Controle de parâmetros de produção para a produção de Fator VIIa ativo.

Uma cultura celular em lote ou contínua pode ser monitorada quanto a sua produção total de FVII usando o ELISA para FVII padrão descrito no Exemplo 2. O conteúdo específico e, portanto, a produção de FVII que inclui um domínio intacto de GLA pode ser determinado usando o seguinte ensaio ELISA sanduíche, baseado em um anticorpo contra o domínio de GLA e um anticorpo contra outro epítopo de FVII.

Uma microplaca de 96 cavidades (placa C96 maxisorp Nunc-Immuno de Nalgene Nunc International) foi revestida durante a noite a 4ºC com 5 µg de anti-FVII monoclonal F1 (primário) em 100 µl de tampão de revestimento (F1A2 50 µg/ml, Hepes 20 mM, NaCl 100 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 7.4) por cavidade. Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes usando

350 µl de tampão de lavagem (Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, BSA 1%, Tween 80 0,02%). O bloqueio levou 2,5 horas e foi realizado usando uma placa agitadora em temperatura ambiente.

100 µl, 1 µg/ml de anti-FVII monoclonal F7 (secundário) conjugado a peroxidase foram adicionados a cada cavidade.

As amostras foram diluídas para aproximadamente 75 ng de FVII/ml em tampão de diluição (Hepes 20 mM, pH 7.4, NaCl 0,1 M, $CaCl_2$ 10 mM, BSA 2 mg/ml, Tween 80 0,02%) e 20 µl foram aplicados nos respectivos cavidades. Uma série padrão de duplicatas a 0, 20, 30, 50, 80, 100 e 130 ng/ml e uma vários controles também foram adicionadas. Após a aplicação, a placa foi incubada por duas horas a temperatura ambiente em uma placa agitadora.

O esquema da placa foi configurado como se segue:

Tabela 2. Esquema da placa de ELISA. Std xx = padrão xx ng/ml, C = controle, U = amostra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco	Std80	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std50
B	Branco	Std80	C2	U3	U7	U11	U15	U19	U23	U27	C3	Std50
C	Std20	Std100	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Branco	Std80
D	Std20	Std100	C3	U4	U8	U12	U16	U20	U24	U28	Branco	Std80
E	Std30	Std130	U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std20	Std100
F	Std30	Std130	U1	U5	U9	U13	U17	U21	U25	C1	Std20	Std100
G	Std50	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std30	Std130
H	Std50	C1	U2	U6	U10	U14	U18	U22	U26	C2	Std30	Std130

Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes usando 350 µl de tampão de lavagem (Hepes 20 mM, NaCl 0,1M, $CaCl_2$ 10 mM, Tween 80 0,02%, pH 7.4). 100 µl de substrato (OPD (orto-fenilendiamina) 100 mM, H_2O_2 1 mM em NaAc 50 mM, $CaCl_2$ 1mM, pH 5.2) foram adicionados a cada cavidade e a placa foi deixada desenvolver sobre uma placa agitadora em temperatura ambiente e paralisada pela adição de H_2SO_4 1,25 M uma vez que o controle maior tenha alcançado uma OD de aproximadamente 1,2. A placa foi lida em um leitor de placa de ELISA usando um filtro de 492 nm.

A curva-padrão mostrada na Figura 4 foi usada para determinar as concentrações de FVII nos cavidades individuais.

Exemplo 4. O uso de CDI para monitorar culturas de FVII

O Índice Dependente de Cálcio (CDI) é definido como a razão entre FVII que responde no ELISA usando pelo menos um anticorpo específico para o domínio de GLA (por exemplo, FVII- 3F11A3, FVII-3F3A4, ou FVII-3F20A1) e o FVII total que responde em um ELISA usando qualquer outro anticorpo tais como anti-EGF (por exemplo, F7 ou F9).

Exemplo 5. Uso de anticorpo para purificação por imunoafinidade.

Realizar purificação por imunoafinidade na presença de Ca^{2+} 20 mM

Uma porção de 1000 ml de sobrenadante de cultura de BHK-21, estabilizada pela adição de cálcio para uma concentração de Ca^{2+} 10 mM e pela adição de tampão tris para uma concentração de 10 mM e subseqüente ajuste com HCl para pH 8, é filtrada através de um filtro sem saída de 0,45 mícron. O sobrenadante da cultura estabilizado é aplicado em uma coluna (diâmetro interno de 1,6 cm x 10 cm de comprimento = CV de 20 ml) empacotada com um anticorpo monoclonal FVII-3F3A4 dependente de Ca^{2+}, imobilizado em Pharmacia Sepharose 4B. Antes da aplicação, a coluna é equilibrada com 5 CVs de $CaCl_2$ 10 mM, Tris 10 mM, pH 8. Após a aplicação, a coluna é lavada com NaCl 2 M, $CaCl_2$ 10 mM, Tris 10 mM, pH 8 para 10 CVs. O FVII ligado é eluído com 10 CVs de EDTA 30 mM, Tris 50 mM, pH 8. Uma taxa de fluxo de 12 CV/h e uma temperatura de 5 graus Celsius são usadas durante a purificação. O eluato é imediatamente estabilizado pela adição de cloreto de cálcio para uma concentração final de 50 mM.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo presente em um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico de FVII humano selvagem apenas na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente.

2. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 1, no qual o dito epítopo compreende um ou mais dos resíduos de aminoácidos Phe4, Leu5, Gla6, Gla7, Leu8, Pro10, Gly11, Gla14, Arg15, Gla16, Cys17, Gla19, Gla20, Cys22, Gla25, Gla26, Ala27, Gla29, Phe31, Lys32, Gla35 da SEQ ID N0.: 1.

3. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2, cujo anticorpo monoclonal compete com um anticorpo que compreende:

(a) uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 3 e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 5;

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 7 e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 9; ou

(c) uma região variável de cadeia leve que compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 11 e uma região variável de cadeia pesada que compreende a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 13.

4. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, cujo anticorpo monoclonal compreende:

(a) uma região variável CDR1 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 24-34 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 3, uma região variável CDR2 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 50-56 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 3, uma região variável CDR3 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 89-95 da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 3 e uma região variável CDR1 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos

33-35 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 5, uma região variável CDR2 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 50-64 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 5, uma região variável CDR3 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 99-112 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 5;

(b) uma região variável CDR1 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 24-34 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 7, uma região variável CDR2 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 50-56 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 7, uma região variável CDR3 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 89-95 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 7 e uma região variável CDR1 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 33-35 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 9, uma região variável CDR2 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 50-64 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 9, uma região variável CDR3 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 99-112 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 9 ou

(c) uma região variável CDR1 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 24-34 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 11, uma região variável CDR2 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 50-56 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 11, uma região variável CDR3 de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 89-95 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 11 e uma região variável CDR1 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 33-35 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 13, uma região variável CDR2 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de ami-

noácido que corresponde aos resíduos 50-64 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 13, uma região variável CDR3 de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácido que corresponde aos resíduos 99-112 da seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 13.

5. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, cujo anticorpo monoclonal compreende:

(a) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO.: 3 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO.: 5;

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO.: 7 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO.: 9 ou

(c) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO.: 11 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos pelo menos 50% idêntica a SEQ ID NO.: 13.

6. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, cujo anticorpo monoclonal compreende:

(a) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 3 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 5;

(b) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 7 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 9 ou

(c) uma região variável de cadeia leve que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.: 11 e uma região variável de cadeia pesada que compreende uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO.:13.

7. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das rei-

vindicações 1-5, cujo anticorpo monoclonal é um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4.

8. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, cujo anticorpo monoclonal é um anticorpo IgG4.

9. Molécula de ácido nucléico que codifica o anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores.

10. Vetor que compreende a molécula de ácido nucléico como definida na reivindicação 9.

11. Célula que compreende o vetor definido na reivindicação 10.

12. Método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio de ácido gama-carboxiglutâmico intacto em uma amostra, o dito método compreendendo as etapas de:

(a) colocar a amostra em contato com um primeiro anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-8 na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

(b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue a esse dito primeiro anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo;

(c) colocar o dito primeiro complexo de anticorpo em contato com um segundo anticorpo monoclonal detectável específico para um segundo epítopo presente no dito polipeptídeo de FVII, o dito segundo epítopo sendo diferente do epítopo do dito primeiro anticorpo monoclonal;

(d) permitir que o dito primeiro complexo de anticorpo se ligue ao dito segundo anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo; e

(e) detectar a quantidade do dito segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do segundo anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo.

13. Método para determinar a quantidade de polipeptídeos de FVII que compreendem um domínio intacto de ácido gama-carboxiglutâmico em uma amostra, o dito método compreendendo as etapas de:

(a) colocar a amostra em contato com um segundo anticorpo

monoclonal específico para um epítopo presente no dito polipeptídeo de FVI-I, o dito epítopo sendo diferente do epítopo identificado por um anticorpo monoclonal como definido em qualquer uma das reivindicações 1-8;

(b) permitir que qualquer um dos polipeptídeos de FVII presentes na amostra se ligue ao dito segundo anticorpo monoclonal para formar um primeiro complexo de anticorpo;

(c) colocar o dito primeiro complexo de anticorpo em contato com um primeiro anticorpo monoclonal detectável como definido em qualquer uma das reivindicações 1-8 na presença de pelo menos 0,05 mM de um cátion divalente;

(d) permitir que o dito primeiro complexo de anticorpo se ligue ao dito primeiro anticorpo monoclonal detectável para formar um segundo complexo de anticorpo; e

(e) detectar a quantidade do dito segundo complexo de anticorpo pela detecção da quantidade do primeiro anticorpo monoclonal presente no segundo complexo de anticorpo.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 ou 13, em que o segundo epítopo está presente no domínio 1 semelhante a EGF ou domínio 2 semelhante a EGF do dito polipeptídeo de FVII.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 12-14, em que o dito cátion divalente é selecionado do grupo que consiste em Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Sm^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}, Sm^{2+}, Hg^{2+} e Uo^{2+}.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o dito cátion divalente é Ca^{2+}.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 - 16, em que o dito cátion divalente está presente em uma quantidade acima de 0,05 mM, tal como acima de 0,1 mM, tal como acima de 0,6 mM, tal como acima de 1 mM, tal como acima de 5 mM.

18. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-17, em que o dito cátion divalente está presente em uma quantidade na faixa de cerca de 0,05 mM a cerca de 50 mM, tal como de cerca de 0,1 mM a cerca de 30 mM, tal como de cerca de 0,6 mM a cerca de 30 mM, tal como de cerca de 1

Fig.1

A seqüência de aminoácido do Fator VII da coagulação humano nativo (SEQ ID NO: 1)

```
Ala-Asn-Ala-Phe-Leu-GLA-GLA-Leu-Arg-Pro-Gly-Ser-Leu-GLA-Arg-GLA-Cys-Lys-
                5                  10                  15

GLA-GLA-Gln-Cys-Ser-Phe-GLA-GLA-Ala-Arg-GLA-Ile-Phe-Lys-Asp-Ala-GLA-Arg-
     20                  25                  30                  35

Thr-Lys-Leu-Phe-Trp-Ile-Ser-Tyr-Ser-Asp-Gly-Asp-Gln-Cys-Ala-Ser-Ser-Pro-
            40                  45                  50

Cys-Gln-Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Lys-Asp-Gln-Leu-Gln-Ser-Tyr-Ile-Cys-Phe-Cys-
 55                 60                  65                  70

Leu-Pro-Ala-Phe-Glu-Gly-Arg-Asn-Cys-Glu-Thr-His-Lys-Asp-Asp-Gln-Leu-Ile-
         75                  80                  85                  90

Cys-Val-Asn-Glu-Asn-Gly-Gly-Cys-Glu-Gln-Tyr-Cys-Ser-Asp-His-Thr-Gly-Thr-
                95                  100                 105

Lys-Arg-Ser-Cys-Arg-Cys-His-Glu-Gly-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ala-Asp-Gly-Val-Ser-
    110                 115                 120                 125

Cys-Thr-Pro-Thr-Val-Glu-Tyr-Pro-Cys-Gly-Lys-Ile-Pro-Ile-Leu-Glu-Lys-Arg-
            130                 135                 140

Asn-Ala-Ser-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Ile-Val-Gly-Gly-Lys-Val-Cys-Pro-Lys-Gly-
145                 150                 155                 160

Glu-Cys-Pro-Trp-Gln-Val-Leu-Leu-Leu-Val-Asn-Gly-Ala-Gln-Leu-Cys-Gly-Gly-
        165                 170                 175                 180

Thr-Leu-Ile-Asn-Thr-Ile-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Asp-Lys-Ile-
                185                 190                 195

Lys-Asn-Trp-Arg-Asn-Leu-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-His-Asp-Leu-Ser-Glu-His-
    200                 205                 210                 215

Asp-Gly-Asp-Glu-Gln-Ser-Arg-Arg-Val-Ala-Gln-Val-Ile-Ile-Pro-Ser-Thr-Tyr-
            220                 225                 230

Val-Pro-Gly-Thr-Thr-Asn-His-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-His-Gln-Pro-Val-
235                 240                 245                 250

Val-Leu-Thr-Asp-His-Val-Val-Pro-Leu-Cys-Leu-Pro-Glu-Arg-Thr-Phe-Ser-Glu-
        255                 260                 265                 270

Arg-Thr-Leu-Ala-Phe-Val-Arg-Phe-Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Trp-Gly-Gln-Leu-Leu-
                275                 280                 285

Asp-Arg-Gly-Ala-Thr-Ala-Leu-Glu-Leu-Met-Val-Leu-Asn-Val-Pro-Arg-Leu-Met-
    290                 295                 300                 305 306

Thr-Gln-Asp-Cys-Leu-Gln-Gln-Ser-Arg-Lys-Val-Gly-Asp-Ser-Pro-Asn-Ile-Thr-
            310                 315                 320
```

Fig.1 (Cont.)

```
Glu-Tyr-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Ser-Asp-Gly-Ser-Lys-Asp-Ser-Cys-Lys-Gly-
325                 330                 335                 340

Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-His-Ala-Thr-His-Tyr-Arg-Gly-Thr-Trp-Tyr-Leu-Thr-Gly-
        345                 350                 355                 360

Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Gln-Gly-Cys-Ala-Thr-Val-Gly-His-Phe-Gly-Val-Tyr-Thr-
                365                 370                 375

Arg-Val-Ser-Gln-Tyr-Ile-Glu-Trp-Leu-Gln-Lys-Leu-Met-Arg-Ser-Glu-Pro-Arg-
    380                 385                 390                 395

Pro-Gly-Val-Leu-Leu-Arg-Ala-Pro-Phe-Pro
            400                 405 406
```

Fig.2

Anticorpo monoclonal FVII-3F3A4

> Seqüência de nucleotídeos das cadeias leves variáveis maduras de FVII-3F3A4 (SEQ ID NO: 2)

gacatccagatgaaccagtctccatccagtctgtctgcatcccttggagacacaattaccatcacttgcc
atgccagtcagaacattaatgtttggttaagctggtaccagcagaaaccaggaaatattcctaaagaatt
gatctataaggcttccaacttgcacacaggcgtcccatcaaggtttagtggcagtggatctggaacacgt
ttcacattaaacatcagcagcctgcagcctgaagacattgccacttactactgtcaacagggtcaaagtt
ctcctctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgg

> Tradução das cadeias leves variáveis maduras de FVII-3F3A4 (SEQ ID NO: 3)

DIQMNQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLSWYQQKPGNIPKELIYKASNLHTGVPSRFS
GSGSGTRFTLNISSLQPEDIATYYCQQGQSSPLTFGAGTKLELKR

> Seqüência de nucleotídeo das cadeias pesadas variáveis maduras de FVII-3F3A4 (SEQ ID NO: 4)

gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcag
cctctggattcgctttcagtagttatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggctggagtg
ggtcgcatacattagtagtggtggtggtaacacctactatccagactctgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaagtctgaggacacagccatgt
attactgtgcaagacatgaggtagtagcctattactatggtatggactactggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcctca

> Tradução das cadeias pesadas variáveis maduras de FVII-3F3A4 (SEQ ID NO: 5)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTIYNMHWIKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSY
NQKFKGKATLTADRSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARADDGFDYWGQGTTLTVSS

Anticorpo Monoclonal FVII-3F20A1

> Seqüência de nucleotídeo das cadeias leves variáveis maduras de FVII-3F20A1 (SEQ ID NO: 6)

gacatcctgatgacccaatctccatcctccatgtctgtatctctgggagacacagtcagcatcacttgcc
aagcaagtcagggcattagcagtaatatagggtggttgcagcagaaaccagggaaatcatttaagggcct
ggtctatcatgcaaccaacttggatgatggagttccatcaaggttcagtggcagtggatctggagcagat
tattctctcaccatcaccagcctggaatctgaagattttgcagactattactgtgtacagtatgctcagt
ttccgctcacgttcggtgttgggaccaaactggagctgaaacgg

> Tradução de cadeias leves variáveis maduras de FVII-3F20A1 (SEQ ID NO: 7)

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCQASQGISSNIGWLQQKPGKSFKGLVYHATNLDDGVPSRF
SGSGSGADYSLTITSLESEDFADYYCVQYAQFPLTFGVGTKLELKR

> Seqüência de nucleotídeo das cadeias pesadas variáveis maduras de FVII-3F20A1 (SEQ ID NO: 8)

caggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacagagcctgtccatcacatgcactg
tctcagggttctcattaaccacctatggtgtaagttggcttcgccagcctccaggaaagggtctggagtg
gctgggactaatatggggtgacgggagcacaaattatcattcagctctcatatccagactgaccatcagc
aaggataactccaagagccaagttttcttaaaactgaacagtctgcacactgatgacacagccacgtact
actgtgccaaacagggaatcacattcttttcttactggggccaagggactctggtcactgtctct

Fig.2 (Cont.)

> Tradução das cadeias pesadas variáveis maduras de FVII-3F20A1 (SEQ ID NO: 9)

QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVSWLRQPPGKGLEWLGLIWGDGSTNYH
SALISRLTISKDNSKSQVFLKLNSLHTDDTATYYCAKQGITFFSYWGQGTLVTVS

Anticorpo monoclonal FVII-3F11A3

> Nucleotídeo de cadeias leves variáveis maduras de FVII-3F11A3 (SEQ ID NO: 10)

gacatccagatgactcagtctccagcttcactgtctgcatctgtgggagaaactgtcaccatcacatgtg
gagcaagtgagaatatttacggtgctttaaattggtatcagcggaaacagggaaaatctcctcagctcct
gatctatggtgcaaccaacttggcagatggcatgtcatcgaggttcagtggcagtggatctggtagacag
tattctctcaagatcagtagcctgcatcctgacgatgttgcaacgtattactgtcaaaatgtgttaacta
ctccgctcacgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaacgg

> Tradução das cadeias leves variáveis maduras de FVII-3F11A3 (SEQ ID NO: 11)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRF
SGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLTTPLTFGAGTKLELKR

> Seqüência de nucleotídeos das cadeias pesadas variáveis maduras de FVII-3F11A3 (SEQ ID NO: 12)

gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcag
cctctggattcgctttcagtagttatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggctggagtg
ggtcgcatacattagtagtggtggtggtaacacctactatccagactctgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaatgccaagaacaccctgtacctgcaaatgagcagtctgaagtctgaggacacagccatgt
attactgtgcaagacatgaggtagtagcctattactatggtatggactactggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcctca

> Tradução das cadeias pesadas variáveis maduras de FVII-3F11A3 (SEQ ID NO: 13)

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGNTYY
PDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHEVVAYYYGMDYWGQGTSVT-
VSS

Iniciadores de nucleotídeos para uso na produção de anticorpos recombinantes de acordo com o Exemplo 1:

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO:14)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:15)

5'-GCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTC-3' (SEQ ID NO:16)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO:17)

5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:18)

5'-GTGCCAGGGGGAAGACCGATGGG-3' (SEQ ID NO:19)

5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (SEQ ID NO:20)

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (SEQ ID NO:21)

Fig.3

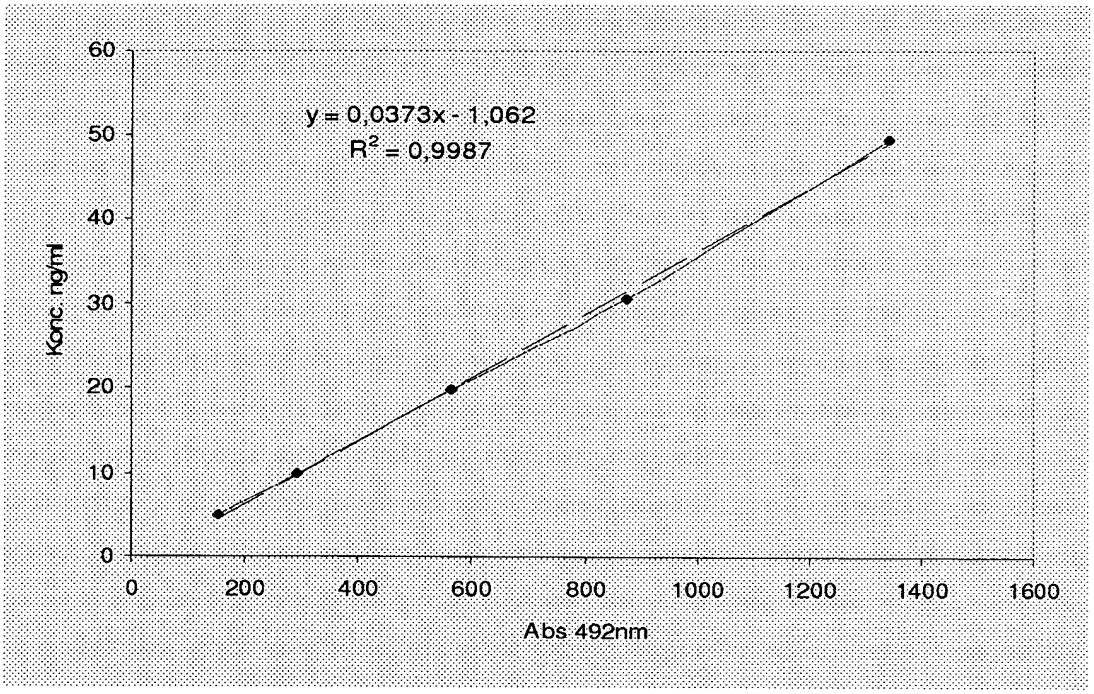

y = 0,0373x - 1,062
R2 = 0,9987
Konc. ng/ml
Abs 492nm
0
10
20
30
40
50
60
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600

Fig.4

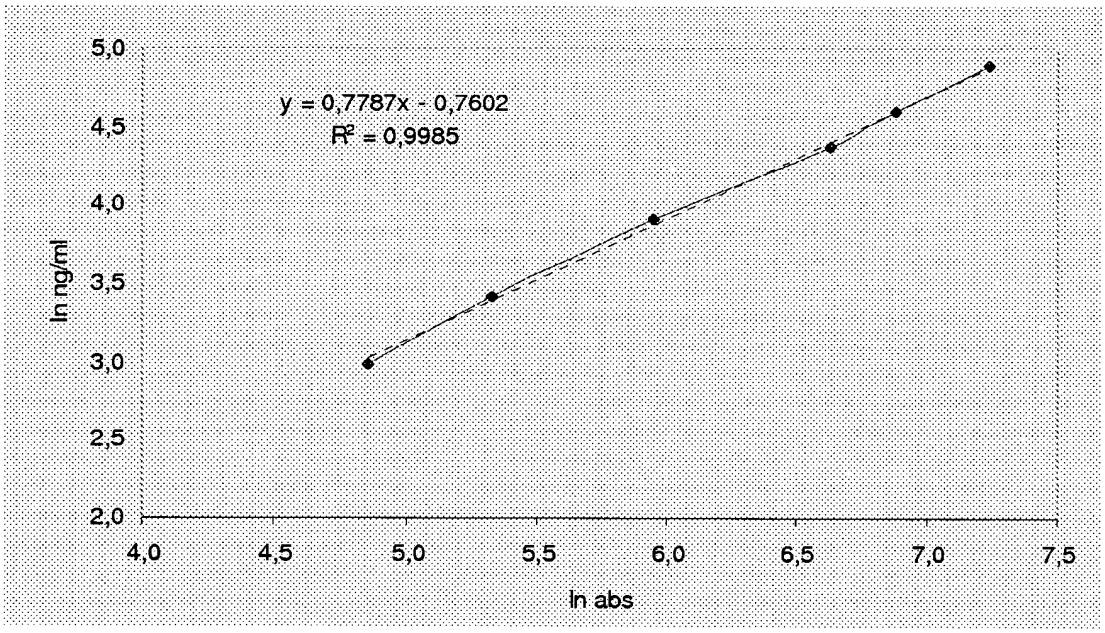
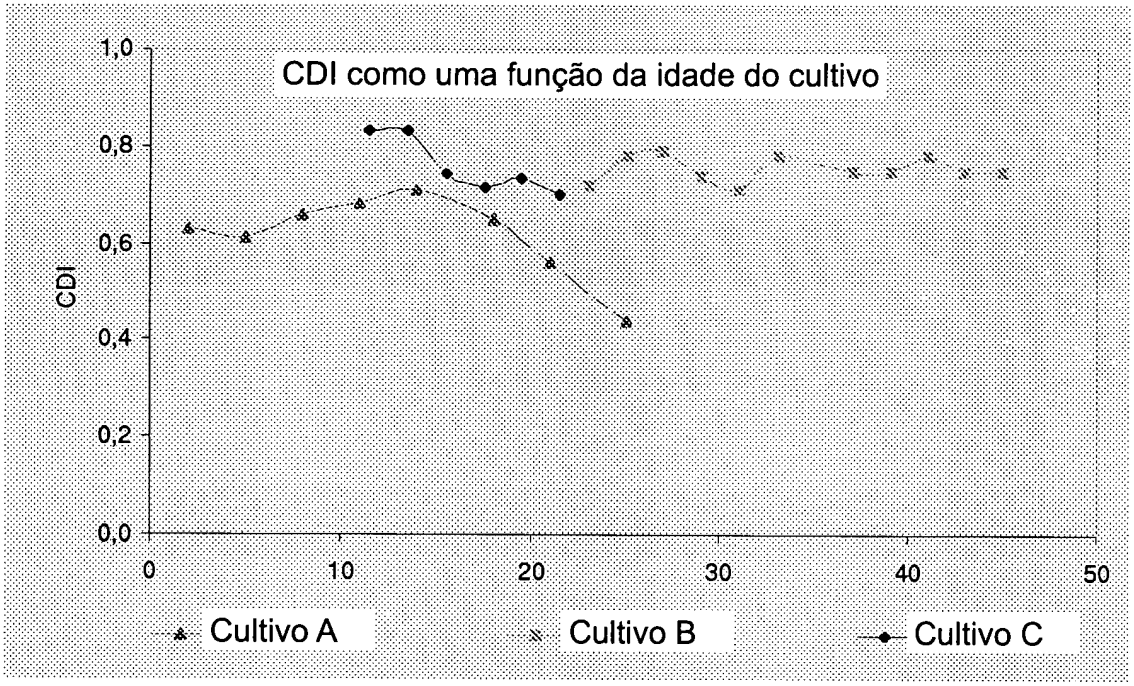

y = 0,7787x - 0,7602
R² = 0,9985
ln ng/ml
ln abs
5,0
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0
6,5
7,0
7,5

Fig.5


CDI como uma função da idade do cultivo
CDI
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0
10
20
30
40
50
Cultivo A
Cultivo B
Cultivo C

PI0615247-3

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA FVII E USO DESSES".**

A presente invenção refere-se a novos anticorpos contra FVII, uso para determinar a quantidade de FVII corretamente enovelado e intacto em uma amostra, assim como para purificação e otimização de processo.