



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1092027 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/12 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.06.09**

(30) Prioridade(s): **1998.06.09 US 88656 P**
1998.10.05 US 103088
1999.06.08 US 0328199

(43) Data de publicação do pedido: **2001.04.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.11.29**
002/2007

(73) Titular(es):

LA JOLLA PHARMACEUTICAL COMPANY
6455 NANCY RIDGE DRIVE SAN DIEGO, CA
92121 **US**

(72) Inventor(es):

DAVID S. JONES **US**
GILBERT MICHAEL IVERSON **US**
DAVID M. MARQUIS **US**
EDWARD J. VICTORIA **US**
LINNIK, MATTHEW D. **US**

(74) Mandatário:

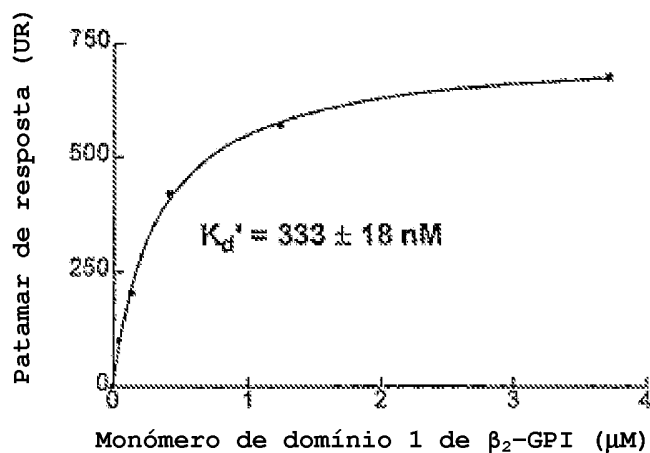
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **POLIPÉPTIDOS TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO CONTENDO O DOMÍNIO 1 DE B2GPI E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS**

(57) Resumo:

RESUMO**"Polipéptidos terapêuticos e de diagnóstico contendo o domínio 1 de β_2 GPI e métodos de utilização dos mesmos"**

O presente invento disponibiliza polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI, polinucleótidos que codificam estes polipéptidos, espécies miméticas destes polipéptidos e métodos de utilização de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI e das suas espécies miméticas. Demonstrou-se que o domínio 1 de β_2 GPI se liga a anticorpos (antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI) anti-cardiolipina, que estão associados a várias patologias, como a trombose e a perda fetal. Os polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderão ser utilizados para detectar anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI numa amostra. O invento disponibiliza adicionalmente métodos de indução de tolerância que utilizam estes polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI.



DESCRIÇÃO

"Polipéptidos terapêuticos e de diagnóstico contendo o domínio 1 de β_2 GPI e métodos de utilização dos mesmos"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se a conjugados e a polipéptidos para diagnosticar e tratar patologias associadas a anticorpos antifosfolípidos, particularmente as patologias associadas a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O termo anticorpos antifosfolípidos (aFL) é o termo genericamente utilizado para descrever os auto-anticorpos que estão associados a trombose, a perda fetal recorrente e a trombocitopenia na qualidade de síndrome antifosfolipídica primária (SAF), assim como a doenças auto-imunes como seja o lúpus eritematoso sistémico (LES). Harris et al. (1983) *Lancet* 2:1211-1214; e Lockshin et al. (1985) *N. Engl. J. Med.* 313:152-156. A SAF poderá ser primária ou secundária, o que significa que está associada a outras condições, principalmente LES. PHOSPHOLIPID-BINDING ANTIBODIES (Harris et al., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1991; McNeil et al. ADVANCES IN IMMUNOLOGY, Vol. 49, pp. 193-281 (Austen et al., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1991). Os anticorpos aFL (incluindo os anticorpos aCL) são detectados em muitas doenças, mas apenas os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI encontrados em associação a doenças auto-imunes requerem a presença da proteína sérica de ligação dos fosfolípidos, β_2 GPI. Vaarala et al. (1986) *Clin. Immunol. Immunopathol.* 41:8-15.

Aproximadamente 30% dos doentes que possuem anticorpos aFL persistentes sofreram um evento trombótico. A presença de anticorpos aFL define um grupo de doentes dentro do LES que apresentam uma síndrome com características clínicas consistindo em uma ou mais das seguintes condições: trombose, trombocitopenia (TCP) e perda fetal. O risco desta síndrome no LES, em geral, é de cerca de 25%; este risco

aumenta para 40% na presença de anticorpos aFL e diminui para 15% na sua ausência. Dado que se pensava que os anticorpos aFL eram direccionados para os fosfolípidos nas membranas plasmáticas, foi postulado que eles poderiam exercer efeitos patogénicos directos *in vivo*, ao interferirem com processos hemostáticos que ocorrem nas membranas fosfolipídicas de células como as plaquetas ou o endotélio. Em doentes com SAF, o facto de os anticorpos aFL (incluindo os anticorpos aCL) serem aparentemente o único factor de risco presente é uma prova adicional de que estes anticorpos desempenham um papel patogénico directo. A indução de SAF por transferência passiva de ratinhos com anticorpos aFL humanos é a melhor prova até ao momento de que os anticorpos aFL são directamente patogénicos. Bakimer *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 89:1558-1563; Blank *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:3069-3073. Embora as estimativas variem, acredita-se que os anticorpos aFL são um factor contributivo importante em cerca de 15% de todos os doentes com AVC.

A correlação nítida entre a presença destes anticorpos e várias disfunções obriga à sua detecção e medição. Contudo, a medição dos anticorpos aFL no ambiente clínico ainda é uma arte imperfeita e, desta forma, apresenta problemas significativos. Um conjunto comercialmente disponível de anti-soros padrão (APL Diagnostics, Inc., Louisville, KY) permite a criação de uma curva padrão para a comparação de análises efectuadas em vários laboratórios. No entanto, existe um elevado grau de inconsistência entre os resultados obtidos nestes laboratórios relativamente às unidades GPL e MPL exactas - a unidade de medição para os anticorpos antifosfolípidos IgG e IgM, respectivamente - as classificações para os soros e os níveis de GPL e MPL que são classificados como elevados (80 ou superior), médios (20-80), baixos (10-20) ou normais (0-10). Os kits comercialmente disponíveis variam grandemente em termos dos valores atribuídos aos padrões disponíveis comercialmente. Reber *et al.* (1995) *Thrombosis and Haemostat.* 73:444-452.

A natureza exacta da especificidade antigénica dos auto-anticorpos aFL é controversa e está reflectida nas nomenclaturas em desenvolvimento utilizadas para estes

anticorpos. Inicialmente, pensava-se que estes auto-anticorpos eram direccionados contra fosfolípidos aniónicos, daí o nome "anticorpos anticardiolipina". Gharavi et al. (1987) *Ann. Rheum. Dis.* 46m:1-6. Depois tornou-se evidente que β_2 GPI desempenhava um papel importante na especificidade antigénica dos anticorpos aFL (incluindo os anticorpos aCL). Vermylen et al (1992) *J. Lab. Clin. Med.* 120:10; McNeil et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4120-4124. Estas observações indicam que estes anticorpos são mais correctamente designados por "auto-anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI", que é o termo utilizado neste fascículo.

Os relatos de que β_2 GPI desempenhava um papel, como cofactor, na ligação de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, juntamente com alguns relatos de que os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI podiam ligar-se à própria β_2 GPI, conduziram a interpretações contraditórias quanto à natureza do sítio antigénico reconhecido por estes anticorpos. Contudo, o papel que β_2 GPI desempenhava permaneceu indistinto, e várias explicações foram sugeridas. Alguns grupos concluíram que os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI reconhecem um antigénio complexo que inclui tanto β_2 GPI como um fosfolípido aniónico, enquanto outros observaram a ligação de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI a β_2 GPI na ausência de fosfolípidos. McNeil et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4120-4124; Galli et al. (1990) *Lancet* 335:1544; Roubey et al (1995) *J. Immun.* 154(2): 954-960; Arvieux et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 143:223. Foram oferecidas várias explicações para estas diferenças. Galli et al. postulam que, devido ao facto de os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI serem anticorpos de baixa afinidade para β_2 GPI, eles requerem a ligação de ambos os sítios do anticorpo numa dada molécula de IgG por um antigénio plurivalente em fase sólida. Galli et al. (1990). Eles argumentam adicionalmente que, em determinadas condições, por exemplo, irradiação gama dos poços de microtitulação, é possível imobilizar uma quantidade suficiente de β_2 GPI para permitir a ligação destes anticorpos de baixa afinidade. Outros autores defendem que é gerado um epítopo críptico, o qual é reconhecido pelos anticorpos

antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, quando β_2 GPI se liga quer a poços irradiados com radiação gama quer a poços revestidos com cardiolipina. Matsuura et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:457.

A proteína β_2 GPI é uma glicoproteína plasmática de 50 quilodalton que apresenta várias propriedades que definem um anticoagulante, tais como a inibição da activação por contacto da via intrínseca da coagulação, actividade de protrombinase plaquetária e a activação das plaquetas induzida por ADP. Roubey (1996) *Arthritis Rheum.* 39:1444; Valesinit et al. (1992) *Automimmunity* 14:105. A sequência de aminoácidos de β_2 GPI já foi determinada. Lozier et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3640; Steinkasserer et al. (1991) *Biochem. J.* 277:387. A proteína β_2 GPI é constituída por cinco domínios homólogos. Quatro deles são constituídos por aproximadamente 60 aminoácidos que compreendem cistinas, prolinas e triptofanos extremamente conservados. Lozier et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3640; Steinkasserer et al. (1991) *Biochem. J.* 277:387-391. Este motivo estrutural proteico foi primeiramente descrito na proteína β_2 GPI e é caracterizado pelo seu comprimento, pelo enrolamento independente e por uma moldura com a localização homóloga de quatro resíduos de semi-cistina envolvidos na formação de duas pontes de dissulfureto internas; duas prolinas; dois resíduos de fenilalanina, tirosina ou histidina; duas glicinas; e uma leucina ou valina. Estes motivos de repetição foram designados por estruturas *sushi* devido à sua forma, sendo por vezes denominados sequências consenso de repetição curtas. Reid et al. (1989) *Immunol. Today* 10:177; Ichinose et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:13411-14. O quinto domínio contém 82 resíduos de aminoácidos e 6 semi-cistinas.

Além da controvérsia acima discutida envolvendo a natureza da especificidade antigénica dos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, tem existido uma controvérsia considerável em relação à natureza e localização dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI em β_2 GPI. Foi sugerido que o sítio de ligação aos fosfolípidos de β_2 GPI está situado no quinto domínio. Hunt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 90:2141. Hunt et al. também referiram as diferenças estruturais entre uma forma activa de β_2 GPI e uma forma inactiva de β_2 GPI que não possuía actividade de cofactor para anticorpos antifosfolípidos dependente de β_2 GPI e concluíram que a localização mais provável do epítipo putativo para os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI seria o quinto domínio de β_2 GPI. Hunt et al. (1994) *J. Immunol.* 152:653-659. Outros grupos utilizaram proteínas β_2 GPI recombinantes para tentar localizar o sítio antigénico dos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. Dois destes grupos produziram proteínas β_2 GPI mutantes, nas quais vários domínios haviam sofrido deleção, num sistema de expressão em baculovírus. Ambos os grupos concluíram que o epítipo para os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI era críptico e que o domínio 4 poderia estar envolvido de forma dominante na exposição do epítipo. Igarashi et al. (1996) *Blood* 87:3262-3270; George et al. (1998) *J. Immunol.* 160:3917-3923. Outro grupo expressou proteínas β_2 GPI mutantes, nas quais vários domínios haviam sofrido deleção, em *Escherichia coli* e concluiu que o domínio 5 continha epítipos reconhecidos por anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. Yang et al. (1997) *APLAR J. Rheumatol.* 1:96-100.

Existe uma necessidade séria de melhores sistemas de detecção e de tolerogénios para as condições mediadas por anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Todas as referências aqui citadas estão incorporadas na íntegra por meio de referência.

Del Papa et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5572-5578 referem que a β_2 -glicoproteína I humana se liga a células endoteliais através de um conjunto de resíduos de lisina, que são críticos para a ligação a fosfolípidos aniónicos, e oferece epítipos para anticorpos anti- β_2 -glicoproteína I.

Hagihara et al. (1995) *J. Biochem.* 118:129-136 referem que os domínios N- e C-terminais da β_2 -glicoproteína I bovina desempenham um papel na sua interacção com a cardiolipina.

WO 97/46251 descreve análogos de anticorpos aFL que se ligam especificamente a células B às quais um epítopo para aFL se liga. Os análogos otimizados não possuem epítopo(s) de células T e são úteis como conjugados para tratar doenças mediadas por anticorpos aFL. São também descritos conjugados compreendendo análogos de aFL e moléculas de plataforma de valência não imunogênicas.

EP-A-0730155 descreve um método de análise de um anticorpo antifosfolípido contido numa amostra utilizando a β_2 -glicoproteína I, em que é utilizado, em vez da mesma, um polipéptido possuindo a mesma sequência de aminoácidos que o domínio IV da β_2 -glicoproteína I ou um polipéptido que é parcialmente diferente do polipéptido acima, mas é equivalente em termos de função, permitindo assim uma análise fácil e rigorosa de um auto-anticorpo com origem numa síndrome de anticorpos antifosfolípidos.

DESCRIÇÃO DO INVENTO

O invento proporciona um conjugado que compreende uma molécula de plataforma de valência e um polipéptido que compreende pelo menos seis aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4, que tem um comprimento inferior a 100 aminoácidos e que se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. O polipéptido é aqui designado por "polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI" e liga-se especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

Em algumas concretizações, o polipéptido compreende fragmentos do domínio 1, tal como apresentados na Tabela 1. Em outras concretizações, o polipéptido compreende um epítopo conformacional. Ainda em outras concretizações, o polipéptido consiste no domínio 1. O polipéptido poderá não possuir um epítopo de células T (detectável), em que o referido epítopo de células T é capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

O invento também disponibiliza um polipéptido que se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido

dependente de β_2 GPI, que tem um comprimento inferior a 75 aminoácidos e que compreende pelo menos 30 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4 ou, caso tenha um comprimento inferior a 30 aminoácidos, compreende pelo menos seis aminoácidos contíguos seleccionados entre as SEQ ID NOS: 5, 9, 10, 11 e 12, e um polipéptido de fusão compreendendo um polipéptido deste tipo.

Em outro aspecto, o invento proporciona polinucleótidos (incluindo polinucleótidos isolados, naturais e não naturais) que codificam qualquer um dos polipéptidos deste invento. Os polinucleótidos poderão estar isolados, em vectores de clonagem ou de expressão, e/ou em células hospedeiras apropriadas. Ainda adicionalmente, o invento disponibiliza:

- um *kit* para detectar (a) polipéptidos β_2 GPI ou (b) uma coagulação, em que o referido *kit* compreende um conjugado ou um polipéptido do invento numa embalagem adequada;
- uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de um conjugado ou de um polipéptido do invento, em que o polipéptido não possui um epítopo de células T capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI e em que uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para induzir uma tolerância;
- uma composição compreendendo uma quantidade eficaz de um conjugado ou de um polipéptido do invento, em que uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para detectar um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI;
- um método de detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI presente numa amostra, que compreende (a) colocar o anticorpo presente na amostra em contacto com um conjugado ou um polipéptido do invento, em condições que permitem a formação de um complexo antigénio-anticorpo estável; e (b) detectar o complexo estável formado na etapa (a), caso exista;

- um polipéptido ou um conjugado do invento, em que o polipéptido não possui um epítipo de células T capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, para utilizar num método destinado a induzir uma tolerância num indivíduo;
- um método para detectar a mediação da coagulação por um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, que compreende as etapas de:
 - (a) efectuar uma primeira análise de coagulação utilizando uma amostra biológica adequada de um indivíduo, em que um conjugado ou um polipéptido de acordo com o invento é adicionado à análise;
 - (b) efectuar uma segunda análise de coagulação, utilizando uma amostra biológica adequada do indivíduo na ausência do polipéptido; e
 - (c) comparar os resultados das análises das etapas (a) e (b), em que uma diferença nos resultados indica uma mediação da coagulação por um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.
- utilização de um polipéptido ou de um conjugado do invento, em que o polipéptido não possui um epítipo de células T capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, na produção de um medicamento destinado a induzir uma tolerância num indivíduo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 representa a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO. 1) e de aminoácidos (SEQ ID NO. 2) de β_2 GPI. Os números acima das filas indicam as posições dos aminoácidos.

A Figura 2 representa a sequência de nucleótidos (SEQ ID NO. 3) e de aminoácidos (SEQ ID NO. 4) do domínio 1 de β_2 GPI. Os números acima das filas indicam as posições dos aminoácidos.

A Figura 3 é um modelo da estrutura terciária do domínio 1 de β_2 GPI, incluindo os aminoácidos-chave envolvidos na ligação ao anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

A Figura 4 é um gráfico que representa os resultados de um ensaio ELISA de inibição competitiva efectuado em placas de microtitulação NUNC. As placas foram revestidas com proteína β_2 GPI selvagem. A ligação do anticorpo (do doente 7104) sofreu competição por parte das várias proteínas β_2 GPI mutantes. Os símbolos representam as proteínas β_2 GPI recombinantes da forma que se segue: $\text{---}\square\text{---}$, 12345; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, 1---; $\text{---}\square\text{---}$, 12---; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, 123--; $\text{---}\blacksquare\text{---}$, 1234-; $\text{---}\square\text{---}$, -2345; $\text{---}\blacktriangle\text{---}$, --345; $\text{---}\triangle\text{---}$, ---45; e $\text{---}\blacksquare\text{---}$, ----5. Designações das proteínas recombinantes: os traços indicam os domínios em falta; os números indicam os domínios presentes na proteína. Por exemplo, "---345" é uma proteína β_2 GPI recombinante sem os domínios 1 e 2, mas que conserva os domínios 3, 4 e 5.

A Figura 5 é um gráfico que representa os resultados da análise de ELISA da ligação de um anticorpo anti- β_2 GPI de coelho a várias proteínas β_2 GPI recombinantes. Os poços da placa de microtitulação revestidos com um quelato de níquel foram cobertos com as várias proteínas β_2 GPI recombinantes nas concentrações apresentadas e, em seguida, foram testados relativamente à capacidade do anticorpo anti- β_2 GPI de coelho para se ligar. Os símbolos representam as proteínas β_2 GPI recombinantes da forma que se segue: $\text{---}\square\text{---}$, --345; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, ---45; $\text{---}\blacksquare\text{---}$, -2345; $\text{---}\blacklozenge\text{---}$, 12345; $\text{---}\blacksquare\text{---}$, 1234-; $\text{---}\square\text{---}$, 123--; $\text{---}\blacktriangle\text{---}$, ----5 e $\text{---}\triangle\text{---}$, GST-6his.

A Figura 6 é um gráfico que representa os resultados da análise de ELISA da ligação de um anticorpo anti- β_2 GPI a várias proteínas β_2 GPI recombinantes. Os poços da placa de microtitulação revestidos com quelato de níquel foram cobertos com as várias proteínas β_2 GPI recombinantes nas concentrações apresentadas e, em seguida, foram testados relativamente à capacidade do anticorpo anti- β_2 GPI humano 6701 (do doente 6701) para se ligar. Os símbolos para as proteínas β_2 GPI recombinantes são como na Figura 5. Os símbolos adicionais são como se segue: $\text{---}\blacksquare\text{---}$, ausência de

β_2 GPI com anticorpo adicionado; ---+---, ausência de β_2 GPI, ausência de anticorpo.

A Figura 7 é um gráfico que representa os resultados de um ensaio ELISA que mediu a capacidade de um anticorpo anti- β_2 GPI de coelho para se ligar a várias proteínas β_2 GPI recombinantes, as quais foram primeiro ligadas a poços de placas de microtitulação revestidos com cardiolipina (CL). As placas IMMULON® foram revestidas com CL e depois foram carregadas com as concentrações indicadas das proteínas β_2 GPI recombinantes. Os símbolos para as proteínas β_2 GPI recombinantes são como na Figura 5.

A Figura 8 é um gráfico que representa os resultados de um ensaio ELISA que mediu a capacidade da preparação de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI 6641 (do doente 6641) para se ligar a várias proteínas β_2 GPI recombinantes, as quais foram primeiro ligadas a poços de placas de microtitulação revestidos com CL. As placas IMMULON® foram revestidas com CL e depois foram carregadas com as concentrações indicadas das proteínas β_2 GPI recombinantes. Os símbolos para as proteínas β_2 GPI recombinantes são como na Figura 6.

A Figura 9 é um gráfico que representa os resultados de um ensaio ELISA de inibição competitiva, no qual foi testada a capacidade de vários péptidos para competir com a proteína β_2 GPI selvagem pela ligação a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. Os símbolos para os péptidos são como se segue: -□-, β_2 GPI; -♦-, CTPRVC; -■-, FSTVVP; -◇-, KPDDL; -■-, GRTCPK; -□-, TLKCTP; -▲-, ICPLTG; -△-, FICPLT; -■-, ITYSCK, -+-, GRTCPK.

As Figuras 10A e 10B são gráficos que representam os valores da ligação aparente no equilíbrio para várias concentrações de polipéptido contendo o domínio 1 (Figura 10A) e de conjugado tetramérico, composto 44 (Figura 10B) a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI purificados por afinidade e provenientes do doente 6626. As constantes de dissociação aparente no equilíbrio também são apresentadas.

As Figuras 11A e 11B são gráficos que representam os valores da ligação aparente no equilíbrio para várias concentrações de polipéptido contendo o domínio 1 (Figura 11A) e de conjugado tetramérico, composto 44 (Figura 11B) a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI purificados por afinidade e provenientes do doente 6701.

A Figura 12 é um gráfico que representa os resultados de experiências de ligação competitiva, nas quais uma proteína β_2 GPI (aplicada como revestimento em placas de microtitulação NUNC) reagiu com o plasma do doente 6501 e com quantidades variáveis dos conjugados tetraméricos do domínio 1, composto 44 (∇) e composto 45 (\star), bem como de polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI (\diamond) e de polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI que havia sido reduzido e alquilado (\blacksquare).

As Figuras 13A e 13B são gráficos que representam a dose-resposta de células dos nódulos linfáticos poplíteos de ratinhos imunizados com um conjugado de polipéptido contendo domínio 1 de β_2 GPI-KLH em ACF (Fig. 13A) ou apenas com ACF (Fig. 13B). Símbolos: \square , conjugado com KLH; ∇ , polipéptido contendo domínio 1 de β_2 GPI não conjugado com KLH; \blacksquare , KLH; Δ , PPD.

A Figura 14 é um gráfico de barras que representa a relação dose-resposta (em termos de anticorpo anti- β_2 GPI) de se efectuar uma sensibilização activa com um conjugado de polipéptido contendo domínio 1 de β_2 GPI-KLH (10 μ g, 50 μ g e 100 μ g).

A Figura 15 é um gráfico que representa a especificidade de anticorpos policlonais de ratinho produzidos contra um conjugado de polipéptido contendo domínio 1 de β_2 GPI-KLH, tal como foi determinada através de ensaios de competição utilizando mutantes de β_2 GPI ao nível dos vários domínios (\square , 1----; \diamond , 1---- reduzido e alquilado; \blacksquare , 12---; \diamond , 1234-; \blacksquare , -2345; \square , --345; \blacktriangle , ---45; Δ , 1---5; \times , 12345).

A Figura 16 é um gráfico de barras que representa o efeito de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, sobre a actividade do Factor Va no sangue de vários doentes (6501, 6636, 6644, 7011, 7013, 6701, 7001, 6625, 6641), assim como na IgG e no plasma normais.

FORMAS DE REALIZAÇÃO DO INVENTO

Nós constatámos que o domínio 1 de β_2 GPI se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI (isto é, contém um epítopo(s) de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI). Esta constatação é especialmente significativa tendo em vista a literatura existente, que descrevia apenas os domínios 5 e 4 como sendo importantes para esta ligação. Consultar, por exemplo, George *et al.* (1998) e Yang *et al.* (1997). Nós constatámos também que o domínio 1 de β_2 GPI se liga a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI de pelo menos 100 anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI diferentes, o que é especialmente significativo e importante no contexto da detecção/diagnóstico, assim como no contexto dos tolerogénios, uma vez que o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderão, assim, ser úteis para um intervalo amplo da população que transporta anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. Adicionalmente, verificámos que péptidos do domínio 1 particulares (aqui descritos) parecem ligar-se especificamente a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Por consequência, o invento disponibiliza polipéptidos compreendendo o domínio 1 de polipéptidos β_2 GPI (incluindo o domínio 1 isolado), que se ligam especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. O invento também disponibiliza polipéptidos consistindo essencialmente no domínio 1 de polipéptidos β_2 GPI, que se ligam especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. Os polipéptidos do invento são úteis para a detecção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI (no contexto do diagnóstico, do prognóstico e/ou da monitorização) e também são úteis como tolerogénios. Em algumas concretizações, particularmente no contexto dos

tolerogénios, o(s) polipéptido(s) β_2 GPI não possuem um epítipo de células T e/ou estão na forma plurivalente, por exemplo, conjugados com uma molécula de plataforma. O invento também proporciona polinucleótidos que codificam os polipéptido(s) β_2 GPI. Estes polinucleótidos poderão ser utilizados para produzir os polipéptido(s) β_2 GPI, quer in vitro quer in vivo. O invento também disponibiliza composições que compreendem polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI e polinucleótidos que codificam polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. O invento disponibiliza adicionalmente métodos de utilização do(s) polipéptido(s) β_2 GPI, por exemplo, para a detecção ou a indução de uma tolerância (isto é, a indução de tolerância das células B).

Técnicas gerais

Excepto indicação em contrário, a prática do presente invento empregará técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que se encontram dentro da perícia da arte. Estas técnicas estão explicadas detalhadamente na literatura, por exemplo em "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994); e "Current Protocols in Immunology" (J.E. Coligan et al., eds., 1991).

Definições

Um "polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI" é um polipéptido que se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI e que possui pelo menos seis aminoácidos contíguos representados na Fig. 2 (SEQ ID NO:4; domínio 1). É possível demonstrar que um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, utilizando

ensaios standard conhecidos na arte, como sejam os ensaios de inibição competitiva, que estão aqui descritos, assim como na arte. O termo "polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI" compreende várias concretizações (muitas das quais estão aqui descritas), incluindo, entre outras, a SEQ ID NO:4; fragmentos da SEQ ID NO: 4; extensões, inserções e/ou deleções da SEQ ID NO: 4; e variantes de sequência da SEQ ID NO: 4. Assim, o termo "polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI" pretende descrever uma classe de moléculas baseadas no domínio 1, que apresentam a funcionalidade exigida. Desta forma, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá ter pelo menos 10, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 40 e/ou pelo menos 60 aminoácidos contíguos ilustrados na Fig. 2 (SEQ ID NO:4). Um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá também compreender diferentes regiões do domínio 1, de tal forma que, colectivamente, estas regiões são capazes de se ligarem especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI (tal como na produção de um epítopo conformacional). Tal como discutido abaixo, em algumas concretizações, um "polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI" também não possui um (qualquer) epítopo de células T detectável. Para os objectivos deste invento, o epítopo de células T é definido como sendo capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Um polipéptido que se "liga especificamente" a um anticorpo é um termo bem compreendido na arte, e os métodos para determinar esta ligação específica também são bem conhecidos na arte. Diz-se que uma molécula apresenta uma "ligação específica" se reage ou se associa mais frequentemente, mais rapidamente, com maior duração e/ou com maior afinidade a uma célula ou uma substância particular do que a células ou substâncias alternativas. Um anticorpo "liga-se especificamente" a um alvo caso se ligue com maior afinidade, avidéz, mais facilmente e/ou com maior duração do que se liga a outras substâncias.

Um "anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI" é qualquer anticorpo que se liga especificamente a β_2 GPI. Tal como discutido acima, a nomenclatura utilizada nas artes

clínicas e na literatura utiliza designações alternativas para estes anticorpos, tais como anticorpos "aFL" e "aCL", que estão incluídas na definição do termo "anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI", desde que a propriedade de ligação exigida esteja presente (isto é, os termos anticorpos "aFL" e "aCL" incluem os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI). Tal como claramente indicado na definição de "anticorpo" aqui disponibilizada, um "anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI" engloba fragmentos que contêm a região variável, como os fragmentos Fab, desde que a capacidade para se ligar especificamente a β_2 GPI seja conservada. Como discutido abaixo, entende-se que a ligação específica a qualquer anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI é suficiente, embora seja preferível que um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI se ligue a mais de um, de preferência pelo menos dois, preferencialmente pelo menos cinco, mais preferencialmente pelo menos dez, ainda mais preferencialmente pelo menos 20 anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI diferentes.

Um "anticorpo" (termo utilizado indiferentemente no plural e no singular) é uma molécula de imunoglobulina capaz de efectuar uma ligação específica a um alvo, como seja um polipéptido, através de pelo menos um sítio de reconhecimento do antigénio localizado na região variável da molécula de imunoglobulina. Tal como aqui utilizado, o termo engloba não só anticorpos intactos, como também os seus fragmentos (tais como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadeias simples (ScFv), mutantes, proteínas de fusão, anticorpos humanizados e qualquer outra configuração modificada da molécula de imunoglobulina que compreenda um sítio de reconhecimento do antigénio com a especificidade exigida.

O termo " β_2 GPI intacta" refere-se à sequência de aminoácidos da molécula completa de β_2 GPI (representada na Fig. 1 e na SEQ ID NO:2). As sequências polinucleotídica e polipeptídica de β_2 GPI também estão disponíveis ao público na literatura e no GeneBank (N.º de acesso X58100).

Um "polipéptido de fusão" é um polipéptido que compreende regiões numa posição diferente daquela que ocorre na natureza. As regiões poderão existir normalmente em

proteínas separadas e serem combinadas no polipéptido de fusão, ou elas poderão existir normalmente na mesma proteína mas serem colocadas numa nova disposição no polipéptido de fusão. Um polipéptido de fusão poderá também surgir de formas poliméricas, sejam elas lineares ou ramificadas, de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI.

Um "epítopo de célula T" é um termo bem compreendido na arte e designa um sítio de ligação para uma célula T, mais especificamente, uma sequência polipeptídica ou uma estrutura química que activa a(s) célula(s) T. Os métodos para determinar a presença de epítopos de células T também são bem conhecidos na arte e estão aqui descritos. Está subentendido que, com o tempo, poderão ser desenvolvidos ensaios mais sensíveis para detectar a presença de epítopos de células T, e que a especificação da ausência de epítopos de células T está dependente do tipo de sistema de detecção utilizado. Para os objectivos deste invento, "não possuir" um epítopo de células T significa que um epítopo de células T não é detectável mediante a utilização dos ensaios standard na arte, particularmente desde a data inicial de apresentação deste pedido. Considera-se também que, para os objectivos deste invento, um "epítopo de células T" é um epítopo que é capaz de estimular as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Os termos "polinucleótido" e "ácido nucleico", aqui utilizados indistintamente, referem-se a uma forma polimérica de nucleótidos de qualquer comprimento, sejam eles ribonucleótidos ou desoxirribonucleótidos. Estes termos incluem um ADN de cadeia simples, dupla ou tripla, ADN genómico, ADNC, ARN, um híbrido ADN-ARN ou um polímero compreendendo bases purínicas e pirimidínicas, ou outras bases nucleotídicas naturais, química ou bioquimicamente modificadas, não naturais ou derivatizadas. O esqueleto do polinucleótido pode compreender açúcares e grupos fosfato (como poderão ser normalmente encontrados no ARN ou ADN) ou grupos açúcar ou fosfato modificados ou substituídos. Em alternativa, o esqueleto do polinucleótido pode compreender um polímero de subunidades sintéticas, tais como fosforamidatos, e pode assim ser um oligodesoxinucleósido fosforamidato (P-NH₂) ou um oligómero misto fosforamidato-

fosfodiéster. É possível utilizar uma ligação fosforotiato em vez de uma ligação fosfodiéster. Além disso, é possível obter um polinucleótido de cadeia dupla a partir do produto polinucleotídico de cadeia simples proveniente da síntese química, quer sintetizando a cadeia complementar e hibridando as cadeias em condições apropriadas quer sintetizando a cadeia complementar *de novo* utilizando uma ADN-polimerase juntamente com um iniciador apropriado.

O exemplos que se seguem são exemplos não restritivos de polinucleótidos: um gene ou fragmento de gene, exões, intrões, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plasmídeos, vectores, ADN isolado de qualquer sequência, ARN isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico e iniciadores. Preferencialmente, o polinucleótido é ADN. Tal como aqui utilizado, "ADN" inclui não só as bases A, T, C e G, como também qualquer um dos seus análogos ou formas modificadas destas bases, tais como nucleótidos metilados, modificações internucleótidos como ligações não carregadas e tioatos, utilização de análogos de açúcares e estruturas de esqueleto modificadas e/ou alternativas, tais como poliamidas.

O termo "natural" refere-se a uma sequência polinucleotídica ou polipeptídica endógena, isto é, uma sequência encontrada na natureza. O termo inclui os alelos e as formas alélicas da proteína codificada, assim como os polinucleótidos e os polipéptidos completos tal qual processados. O processamento pode ocorrer em uma ou mais etapas, e estes termos englobam todas as etapas do processamento. Reciprocamente, uma sequência "não natural" refere-se a todas as outras sequências, ou seja, aquelas que não ocorrem na natureza, como sejam as sequências recombinantes.

Uma "célula hospedeira" inclui uma célula individual ou uma cultura de células, que pode ser ou tem sido um receptor para vector(es) ou para a incorporação de polinucleótidos e/ou proteínas. As células hospedeiras incluem a descendência de uma única célula hospedeira, e a descendência poderá não ser necessária e completamente idêntica (em morfologia ou em termos genómicos do

complemento de ADN total) à célula parental original, devido a mutação natural, accidental ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transfectadas in vivo com um polinucleótido(s) deste invento.

“Transformação” ou “transfecção” refere-se à inserção de um polinucleótido exógeno numa célula hospedeira, independentemente do método utilizado para a inserção, por exemplo, a lipofecção, a transdução, a infecção ou a electroporação. O polinucleótido exógeno poderá ser mantido como um vector não integrado, por exemplo, um plasmídeo, ou, em alternativa, poderá ser integrado no genoma da célula hospedeira.

Um “indivíduo” é um vertebrado, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um ser humano. Os mamíferos incluem, embora não se encontrem limitados a estes exemplos, animais de quinta, animais desportivos, animais domésticos, primatas, ratinhos e ratos.

A “anergia celular B” é um termo bem compreendido na arte e designa a ausência de resposta daquelas células B que necessitam da ajuda das células T para produzir e segregar anticorpos. O termo inclui, embora não se encontre limitado a estes exemplos, a deleção clonal de células B imaturas e/ou maduras e/ou a incapacidade das células B para produzir anticorpos.

A “indução de uma tolerância” significa uma redução e/ou uma estabilização da extensão de uma resposta imunitária a um imunogénio. Uma “resposta imunitária” poderá ser humoral e/ou celular e poderá ser medida utilizando ensaios padrão conhecidos na arte. Para os objectivos deste invento, a resposta imunitária é geralmente reflectida pela presença de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. Quantitativamente, a redução (tal como medida por redução da produção de anticorpo) é pelo menos cerca de 25%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 50%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 75%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 90%, ainda mais preferencialmente pelo menos cerca de 95% e mais preferencialmente 100%. Considera-se que a tolerância é

específica do antigénio e aplica-se, para os objectivos do invento, aqueles indivíduos que possuem anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. O termo “indução de uma tolerância” também inclui abrandar e/ou atrasar a taxa de aumento do nível de anticorpos.

Uma “amostra biológica” engloba uma variedade de tipos de amostras obtidos de um indivíduo e pode ser utilizada numa análise de diagnóstico ou de monitorização. A definição compreende sangue e outras amostras líquidas de origem biológica, amostras sólidas de tecidos tais como um espécime para biopsia ou culturas de tecidos ou células derivadas destas, e a sua descendência. A definição também inclui amostras que foram manipuladas de uma qualquer forma após a sua obtenção, tal como por tratamento com reagentes, solubilização ou enriquecimento em determinados componentes, por exemplo proteínas ou polinucleótidos. O termo “amostra biológica” compreende uma amostra clínica e também inclui células em cultura, os sobrenadantes de células, os lisados celulares, o soro, o plasma, o fluido biológico e amostras de tecidos.

Um “complexo estável” formado entre quaisquer dois ou mais componentes, numa reacção bioquímica, refere-se a um dúplex ou a um complexo que é suficientemente duradouro para persistir entre a formação do dúplex ou do complexo e a sua subsequente detecção, incluindo quaisquer etapas opcionais de lavagem ou outra manipulação que possa ter lugar no ínterim.

Um polipéptido ou um polinucleótido “isolado” ou “purificado” é um composto que está praticamente isento dos materiais aos quais está associado na natureza. O termo praticamente isento significa pelo menos 50%, preferencialmente pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 80%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90% isento dos materiais aos quais está associado na natureza.

Diz-se que um polinucleótido “codifica” um polipéptido se, no seu estado nativo ou quando é manipulado por métodos bem conhecidos pelos peritos na arte, ele puder ser transcrito e/ou traduzido para produzir o polipéptido ou um

seu fragmento. Para os objectivos deste invento, e para evitar referências incómodas a cadeias complementares, diz-se que a cadeia anti-sentido (ou complementar) deste polinucleótido também codifica a sequência; isto é, uma sequência polinucleotídica que “codifica” um polipéptido inclui tanto a cadeia codificante convencional, como a sequência (ou cadeia) complementar.

Uma “quantidade eficaz” (quando utilizada no contexto tolerogénico) é uma quantidade suficiente para originar os resultados clínicos benéficos ou desejados. Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações. Para os objectivos deste invento, uma quantidade eficaz de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI é uma quantidade suficiente para induzir uma tolerância, particularmente em relação a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. Em termos de tratamento, uma “quantidade eficaz” de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI é uma quantidade suficiente para aliviar, melhorar, estabilizar, reverter, abrandar ou atrasar a progressão de um estado de doença associado a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI (isto é, um estado em que os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI indicam uma patologia potencial ou efectiva). A detecção e a medição dos indicadores de eficácia baseiam-se geralmente na medição de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI e/ou de sintomas clínicos associados ao estado de doença, por exemplo, trombose arterial ou venosa, perda fetal, acidente isquémico transitório, acidentes vasculares cerebrais; amaurose fugaz (visão monocular), anemia hemolítica auto-imune, lesões das válvulas cardíacas, enfarte do miocárdio, trombocitopenia e condições de enxaqueca.

Tal como aqui utilizado, o termo “molécula de plataforma de valência” designa uma molécula não imunogénica contendo sítios que permitem a ligação de um número discreto de polipéptidos (neste invento, os polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI) e/ou espécie(s) mimética(s).

O termo “não imunogénico”, quando utilizado para descrever a molécula de plataforma de valência, significa

que a molécula de plataforma de valência é incapaz de desencadear uma resposta imunitária e/ou é incapaz de desencadear uma resposta imunitária suficiente, quando é administrada por si só a um indivíduo. O grau de resposta imunitária aceitável depende do contexto em que a molécula de plataforma de valência é utilizada e poderá ser determinado empiricamente.

Tal como aqui utilizado, o termo "farmacóforo" designa a orientação tridimensional e as propriedades químicas de grupos-chave envolvidos na ligação de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI ao anticorpo-alvo.

Polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI do invento

O invento disponibiliza polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Tal como descrito acima, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI (a) contém pelo menos seis aminoácidos contíguos da Fig. 2 (SEQ ID NO:4), que representa o domínio 1; e (b) liga-se especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI (isto é, um ou mais anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI). Um modelo da estrutura tridimensional do domínio 1 de β_2 GPI está apresentado na Figura 3 (baseado na estrutura efectiva do domínio *sushi* 16 do factor H1, tal como determinado por RMN (Norman *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 219:717; Barlow *et al.* (1991) *Biochem.* 30:997), e os resíduos que poderão estar envolvidos na integridade estrutural e/ou na ligação ao anticorpo, tal como determinados através de estudos de mutagénese, incluindo aqueles aqui apresentados, estão indicados. No que diz respeito a todas as concretizações polipeptídicas do invento, considera-se que os polipéptidos do invento não incluem a proteína β_2 GPI nativa e intacta ou qualquer outra forma previamente isolada e caracterizada de β_2 GPI, tal como mutantes de deleção ao nível dos domínios (isto é, domínios 1,2,3; domínios 1,2,3,4).

Em uma concretização, o invento inclui um polipéptido que consiste (ou, em algumas concretizações, que consiste essencialmente) na sequência de aminoácidos ilustrada na Fig. 2 (SEQ ID NO:4), que representa o domínio 1. Nós demonstrámos que apenas aqueles polipéptidos β_2 GPI com

deleção de domínios que contêm o domínio 1 são capazes de se ligar especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, e que o domínio 1 sozinho é capaz de se ligar a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, tal como descrito no Exemplo 1. Para os objectivos deste invento, o domínio 1 de β_2 GPI abrange geralmente desde cerca do aminoácido 1 até cerca do aminoácido 64 de β_2 GPI (Fig. 1). Em alternativa, e também para os objectivos deste invento, o domínio 1 (e consequentemente um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI do invento) poderá abranger desde (a) cerca da primeira cisteína até cerca da quarta cisteína (quando determinadas a partir da extremidade N-terminal); (b) cerca da extremidade N-terminal até cerca da quinta cisteína (mais precisamente, o último aminoácido antes da quinta cisteína); (c) cerca da primeira cisteína até cerca da quinta cisteína. Em algumas concretizações, é possível adicionar uma cisteína adicional, em qualquer posição adequada, para servir de grupo reactivo para a conjugação. Consequentemente, uma cisteína adicional (que, em algumas concretizações, é a quinta cisteína de β_2 GPI) poderá ser incluída em qualquer posição, particularmente junto da extremidade C-terminal ou N-terminal, ou mesmo nestas extremidades. Um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá também compreender (ou consistir em, ou consistir essencialmente em) qualquer uma das seguintes combinações: (a) aminoácido 1 ao aminoácido 59 da SEQ ID NO:4; (b) aminoácido 2 ao aminoácido 60 da SEQ ID NO:4; (c) aminoácido 2 ao aminoácido 63 da SEQ ID NO:4; (d) aminoácido 1 ao aminoácido 66 da SEQ ID NO:1; (e) aminoácido 4 ao aminoácido 66 da SEQ ID NO:1; (f) cerca do aminoácido 1 a cerca do aminoácido 60 da SEQ ID NO:4; (g) cerca do aminoácido 1 a cerca do aminoácido 66 da SEQ ID NO:1. Nós verificámos que os polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI que compreendem a quinta cisteína são particularmente convenientes para a conjugação (discutida abaixo). Para aquelas concretizações que contêm (compreendem) as primeiras quatro cisteínas de β_2 GPI, considera-se geralmente que a sequência de aminoácidos entre as cisteínas deverá ser aquela necessária para que as pontes de dissulfureto apropriadas sejam formadas, enquanto as sequências de aminoácidos que flanqueiam as cisteínas (isto é, os aminoácidos nas extremidades N-terminal e C-terminal) poderão ser qualquer sequência (desde que a

estrutura necessária que permite a ligação ao anticorpo seja conservada).

Em outras concretizações, o invento inclui um polipéptido compreendendo qualquer um dos polipéptidos apresentados na Tabela I (SEQ ID NOS:5-11). As nossas experiências (descritas no Exemplo 3) demonstram que estes polipéptidos são capazes de se ligar especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

No que diz respeito a todas as concretizações polipeptídicas deste invento, o(s) polipéptido(s) liga(m)-se especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. A ligação específica a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI poderá ser determinada utilizando técnicas padrão da arte, como sejam os ensaios de ligação competitiva. Por exemplo, as placas de microtitulação poderão ser revestidas com a proteína β_2 GPI (natural ou recombinante, desde que a molécula recombinante apresente as propriedades de ligação exigidas), e o polipéptido de teste poderá ser adicionado em concentrações variáveis. O anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade, é depois adicionado, permitindo-se que a ligação ocorra. A quantidade de anticorpo ligado é determinada através de sistemas de detecção, por exemplo, um anticorpo anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina ou a radioactividade. A ligação específica é indicada através da capacidade do polipéptido de teste para competir com β_2 GPI pela ligação. Os Exemplos 1 e 3 fornecem ensaios exemplificativos para a detecção da ligação competitiva. A ligação específica também poderá ser determinada através de ensaios de ligação directa, que são conhecidos na arte e que estão exemplificados nos Exemplos 1 e 3.

Considera-se que, para os objectivos deste invento, o polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI apenas precisa de se ligar a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, embora possa ser desejável (por exemplo, no contexto da detecção) que o polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI se ligue a mais de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. A origem do anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI é geralmente um indivíduo, e a sequência do anticorpo

poderá variar de indivíduo para indivíduo. Considera-se igualmente que a ligação específica a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI poderá ser demonstrada através de utilização de um fragmento ou de outro produto recombinante de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, como um fragmento Fab ou construções da região variável de cadeia simples (scFv), os quais são conhecidos na arte.

Por consequência, em algumas concretizações, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI liga-se a mais de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI (isto é, pelo menos 2, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 50 ou mais). Estas concretizações são especialmente úteis para efeitos de detecção, uma vez que este(s) polipéptido(s) poderão ser utilizados para efectuar a detecção num espectro mais amplo de indivíduos, que poderão transportar um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI

Tabela 1. Fragmentos do domínio 1 que se ligam especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI

Sequência	SEQ ID NO:
CTPRVC	5
FSTVVP	6
KPDDL P	7
GRTCPK	8
TLKCTP	9
ICPLTG	10
FICPLT	11
ITYSCK	12

Em algumas concretizações, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI contém uma estrutura *sushi*. Os peritos na arte conhecem o “domínio *sushi*”, que é geralmente caracterizado por:

- (a) conter determinados resíduos (tais como prolina, fenilalanina, tirosina, glicina, leucina, valina e/ou

histidina), que enrolam a cadeia polipeptídica numa estrutura circular;

- (b) possuir geralmente um peso molecular de aproximadamente 6 kD; e
- (c) conter uma estrutura β enrolada. Ichmose et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:13411.

Considera-se também que um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá ligar-se a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI via um epítipo(s) conformacional(ais). Consequentemente, em algumas concretizações, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI compreende (a) os aminoácidos 55, 56 e 58 (Ile; Asn; Leu) da Fig. 3 (aminoácidos 55, 56 e 58 da SEQ ID NO:4); (b) os aminoácidos 43-45 (Arg; Lys; Phe) da Fig. 3 (aminoácidos 43 a 45 da SEQ ID NO:4); (c) os aminoácidos 40 a 45 da SEQ ID NO:4 (Gly; Gly; Met; Arg; Lys; Phe), preferencialmente os aminoácidos 38-44 da Figura 3 (aminoácidos 38 a 44 da SEQ ID NO:4); e/ou (d) o aminoácido 19 (Lys) da Fig. 3 (aminoácido 19 da SEQ ID NO:4), preferencialmente (a) e (b); preferencialmente (a) e (c); preferencialmente (b) e (c); preferencialmente (a) e (d); preferencialmente (b) e (d); preferencialmente (c) e (d); preferencialmente (a), (b) e (d); preferencialmente (a), (c) e (d); preferencialmente (b), (c) e (d); preferencialmente (a), (b) e (c); preferencialmente (a), (b), (c) e (d). Nós verificámos, através dos nossos estudos de mutagénese, que estes aminoácidos poderão ser críticos para a ligação, quer colectiva quer individualmente.

O tamanho de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI (ou de um polipéptido compreendendo um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI) poderá variar grandemente, desde que a funcionalidade necessária (baseada na ligação específica a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI) seja satisfeita. Os nossos resultados mostraram que sequências de aminoácidos com apenas 6 unidades podem ligar-se especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI (Exemplo 3).

Em algumas concretizações, o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (e o polipéptido compreendendo ou consistindo essencialmente em um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI) tem um comprimento inferior a cerca de 100 aminoácidos, de preferência tem um comprimento inferior a cerca de 75 aminoácidos, de preferência tem um comprimento inferior a cerca de 60 aminoácidos, de preferência tem um comprimento inferior a cerca de 50 aminoácidos, de preferência tem um comprimento inferior a cerca de 25 aminoácidos, de preferência tem um comprimento inferior a cerca de 15 aminoácidos, de preferência tem um comprimento inferior a cerca de 10 aminoácidos.

Entende-se que um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá estar associado a, conjugado com e/ou ligado a outro(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (quer este(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI sejam iguais ou diferentes), bem como outros domínios de β_2 GPI. Por consequência, o invento compreende formas poliméricas de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Tal como aqui utilizada, uma forma polimérica de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI contém uma pluralidade (isto é, mais de 1) de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Em uma concretização, são disponibilizados polímeros lineares de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Em outra concretização, são disponibilizados polímeros ramificados de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Em outras concretizações, o invento disponibiliza uma pluralidade de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI.

Em outra concretização, são fornecidos múltiplos péptidos antigénicos (Map) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Os Map têm um pequeno núcleo imunologicamente inerte com dendrites de lisina que se ramificam radialmente, sobre as quais é possível ancorar (isto é, ligar covalentemente) vários polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Posnett *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:1719-1725; Tam (1989) *Meth. Enz.* 168:7-15. O resultado é uma macromolécula grande que apresenta uma razão molar elevada de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI para o núcleo. Os Map são antigénios úteis e eficazes para ensaios como os ensaios ELISA e também poderão ser úteis para uma apresentação plurivalente, por

exemplo, no contexto tolerogénico. Os Map podem ser preparados sinteticamente e podem ser obtidos comercialmente (Quality Controlled Biochemicals, Inc. Hopkinton, MA). Num sistema Map típico, a matriz do núcleo é constituída por três níveis de lisina e oito aminoácidos para ancorar os polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI. O Map poderá ser sintetizado por qualquer método conhecido na arte, por exemplo, um método em fase sólida; por exemplo, R.B. Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149.

Considera-se que qualquer estrutura ramificada, como seja uma ciclodextrina, poderá ser utilizada. A estrutura ramificada poderá ser, embora não precise de o ser, pequena. No contexto de indução de uma tolerância, a plataforma não deverá actuar como um antigénio independente das células T.

Considera-se também que determinadas variações de sequência, que podem preservar ou melhorar a sua reactividade, poderão ser introduzidas num polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Consequentemente, o invento inclui modificações do(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI que não afectam significativamente as suas propriedades, assim como variantes que possuem uma actividade melhorada. Estas sequências variantes e modificadas são colectivamente designadas por "variantes funcionalmente equivalentes", que poderão apresentar a mesma, uma melhor ou uma menor capacidade de ligação quando comparadas com outro(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, e são denominadas "equivalentes" porque mantêm a capacidade de se ligarem especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. A modificação dos polipéptidos é prática de rotina na arte e não precisa de ser aqui descrita em detalhe. Os exemplos de polipéptidos modificados incluem polipéptidos com substituições conservativas de resíduos de aminoácidos, uma ou mais deleções ou adições de aminoácidos que não alteram significativa e prejudicialmente a actividade funcional, ou a utilização de análogos químicos, incluindo substituições por alfa-metilaminoácidos, aminoácidos não proteicos naturais (como a canavanina, o sulfóxido de DL-metionina, o cloridrato de delta-hidroxilisina e o ácido aminoisobutírico) e aminoácidos não naturais. Os resíduos de

aminoácidos que podem ser substituídos conservativamente uns pelos outros incluem, embora não se encontrem limitados a estes: glicina/alanina; valina/isoleucina/leucina; asparagina /glutamina; ácido aspártico/ácido glutâmico; serina/treonina; lisina/arginina; e fenilalanina/tirosina. Estes polipéptidos também incluem polipéptidos glicosilados e não glicosilados, assim como polipéptidos com outras modificações pós-tradução como, por exemplo, a glicosilação com diferentes açúcares, a acetilação e a fosforilação. De preferência, as substituições de aminoácidos são conservativas, isto é, o aminoácido substituído possui propriedades químicas similares às do aminoácido original. Estas substituições conservativas são conhecidas na arte e exemplos delas foram fornecidos acima.

Considera-se que determinadas variações de aminoácidos (como sejam as substituições) poderão ou não afectar a ligação de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, da mesma forma ou na mesma extensão. Adicionalmente, a natureza do(s) aminoácido(s) substituto(s) poderá afectar a forma e/ou a extensão da ligação. Por exemplo, constatámos que a substituição de um resíduo de arginina por um resíduo de glicina na posição 43 (aminoácido 43 da SEQ ID NO:4) origina uma perda da capacidade de ligação ao anticorpo nos soros de alguns doentes, enquanto outros permanecem inalterados e outros ainda apresentam uma capacidade alterada (ou seja, intermédia) de ligação. Em outro exemplo, a substituição da metionina na posição 42 por uma lisina ou uma treonina não parece afectar a ligação (nos doentes que testámos); contudo, se a metionina na posição 42 for substituída por uma valina, a ligação é aparentemente abolida em todos os doentes.

Além dos vinte aminoácidos naturais e dos seus homo- e nor-análogos, é possível utilizar várias outras classes de alfa-aminoácidos no presente invento. Os exemplos destas outras classes incluem d-aminoácidos, N^3 -alquilaminoácidos, alfa-alquilaminoácidos, aminoácidos cíclicos, aminoácidos quiméricos e aminoácidos diversos. Estes aminoácidos não naturais têm sido amplamente utilizados para modificar os polipéptidos bioactivos, de forma a aumentar a sua

resistência à degradação proteolítica e/ou a conferir impedimentos conformacionais para melhorar a sua actividade biológica. Hruby *et al.* (1990) *Biochem. J.* 268:249-262; Hruby *et al.* (1995) *Methods in Mol. Biol.* 35:201-240.

Os N^{α} -alquilaminoácidos mais comuns são os N^{α} -metilaminoácidos, tais como a N^{α} -metilcisteína (nC), a N^{α} -metilglicina (nG), a N^{α} -metil-leucina (nL), a N^{α} -metil-lisina (nK) e a N^{α} -metilvalina (nV). Os exemplos de alfa-alquilaminoácidos incluem a alfa-metilalanina (mA), o ácido alfa-aminoisobutírico (aiB), a alfa-metilprolina (mP), a alfa-metil-leucina (mL), a alfa-metilvalina (mV), o ácido alfa-metil-alfa-aminobutírico (tv), a dietilglicina (deG), a difenilglicina (dpG) e a diciclo-hexilglicina (dcG). Balaram (1992) *Pure & Appl. Chem.* 64:1061-1066; Toniolo *et al.* (1993) *Biopolymers* 33:1061-1072; Hinds *et al.* (1991) *Med. Chem.* 34:1777-1789.

Os exemplos de aminoácidos cíclicos incluem o ácido 1-amino-1-ciclopropanocarboxílico (cG), o ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico (Ac5c), o ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico (Ac6c), o ácido aminoindanocarboxílico (ind), o ácido tetra-hidroisoquinolinocarboxílico (Tic) e o ácido pipercolínico (Pip). C. Toniolo (1990) *Int'l. J. Peptide Protein Res.* 35:287-300; Burgess *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117:3808-3819. Os exemplos de aminoácidos quiméricos incluem a penicilamina (Pe), combinações de cisteína com valina, 4R- e 4S-mercaptoprolinas (Mpt), combinações de homocisteína e prolina e 4R- e 4S-hidroxiprolinas (hyP) e uma combinação de homosserina e prolina. Os exemplos de alfa-aminoácidos diversos incluem análogos de aminoácidos básicos como a ornitina (Or), a N^{ϵ} -metil-lisina (mK), a 4-piridilalanina (pyA), a 4-piperidinoalanina (piA) e a 4-aminofenilalanina; análogos de aminoácidos ácidos como a citrulina (Cit) e a 3-hidroxivalina; análogos de aminoácidos aromáticos como a 1-naftilalanina (1-Nal), a 2-naftilalanina (2-Nal), a fenilglicina (pG), a 3,3-difenilalanina (dpA), a 3-(2-tienil)alanina (Thi) e halofenilalaninas (por exemplo, 2-fluorofenilalanina e 4-clorofenilalanina); análogos de aminoácidos hidrófobos como a *t*-butilglicina (isto é, leucina terciária (tL)), o ácido 2-aminobutírico (Abu), a

ciclo-hexilalanina (Cy), a 4-tetra-hidropiranylalanina (tpA), a 3,3-diciclo-hexilalanina (dcA) e a 3,4-desidroprolina.

Além dos alfa-aminoácidos, é igualmente possível utilizar outros aminoácidos, como os beta-aminoácidos, no presente invento. Os exemplos destes outros aminoácidos incluem o ácido 2-aminobenzóico (Abz), o ácido β -aminopropanóico (β -Apr), o ácido γ -aminobutírico (γ -Abu) e o ácido 6-amino-hexanóico (ϵ -Ahx). Os ácidos carboxílicos como o ácido 4-clorobutírico (By) e o ácido 3-cloropropiônico (Pp) também têm sido utilizados como primeiro resíduo na extremidade N-terminal, na síntese de péptidos cíclicos com ligações tioéter.

Outros métodos de modificação compreendem a utilização de técnicas de acoplamento conhecidas na arte, incluindo, entre outras, meios enzimáticos, a substituição oxidativa e a quelação. A modificação pode ser utilizada, por exemplo, para a ligação de marcadores para imunoensaios, como a ligação de grupos radioactivos para radioimunoensaios. O(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI modificados são preparados utilizando procedimentos estabelecidos na arte e podem ser rastreados utilizando ensaios padrão conhecidos na arte, alguns dos quais estão descritos aqui e nos exemplos.

O invento também engloba proteínas de fusão compreendendo um ou mais polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Para os objectivos deste invento, uma proteína de fusão do domínio 1 de β_2 GPI contém um ou mais polipéptidos β_2 GPI e outra sequência de aminoácidos à qual não está ligada na molécula nativa, por exemplo, uma sequência heteróloga ou uma sequência homóloga de outra região, tal como outro domínio de β_2 GPI. As sequências heterólogas úteis incluem, embora não se encontrem limitadas a estas, sequências que permitem a secreção a partir de uma célula hospedeira, melhoram a reactividade imunológica ou facilitam o acoplamento do polipéptido a um suporte ou um veículo do imunoensaio. Por exemplo, um polipéptido β_2 GPI pode ser fundido com uma sequência heteróloga que facilita a purificação. Os exemplos destas sequências são conhecidos na arte e incluem aquelas que codificam epítomos como Myc, HA

(derivado da hemaglutinina do vírus influenza), His-6 ou FLAG. Outras sequências heterólogas que facilitam a purificação são derivadas de proteínas, tais como a glutathione-S-transferase (GST), a proteína de ligação à maltose (MBP) ou a porção Fc da imunoglobulina.

Um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá ou não conter um epítipo de células T. Para fins de detecção, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá ou não conter um epítipo(s) de células T, uma vez que a utilização principal do polipéptido neste contexto é a detecção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, que é independente da presença de epítopos de células T. No contexto dos tolerogénios, contudo, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI não possui um (quaisquer) epítipo(s) de células T detectável(eis) relativamente a um indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. Assim, em algumas concretizações, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI não contém (isto é, não possui) um epítipo de células T (e, consequentemente, um polipéptido compreendendo um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI não contém um epítipo de células T).

Os métodos para detectar a presença de um epítipo de células T são bem conhecidos na arte. Por exemplo, vários ensaios que detectam a proliferação de células T (como a incorporação de timidina) poderão ser utilizados. A presença de epítopos de células T também pode ser determinada através da medição da secreção de linfoquinas derivadas de células T por meio de métodos bem conhecidos na arte. Geralmente considera-se que os polipéptidos que não conseguem induzir uma incorporação estatisticamente significativa de timidina acima da linha de fundo (isto é, geralmente p menor que 0,05 utilizando métodos estatísticos standard) não possuem epítopos de células T, embora se compreenda que a quantidade quantitativa de incorporação de timidina poderá variar, dependendo do polipéptido que está a ser testado. Geralmente, um índice de estimulação inferior a cerca de 2-3, mais preferencialmente inferior a cerca de 1, indica a ausência de epítopos de células T. A localização e o teor dos epítopos de células T são determinados empiricamente.

No contexto de tolerogénios, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI liga-se preferencial e especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI presente na superfície de uma célula B (isto é, liga-se a um anticorpo de superfície numa célula B, em que este anticorpo é capaz de se ligar especificamente a um epítopo antifosfolípido dependente de β_2 GPI). Pensa-se que esta ligação, especialmente em conjunto com a reticulação, desencadeia a anergia celular B. Como, por definição, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI é capaz de se ligar especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, seria de esperar que qualquer polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI fosse igualmente capaz de se ligar a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI de superfície presente numa célula B.

Tal como discutido abaixo (e acima ao discutir as formas poliméricas), de preferência, no contexto de tolerogénios, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI é apresentado sob uma forma plurivalente, seja via uma forma polimérica e/ou conjugado com uma molécula de plataforma de valência apropriada.

Preparação dos polipéptidos deste invento

Os polipéptidos deste invento podem ser preparados através de procedimentos conhecidos na arte. Os polipéptidos podem ser produzidos por métodos recombinantes (isto é, polipéptidos simples ou de fusão) ou por síntese química. Os polipéptidos, especialmente os polipéptidos mais curtos com um máximo de cerca de 50 aminoácidos, são convenientemente preparados por síntese química. Os métodos de síntese química são conhecidos na arte e estão disponíveis comercialmente. Por exemplo, um polipéptido poderia ser produzido por um sintetizador automático de polipéptidos, utilizando o método em fase sólida. Os polipéptidos também podem ser preparados por síntese química, utilizando técnicas conhecidas na arte.

Os polipéptidos também podem ser preparados através de sistemas de expressão, utilizando métodos recombinantes. A disponibilidade dos polinucleótidos que codificam os polipéptidos permite a construção de vectores de expressão

que codificam o polipéptido intacto (isto é, nativo), seus fragmentos funcionalmente equivalentes ou formas recombinantes. Um polinucleótido que codifica o polipéptido desejado, seja na forma fundida ou madura e contendo ou não uma sequência sinal para permitir a secreção, poderá ser ligado em vectores de expressão adequados para qualquer hospedeiro conveniente. É possível utilizar sistemas hospedeiros tanto eucarióticos como procarióticos. O polipéptido é depois isolado a partir das células lisadas ou a partir do meio de cultura e é purificado na extensão necessária para a sua utilização pretendida. A purificação ou isolamento dos polipéptidos expressos nos sistemas hospedeiros pode ser obtido por meio de qualquer método conhecido na arte. Por exemplo, o ADNc que codifica um polipéptido intacto ou um seu fragmento pode ser ligado, de forma operacional, a um promotor adequado, introduzido num vector de expressão e transfectado para uma célula hospedeira adequada. A célula hospedeira é depois cultivada sob condições que permitem a ocorrência de transcrição e de tradução, e o polipéptido desejado é recuperado. Outros segmentos de transcrição ou de tradução de controlo, como sequências sinal que orientam o polipéptido para um compartimento celular específico (isto é, para secreção) também podem ser utilizados. Os exemplos de células hospedeiras procarióticas são conhecidos na arte e incluem, por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*. Os exemplos de células hospedeiras eucarióticas são conhecidos na arte e incluem células de levedura, aves, insectos, plantas e animais, como sejam as células COS7, HeLa, CHO e outras células de mamífero. Os sistemas de levedura incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia pastoris*.

Por exemplo, para expressar um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI em *Pichia pastoris* (utilizando, por exemplo, as estirpes SMD 1168 e SMDI 168H), utiliza-se um ADNc completo de β_2 GPI como modelo de PCR para criar fragmentos de genes do domínio 1, com um sítio de clivagem do péptido sinal Kex2 reconstituído na extremidade amino-terminal. Os fragmentos são clonados no vector de expressão pPICZalpha (Invitrogen Corp.), que é linearizado com as enzimas de restrição Xho I e Sal I. Os genes construídos substituem o péptido sinal nativo do domínio 1 pelo péptido

sinal do factor α de levedura e terminam em aminoácidos seleccionados na extremidade carboxi-terminal.

Ao utilizar um sistema de expressão para produzir polipéptidos β_2 GPI, é muitas vezes preferível construir uma proteína de fusão que facilite a purificação. Os exemplos de componentes para estas proteínas de fusão incluem, embora não se encontrem limitados a estes, myc, HA, FLAG, His-6, a glutathiona-S-transferase, a proteína de ligação à maltose ou a porção Fc da imunoglobulina. Estes métodos são conhecidos na arte. Consultar, por exemplo, Redd *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:11193-11197. As técnicas conhecidas na arte poderão ser utilizadas para remover aminoácidos indesejados das fusões, tais como His-6. Por exemplo, a carboxipeptidase A poderá ser utilizada para eliminar aminoácidos carboxi-terminais. A carboxipeptidase A pára nos aminoácidos prolina ou arginina. Para conveniência da purificação, poderá utilizar-se carboxipeptidase A em fase sólida (Sigma).

De preferência, especialmente se forem utilizados para fins de diagnóstico, os polipéptidos são pelo menos parcialmente purificados ou isolados de outros constituintes celulares. Preferencialmente, os polipéptidos possuem uma pureza de pelo menos 50%. Neste contexto, a pureza é calculada como uma percentagem em peso do teor total de proteínas da preparação. Mais preferencialmente, as proteínas têm uma pureza de 50-75%. Poderão também obter-se polipéptidos mais purificados, e estes estão incluídos no presente invento. Para uma utilização clínica, os polipéptidos são de preferência extremamente purificados, possuindo uma pureza de pelo menos cerca de 80%, e estão isentos de pirogénios e de outros contaminantes. Os métodos de purificação de proteínas são conhecidos na arte e não estão aqui descritos em pormenor.

Em alguns sistemas, especialmente alguns sistemas recombinantes, no caso das concretizações que contêm uma cisteína adicional (quinta), ou uma cisteína que será reduzida (para, por exemplo, conjugar o polipéptido com uma molécula de plataforma), o produto inicial poderá compreender dissulfuretos mistos de baixo peso molecular, nos quais a quinta cisteína (ou cisteína adicional,

reactiva) está ligada covalentemente a outro(s) grupo(s) de peso molecular relativamente baixo. Nestes casos, a redução selectiva da cisteína adicional (enquanto se conservam outras ligações dissulfureto) é desejável. Esta redução selectiva poderá ser obtida utilizando um agente redutor em fase sólida, como DTT, num suporte sólido, por exemplo acrilamida (tal como REDUCTACRYL de CalBiochem, San Diego).

Adicionalmente, em sistemas que são concebidos e/ou utilizados para produzir um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI com uma cisteína adicional (ou seja, a cisteína destina-se a servir de grupo reactivo), poderá ser desejável preparar o polipéptido de forma a que este possua um ou mais aminoácidos adicionais a seguir à cisteína adicional na sequência, para proteger a cisteína durante a síntese e/ou a produção.

De preferência, especialmente se o polipéptido for conjugado com uma plataforma (discutido abaixo), utiliza-se a síntese química. A síntese química permite a modificação da extremidade N- ou C-terminal, o que facilita a conjugação com uma molécula de plataforma.

Ao produzir um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI, como aqueles que possuem uma cisteína adicional além das quatro cisteínas do domínio 1 (que formam ligações de dissulfureto), as condições deverão ser seleccionadas para promover a formação das pontes de dissulfureto correctas. Como exemplo, um polipéptido reduzido é desnaturado por dissolução em cloridrato de guanidínio 6 M (GnHCl) para originar uma concentração de 0,5 mg/ml. O enrolamento é obtido por diálise à temperatura ambiente contra o seguinte tampão de renaturação: GnHCl 0,1 M; Tris-HCl 0,5 mM e EDTA 1 mM, pH 8,5. Para auxiliar na formação das pontes de dissulfureto correctas, adiciona-se uma mistura de glutationa oxidada 0,3 mM e glutationa reduzida 3 mM. A mistura reaccional é monitorizada por HPLC, e os diferentes produtos são analisados por espectrometria de massa. Nas nossas experiências, após 5 horas de ciclização, a HPLC analítica mostrou uma conversão de aproximadamente 65%, em que ~ 50% tinha a massa correcta (PM = 7260) e ~15% existia como um aducto glutationa (PM = 7567). A proteína enrolada

que não possui glutathionina é depois purificada por HPLC de fase reversa.

Conjugados de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI

O invento também disponibiliza conjugados de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Em algumas concretizações, o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI podem ser conjugados com um transportador ou um marcador. Várias técnicas para obter esta ligação são conhecidas na arte e não necessitam de ser aqui descritas em detalhe. Qualquer transportador que seja seguro e não induza ele mesmo a produção de anticorpos prejudiciais para o hospedeiro pode ser utilizado. Os transportadores adequados são normalmente macromoléculas grandes e metabolizadas de forma lenta, como as proteínas; polissacáridos como a Sepharose funcionalizada com látex, a agarose, a celulose, esferas de celulose e compostos idênticos; aminoácidos poliméricos, como o poli(ácido glutâmico), a polilisina e compostos similares; copolímeros de aminoácidos; e partículas virais inativas ou bactérias atenuadas, como *Salmonella*. Os substratos proteicos especialmente úteis são as albuminas séricas, a hemocianina de lapa, as moléculas de imunoglobulina, a tiroglobulina, a ovalbumina, o toxóide tetânico e outras proteínas bem conhecidas pelos peritos na arte.

Os marcadores são conhecidos na arte e não precisam de ser aqui descritos em detalhe. Há muitos marcadores e métodos de marcação diferentes que são conhecidos pelos peritos na arte. Os exemplos dos tipos de marcadores que podem ser utilizados no presente invento incluem enzimas, radioisótopos, compostos fluorescentes, metais coloidais, compostos quimioluminescentes e compostos bioluminescentes. Os peritos na arte conhecerão outros marcadores adequados ou serão capazes de os determinar, utilizando uma experimentação de rotina. Além disso, a ligação destes marcadores aos polipéptidos do invento pode ser efectuada utilizando técnicas padrão conhecidas pelos peritos na arte.

O(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (mais preferencialmente sem um epítipo de células T) poderão ser conjugados com uma molécula de plataforma de valência não

imunogénica (também designada por "plataforma"), que melhora a apresentação do(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Patente U.S. n.^{os} 5,162,515; 5,276,013; 5,552,391. Uma plataforma poderá ser proteica ou não proteica (isto é, orgânica). Os exemplos de plataformas proteicas incluem, embora não se encontrem limitados a estes, a albumina, a gama-globulina, a imunoglobulina (IgG) e a ovalbumina. Borel et al. (1990) *Immunol. Methods* 126:159-168; Dumas et al. (1995) *Arch. Dermatol. Res.* 287:123-128; Borel et al. (1995) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:264-267; Borel et al. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 778:80-87. Mais preferencialmente, uma plataforma é plurivalente (isto é, contém mais de um sítio de ligação ou união). Preferencialmente, uma plataforma plurivalente contém pelo menos dois, mais preferencialmente pelo menos 3, mais preferencialmente pelo menos 5, mais preferencialmente pelo menos 7, mais preferencialmente pelo menos 10, ainda mais preferencialmente pelo menos 12 e ainda mais preferencialmente pelo menos 15 sítios de ligação. Considera-se, contudo, que no contexto de indução de uma tolerância (isto é, quando uma plataforma é utilizada em conjugação com um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI apropriado para gerar a imunotolerância), dependendo da natureza do(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI utilizados e da condição particular, qualquer um de vários sítios de ligação poderá ser suficiente. Considera-se também que uma plataforma não é um antigénio independente das células T.

As moléculas de plataforma de valência preferidas estão biologicamente estabilizadas, isto é, apresentam uma semivida de excreção *in vivo* frequentemente de horas a dias ou a meses, para conferir uma eficácia terapêutica e são preferencialmente constituídas por uma cadeia simples e sintética de composição definida. Elas possuem geralmente um peso molecular no intervalo compreendido entre cerca de 200 e 200.000, preferencialmente entre cerca de 200 e 50.000 (ou menos, tal como 30.000). Os exemplos de moléculas de plataforma de valência, no âmbito do presente invento, são polímeros (ou são constituídas por polímeros) tais como o polietilenoglicol (PEG), a poli-D-lisina, o poli(álcool vinílico), a polivinilpirrolidona, o ácido D-glutâmico e a D-lisina (numa razão de 3:2). Os polímeros preferidos

baseiam-se em polietilenoglicóis (PEG) que possuem um peso molecular compreendido entre cerca de 200 e 8.000. Outras moléculas que poderão ser conjugadas com o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI são a albumina e a IgG.

Outras moléculas de plataforma de valência preferidas, que são adequadas para utilização no presente invento, são as moléculas de plataforma de valência não poliméricas e quimicamente definidas, como aquelas descritas na Patente U.S. 5,552,391 co-detida. Em contraste com as plataformas mais tradicionais previamente descritas, estas plataformas têm a vantagem de possuir um peso molecular homogéneo (isto é, uniforme) (em oposição a um peso molecular polidisperso) e são, assim, "quimicamente definidas". Consequentemente, considera-se que uma população de conjugados que utilizam estas plataformas compreende uma plataforma de peso molecular homogéneo ou é substancialmente monodispersa (isto é, possui uma distribuição estreita de pesos moleculares). Uma medida da largura da distribuição de pesos moleculares de uma amostra (tal como uma composição e/ou uma população de moléculas de plataforma) de uma molécula de plataforma é a polidispersividade da amostra. A polidispersividade é utilizada como uma medida da homogeneidade ou não homogeneidade de peso molecular de uma amostra de polímero. A polidispersividade é calculada dividindo o peso molecular médio ponderal (P_p) pelo peso molecular médio numérico (P_n). O valor de P_p/P_n é a unidade para um polímero perfeitamente monodisperso. A polidispersividade (P_p/P_n) é medida através de métodos disponíveis na arte, como a cromatografia de filtração em gel. A polidispersividade (P_p/P_n) de uma amostra de moléculas de plataforma é preferencialmente inferior a 2, mais preferencialmente inferior a 1,5 ou inferior a 1,2; inferior a 1,07; inferior a 1,02 ou, por exemplo, cerca de 1,05 a 1,5 ou cerca de 1,05 a 1,2. Os polímeros típicos possuem geralmente uma polidispersividade de 2-5 ou, em alguns casos, de 20 ou mais. As vantagens da propriedade de baixa polidispersividade das moléculas de plataforma de valência incluem uma biocompatibilidade e uma biodisponibilidade melhoradas, uma vez que as moléculas possuem um tamanho substancialmente homogéneo, e as variações da actividade biológica devido a variações amplas de peso molecular são minimizadas. As moléculas de baixa

polidispersividade são, assim, farmacêutica e optimamente formuladas e fáceis de analisar. Adicionalmente, há uma valência controlada da população de moléculas na amostra.

Os exemplos de moléculas de plataforma de valência quimicamente definidas e homogêneas preferidas, que são adequadas para utilizar no presente invento, incluem a 2,2'-etilenodioxidiethylamina (EDDA) derivatizada e o trietilenoglicol (TEG). Outros exemplos de plataformas quimicamente definidas e homogêneas preferidas estão descritos abaixo, assim como na arte. Em outras concretizações, um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI é conjugado com albumina, IgG e/ou PEG.

As moléculas de plataforma de valência apropriadas adicionais incluem, embora não se encontrem limitadas a estas, o tetra-aminobenzeno, a heptaminobetaciclodextrina, o tetra-aminopentaeritritol, o 1,4,8,11-tetra-azaciclotetradecano (Cyclam) e o 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano (Cyclen).

Em geral, estas plataformas são preparadas através de técnicas standard de síntese química. O PEG tem que ser derivatizado e tornado plurivalente, o que é conseguido utilizando técnicas padrão. Algumas substâncias adequadas para a síntese dos conjugados, como o PEG, a albumina e a IgG, estão disponíveis comercialmente.

A conjugação de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI com uma molécula de plataforma de valência poderá ser realizada de várias formas, que normalmente envolvem um ou mais agentes de reticulação e grupos funcionais no polipéptido e na molécula de plataforma de valência. As plataformas e o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI deverão possuir os grupos de ligação apropriados. Os grupos de ligação são adicionados às plataformas utilizando técnicas padrão de síntese química. Os grupos de ligação poderão ser adicionados a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, mediante a utilização quer de técnicas standard de síntese em fase sólida quer de técnicas recombinantes. As abordagens recombinantes poderão exigir

uma modificação pós-tradução para unir um adaptador, e estes métodos são conhecidos na arte.

Como exemplo, os polipéptidos contêm porções que englobam as cadeias laterais dos aminoácidos e que compreendem grupos funcionais, como sejam os grupos amino, carboxilo ou sulfidrilo, que servem de sítios para o acoplamento do polipéptido à plataforma. Os resíduos que possuem estes grupos funcionais poderão ser adicionados ao polipéptido se este já não os contiver. Estes resíduos poderão ser incorporados por meio de técnicas de síntese em fase sólida ou por meio de técnicas recombinantes, sendo ambas bem conhecidas nas artes da síntese peptídica. Quando o polipéptido possui cadeia(s) laterais do tipo hidrato de carbono, é possível integrar nelas grupos funcionais amino, sulfidrilo e/ou aldeído através de uma química convencional. Por exemplo, os grupos amino primários poderão ser incorporados por reacção com etilenodiamina na presença de cianoboro-hidreto de sódio, e os sulfidrilos poderão ser introduzidos por reacção de dicloridrato de cisteamina, seguida de redução com um agente redutor padrão de dissulfureto, enquanto os grupos aldeído poderão ser gerados após a oxidação por periodato. De uma forma similar, a molécula de plataforma de valência poderá também ser derivatizada para conter grupos funcionais caso não possua já os grupos funcionais apropriados.

Os polipéptidos também podem ser especificamente modificados em locais das suas extremidades C-terminais, através de um processo denominado proteólise inversa. Essencialmente, a proteólise inversa utiliza enzimas proteolíticas para catalisar a formação de ligações amida, utilizando condições que orientam a reacção nessa direcção. Os polipéptidos têm sido modificados utilizando proteólise inversa para unir adaptadores contendo hidrazida (Rose, K. et al., *Bioconjugate Chemistry* 1991, 2, 154-159) ou adaptadores contendo amino-oxi (Rose, K. et al., *Bioconjugate Chemistry* 1996, 7, 552-556) às suas extremidades C-terminais, via ligações amida. Estes polipéptidos modificados podem reagir para formar ligações hidrazona ou oxima com outras moléculas de interesse, as

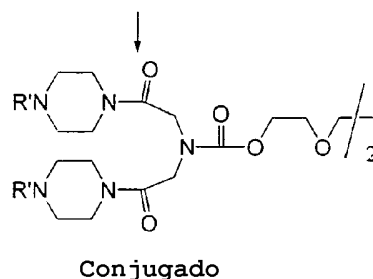
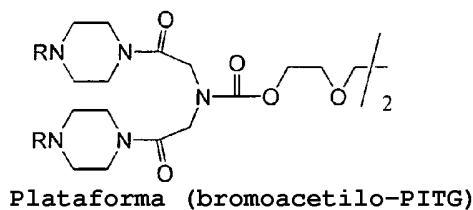
quais contêm grupos aldeído ou cetona. Adicionalmente, outros adaptadores, por exemplo, adaptadores contendo grupos sulfidrilo, poderiam eventualmente ser ligados via proteólise inversa.

Os adaptadores hidrófilos de comprimento variável são úteis para ligar polipéptidos (ou outras moléculas bioactivas) a moléculas de plataforma de valência. Os adaptadores apropriados incluem oligómeros ou polímeros lineares de etilenoglicol. Estes adaptadores incluem adaptadores com a fórmula $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$, em que $n = 0-200$, $m = 1$ ou 2 , $R^1 = H$ ou um grupo protector como tritilo, $R^2 = H$, alquilo ou arilo, por exemplo, um éster de 4-nitrofenilo. Estes adaptadores são úteis na ligação de uma molécula contendo um grupo reactivo tiol, por exemplo, haloaceílo, maleiamida, etc., via um tioéter, a uma segunda molécula que contém um grupo amino, via uma ligação amida. Estes adaptadores são flexíveis relativamente à ordem de ligação, isto é, o tioéter pode ser formado em primeiro ou em último lugar.

Tal como discutido acima, o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderão ser conjugados com qualquer uma de uma variedade de plataformas adequadas, por uma de várias formas. Em uma concretização preferida, utiliza-se a plataforma tetra-bromoacetilo-PIZ/IDA/TEG-domínio 1 de β_2 GPI. Outras concretizações preferidas são tal como descritas nos Exemplos.

Os derivados da plataforma PIZ/IDA/TEG (PITG) podem ser preparados da forma ilustrada abaixo.

Exemplos de grupos de reticulação compatíveis na plataforma PITG



Plataforma	Polipéptido contendo domínio 1	Conjugado
R = XCH ₂ CO	D1-SH	R' = D1-SCH ₂ CO

Como exemplo de uma concretização de um conjugado, prepara-se um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI com um adaptador tiol na extremidade N-terminal, recorrendo a síntese de péptidos em fase sólida ou a métodos recombinantes. O adaptador pode ser uma cisteína ou um grupo contendo SH. O polipéptido modificado poderá depois ser alquilado por meio de uma plataforma adequadamente derivatizada (por exemplo, bromoacetilo ou iodoacetilo).

Em algumas concretizações, um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI é conjugado via um grupo sulfidrílo (tiol ou SH), por exemplo, presente numa cisteína, resultando numa ligação tioéter no conjugado. Em algumas concretizações, esta cisteína reactiva é fornecida ao incluir-se a quinta cisteína de β_2 GPI (Exemplo 5).

Em algumas concretizações, os conjugados são formados via uma ligação oxima. Uma ligação oxima poderá ser formada através da reacção, por exemplo, de um grupo carbonilo, como seja um aldeído ou uma cetona, presente num polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI com uma plataforma que contém

um grupo reactivo amino-oxi, tal como amino-oxi, amino-oxiacetilo e amino-oxialquilo. Os grupos amino-oxi podem encontrar-se no trietilenoglicol ou em cadeias hexilo. Contudo, qualquer cadeia compreendendo átomos de carbono, oxigénio, azoto ou enxofre é suficiente, desde que termine em -ONH_2 .

Para preparar estes conjugados, um polipéptido contendo o domínio 1 de $\beta_2\text{GPI}$ é modificado de forma selectiva para criar um grupo aldeído ou cetona numa posição específica do polipéptido, por exemplo, na extremidade N-terminal. Em seguida, efectua-se a reacção do polipéptido com uma plataforma plurivalente que contém grupos amino-oxi, para formar ligações oxima entre a plataforma e o polipéptido.

A extremidade N-terminal do polipéptido contendo o domínio 1 de $\beta_2\text{GPI}$ pode ser convertida em um aldeído ou uma cetona através de uma reacção de transaminação, que é conhecida na arte. Geralmente, a reacção de transaminação converte a ligação simples carbono-azoto da extremidade N-terminal numa ligação dupla carbono-oxigénio. Uma glicina na extremidade N-terminal reage para formar um grupo glioxilo, um aldeído. A maioria dos outros aminoácidos reage para formar uma cetona, devido à cadeia lateral do aminoácido.

Outra forma de gerar um grupo glioxilo na extremidade N-terminal consiste em oxidar uma serina ou uma treonina N-terminal com periodato de sódio. Esta oxidação quebra a ligação carbono-carbono entre os grupos hidroxilo e amino da serina ou da treonina N-terminal, originando um grupo glioxilo.

Em algumas concretizações, é possível produzir plataformas plurivalentes contendo grupos reactivos amino-oxiacetilo (AOA) para ligar os polipéptidos selectivamente modificados às plataformas. Os grupos amino-oxiacetilo (AOA) podem ser ligados a plataformas plurivalentes que contêm grupos amina através de acilação com um grupo amino-oxiacetilo N-protégido, seguida de remoção do grupo protector. Contudo, a reacção dos polipéptidos glioxilo com plataformas derivatizadas com AOA decorre lentamente,

demorando vários dias para se formarem ligações oxima entre o polipéptido e a plataforma. O Exemplo 5 descreve a síntese de um conjugado, o composto 44, que compreendeu a união de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI transaminado a uma plataforma tetramérica aminoacetilada. O invento inclui este conjugado.

Em outras concretizações, poderão utilizar-se plataformas contendo grupos reactivos amino-oxialquilo. Os grupos amino-oxialquilo são definidos como sendo um grupo amino-oxi presente num primeiro carbono, em que o primeiro carbono não está de preferência directamente ligado a um grupo sacador de electrões, como seja um segundo carbono que faz parte de um grupo carbonilo. Observámos que os grupos amino-oxialquilo reagem mais facilmente com as cetonas e os aldeídos para formar oximas que os grupos amino-oxiacetilo. O grupo amino-oxiacetilo aparenta ser geralmente menos reactivo que outros grupos amino-oxi (grupos amino-oxialquilo) que não estão adjacentes a um carbonilo. Pensa-se que o carbonilo do grupo amino-oxiacetilo causa um abaixamento da reactividade devido aos efeitos de remoção de electrões. Mais informações relativamente a estas plataformas e conjugados podem ser encontrada nos Exemplos. O conjugado, composto 45, descrito no Exemplo 5, foi sintetizado por meio da união de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI transaminado a uma plataforma tetramérica amino-oxi. O invento inclui este conjugado, assim como aqueles conjugados oxima de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI que resultam da síntese baseada em AO.

Polinucleótidos do invento

O invento também disponibiliza polinucleótidos (incluindo polinucleótidos isolados, naturais e não naturais) que codificam um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Estes polinucleótidos são úteis, por exemplo, para produzir polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. A produção de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá ser realizada utilizando técnicas padrão da arte, tais como vectores de clonagem/expressão recombinantes e métodos de purificação de proteínas. Caso a produção decorra *in vivo*, utiliza-se um sistema de expressão apropriado, como aqueles referidos abaixo. Conhecendo a sequência de

aminoácidos do(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (que é obtida utilizando técnicas standard de sequenciação de proteínas), é possível conceber um polinucleótido que codifica essa sequência de aminoácidos particular. Os polinucleótidos poderão ser sintetizados ou obtidos (quando apropriado) a partir de sequências de ADNc ou de ADN genómico.

O invento também inclui vectores de clonagem e vectores de expressão contendo quaisquer uns dos polinucleótidos descritos acima. Estes vectores são bem conhecidos na arte (por exemplo, aqueles para utilizar *in vitro* em sistemas de expressão bacterianos, de mamífero, de levedura e de insecto) e não necessitam de ser aqui descritos. Consultar, por exemplo, Gacesa and Ramji, *Vectors*, John Wiley & Sons (1994).

O invento também inclui células hospedeiras que contêm (isto é, estão transformadas com, ou compreendem) quaisquer uns dos polinucleótidos e/ou vectores aqui descritos. É possível utilizar células hospedeiras tanto procarióticas como eucarióticas. Os hospedeiros procarióticos incluem células bacterianas, por exemplo, *E. coli*, *B. subtilis* e micobactérias. Entre os hospedeiros eucarióticos encontram-se células de fungos (incluindo leveduras), insectos, aves, plantas e mamíferos. Os sistemas de hospedeiros são conhecidos na arte e não precisam de ser aqui descritos em pormenor. As células hospedeiras deste invento podem ser utilizadas, entre outras opções, como depósitos dos polinucleótidos descritos acima e/ou como veículos para a produção de polinucleótidos que codificam polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI e/ou de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Elas também poderão ser utilizadas como veículos para a distribuição *in vivo* de polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI.

Composições do invento

O presente invento disponibiliza adicionalmente composições que compreendem polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI (incluindo todas as concretizações de polipéptidos descritas acima, tais como fusões, polipéptidos poliméricos e conjugados), bem como composições que compreendem

polinucleótidos que codificam o domínio 1 de β_2 GPI. Estas composições são especialmente úteis para administrar aqueles indivíduos que poderão beneficiar de uma indução de tolerância. As composições também são úteis como reagentes em sistemas de detecção.

Geralmente, as composições do invento destinadas à indução de uma tolerância compreendem uma quantidade eficaz de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, preferencialmente num excipiente farmacologicamente aceitável, e poderão encontrar-se sob várias formulações. Como é bem sabido na arte, um excipiente farmacologicamente aceitável é uma substância relativamente inerte que facilita a administração de uma substância farmacologicamente eficaz. Por exemplo, um excipiente pode dar forma ou consistência, ou pode actuar como um diluente. Os excipientes apropriados incluem, embora não se encontrem limitados a estes, agentes estabilizadores, agentes molhantes e emulsionantes, sais para variar a osmolaridade, agentes encapsulantes, tampões e agentes promotores da penetração através pele. Os excipientes, assim como as formulações para administração parentérica e não parentérica de drogas estão descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 19th Ed. Mack Publishing (1995).

Em geral, estas composições são formuladas para administração através de injeção (por exemplo, intraperitonealmente, intravenosamente, subcutaneamente, intramuscularmente, etc.). Por consequência, estas composições são preferencialmente combinadas com veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como solução salina, solução de Ringer, solução de dextrose e similares. Devido a considerações de ordem prática e empírica, como a solubilidade e a osmolaridade, o conjugado constituirá normalmente cerca de 0,01% a 10% em peso da formulação. O regime posológico particular, isto é, a dose, as horas e as repetições, dependerá do indivíduo particular e da história clínica desse indivíduo. Geralmente, será administrada semanalmente uma dose compreendida entre cerca de 1 μ g e 100 mg de conjugado/kg de peso corporal, preferencialmente entre cerca de 100 μ g e 10 mg/kg de peso corporal. As considerações empíricas, como seja a semivida, contribuirão

geralmente para a determinação da posologia. Outros regimes posológicos apropriados poderão implicar administrações frequentes, como uma dose diária ou 3 doses por semana, ou uma dose por semana, ou uma dose a cada duas a quatro semanas, ou uma dose num regime mensal ou menos frequente, dependendo do indivíduo ou da condição da doença. Poderá ser necessário efectuar administrações repetidas, normalmente agendadas de acordo com as velocidades de renovação das células B, para obter e/ou manter um estado de anergia humoral. Estas administrações repetidas geralmente envolvem tratamentos de cerca de 1 µg a 10 mg/kg peso corporal, ou mais, a cada 30 a 60 dias, ou mais frequentemente, caso seja detectado um aumento do nível GPL de anticorpo. Em alternativa, as formulações de libertação contínua e prolongada das composições poderão ser indicadas para algumas patologias. Várias formulações e dispositivos para obter uma libertação prolongada são conhecidos na arte.

Outras formulações incluem formas de distribuição adequadas conhecidas na arte, incluindo, entre outras, moléculas de transporte como os lipossomas. Mahato *et al.* (1997) *Pharm. Res.* 14:853-859. As preparações de lipossomas incluem, entre outras, citofectinas, vesículas multilamelares e vesículas unilamelares.

Em algumas concretizações, poderá estar presente numa composição mais de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Estas composições poderão conter pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI diferentes. Estes "cocktails", como são frequentemente designados na arte, poderão ser particularmente úteis no tratamento de um intervalo mais amplo da população de indivíduos. Eles também poderão ser úteis ao serem mais eficazes que a utilização de apenas um (ou menos do que o número contido no *cocktail*) polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI.

As composições poderão ser administradas isoladamente ou em combinação com outras formas de agentes que servem para melhorar e/ou complementar a eficácia de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, incluindo, entre outros, os

tratamentos anti-células T auxiliares (*helper*). Estes tratamentos utilizam geralmente agentes que suprimem as células T, tais como os esteróides ou a ciclosporina.

Os indivíduos apropriados para receber estas composições poderão ser identificados utilizando parâmetros clínicos conhecidos na arte, tais como a determinação dos níveis GPL de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, a determinação da presença de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, particularmente associados a estados de doença(s) e/ou sintomas de patologias associadas a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI. De preferência, o indivíduo é um ser humano. Relativamente ao anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, um nível GPL de pelo menos cerca de 10, preferencialmente pelo menos cerca de 20, mais preferencialmente pelo menos cerca de 40, poderá indicar a administração de qualquer uma destas composições. Este nível baseia-se no ensaio comercialmente disponível de momento, que é um ensaio ELISA para um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI em fase sólida (por exemplo, Inova (San Diego); Theratest (Chicago); APL Diagnostics (Louisville)). Aqueles indivíduos que apresentam uma história familiar de uma qualquer disfunção associada a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI (isto é, doença) ou aqueles indivíduos que se considera terem um nível GPL "normal", mas que apresentaram um nível GPL crescente ao longo de um determinado período de tempo, também são indicados para administração destas composições.

Geralmente, a eficácia da administração de qualquer uma destas composições é avaliada através da medição de qualquer alteração dos parâmetros clínicos descritos acima, particularmente o nível GPL de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. Contudo, a medição de qualquer parâmetro que se pensa estar associado à condição em tratamento, ou que foi demonstrado estar associado a esta condição, é adequada.

No que diz respeito aquelas composições que poderão ser utilizadas como reagentes (por exemplo, em ensaios de detecção), estas composições compreendem geralmente uma quantidade de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI

(isto é, um ou mais polipéptidos) suficiente para realizar a detecção. Estas quantidades são facilmente determinadas de forma empírica. Estas composições poderão compreender ainda uma substância, como um tampão, para efectuar a detecção. Estas composições poderão também estar opcionalmente complexadas com uma matriz de detecção, tal como uma fase sólida (por exemplo, numa coluna de imunoafinidade).

Kits compreendendo polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI

O invento também disponibiliza kits que contêm (isto é, compreendem) um ou mais polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI e, opcionalmente, anticorpos para polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI como padrão, preferencialmente kits de diagnóstico para a detecção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. Os procedimentos de diagnóstico e de monitorização que utilizam o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI deste invento podem ser realizados por laboratórios de diagnóstico, laboratórios experimentais, médicos ou indivíduos particulares. Os kits incorporados neste invento incluem aqueles que permitem a um indivíduo realizar um ensaio direccionado para a presença de anticorpos para polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, como seja qualquer um daqueles aqui descritos, detectando e/ou quantificando, assim, aqueles anticorpos. Os kits incorporados neste invento também incluem kits que permitem a detecção de anticorpos para polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI em, por exemplo, células transfectadas *ex vivo* ou *in vivo*. Por consequência, o invento inclui um kit que compreende polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI para a detecção e/ou a quantificação de um anticorpo anti-polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, de preferência um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, numa amostra biológica. Os kits deste invento encontram-se numa embalagem adequada e poderão opcionalmente disponibilizar componentes adicionais que são úteis no procedimento. Estes componentes opcionais incluem, entre outros, tampões, reagentes de captura, reagentes de desenvolvimento, marcadores, superfícies reactivas, meios para a detecção, amostras de controlo, instruções e informações para interpretação.

Quando se está a testar a presença de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI humana, qualquer meio apropriado para detectar a ligação dos anticorpos poderá ser utilizado (e fornecidos nos *kits*), por exemplo, um anticorpo anti-humano marcado, onde o marcador poderá ser uma enzima, um fluoróforo, um material quimioluminescente, um radioisótopo ou uma coenzima. Geralmente, o marcador utilizado será uma enzima.

Além de detectar anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, um polipéptido(s) β_2 GPI poderá ser um componente de um kit para detectar uma coagulação. Este kit permitiria a detecção de um papel (caso existisse) dos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI na mediação da via trombótica. Por exemplo, os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI atrasam a inactivação do Factor Va activado pela proteína C activada, ou activam a via de coagulação do factor tecidular. Verificámos que os anticorpos anti- β_2 GPI específicos para o domínio 1 atrasam a inactivação do Factor Va, tal como discutido no Exemplo 11. Um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderá ser útil na diferenciação dos efeitos mediados por anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI de outros mecanismos que influenciam a inactivação do Factor Va ou a activação da via do factor tecidular. Além disso, o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderão ser úteis em outros ensaios de coagulação funcionais (por exemplo, trombose), em que os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI ou o soro ou o plasma dos indivíduos influencia o resultado do ensaio de coagulação específica. Por exemplo, se a presença de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI alterar o resultado de um ensaio de coagulação (quando comparado com o resultado deste ensaio na ausência de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI), os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI estão implicados na via de coagulação. Esta informação poderia ser especialmente valiosa na avaliação de potenciais tratamentos específicos.

Métodos de utilização de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI

O invento também disponibiliza métodos de utilização de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, que são aplicáveis num contexto de detecção e/ou terapêutico. Por consequência, o invento compreende métodos que utilizam o(s) polipéptido(s) β_2 GPI do invento para detectar alvos adequados numa amostra biológica. Os procedimentos para realizar testes de diagnóstico (isto é, detecção) utilizando polipéptidos são amplamente conhecidos na arte e são uma questão de rotina para um perito na arte. Geralmente, para realizar um método de diagnóstico (isto é, detecção) deste invento, um dos polipéptidos deste invento (geralmente sob a forma de uma composição) é fornecido como reagente para detectar um alvo com o qual reage numa amostra biológica. O alvo é fornecido mediante obtenção de uma amostra biológica adequada de um indivíduo, para o qual o parâmetro de diagnóstico deve ser medido. Se desejado, o alvo poderá ser parcialmente purificado a partir da amostra ou amplificado antes da realização do ensaio. O invento também fornece métodos de purificação de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, utilizando um polipéptido(s) do invento. O invento também disponibiliza métodos que utilizam os polipéptidos e os polinucleótidos do invento para induzir uma tolerância.

Detecção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI

Em uma concretização, o invento disponibiliza métodos de detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, de preferência um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, numa amostra biológica. Estes métodos são geralmente aplicáveis no ambiente clínico, por exemplo, para diagnosticar e/ou monitorizar os níveis de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI num indivíduo. Estes métodos compreendem o contacto do anticorpo (antifosfolípido dependente de β_2 GPI) presente na amostra com um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (isto é, qualquer polipéptido deste invento), em condições adequadas para permitir a formação de um complexo estável entre o anticorpo específico anti-domínio 1 de β_2 GPI (tal como um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI) e um polipéptido(s) contendo o domínio 1

de β_2 GPI, e a detecção do complexo estável formado, caso este exista. O(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI do invento tornam estes métodos particularmente úteis, uma vez que ainda não foi desenvolvido nenhum ensaio conveniente ou adequado para estes anticorpos. Vários métodos de imunoensaio são conhecidos na arte e não precisam de ser descritos em detalhe. As amostras apropriadas para medir o anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI são amostras biológicas, incluindo o soro ou o plasma (preferencialmente, o soro) e o eluato contendo o tecido-alvo. O facto de a detecção de um complexo formado poder ser directa (por exemplo, através de medição da quantidade de marcador associado a um complexo) ou indirecta (por exemplo, medindo a quantidade de ligando marcado que é deslocado durante o ensaio) é bem conhecido na arte.

Para utilizar o(s) polipéptido(s) deste invento na detecção destes anticorpos num indivíduo, realiza-se um imunoensaio. O(s) polipéptido(s) é fornecido como um reagente, e o anticorpo é o alvo na amostra biológica. Por exemplo, as moléculas de anticorpo IgG humano presentes numa amostra de soro poderão ser capturadas com proteína A em fase sólida e, em seguida, cobertas com o reagente polipeptídico marcado. A quantidade de anticorpo seria então proporcional ao marcador ligado à fase sólida. Em alternativa, as células ou as secções de tecido que expressam o polipéptido poderão ser primeiro cobertas com a amostra de teste contendo o anticorpo e, em seguida, com um reagente de detecção, como seja uma espécie anti-imunoglobulina marcada. A quantidade de anticorpo seria então proporcional ao marcador ligado às células. A quantidade de anticorpo detectado na amostra seria comparada com a quantidade detectada numa amostra de controlo.

Nos métodos do invento, o polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI é habitualmente imobilizado, utilizando técnicas conhecidas, numa fase sólida adequada, como seja um material de empacotamento de uma coluna de afinidade, ou numa superfície de plástico, tal como uma placa de microtitulação ou uma banda reactiva. Os materiais de empacotamento adequados para colunas de afinidade incluem, por exemplo, uma matriz de esferas de agarose,

poliacrilamida, vidro, celulose ou dextrano reticulado. As superfícies de plástico apropriadas incluem polimetacrilato, poliestireno, polietileno, politereftalato, etilenoglicol, poliéster, polipropileno e compostos similares. Geralmente, é possível utilizar qualquer placa de microtitulação standard. Em alternativa, a fase sólida poderá encontrar-se sob a forma de um gel ou de uma matriz na qual o polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI é incorporado.

Para uma ilustração adicional, uma amostra de teste contendo um potencial anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (como seja um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI) pode ser misturada com uma quantidade predeterminada e não limitante do polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, que geralmente está marcado de forma detectável (por exemplo, com um radioisótopo ou uma enzima). Num ensaio em fase líquida, os reagentes que não reagiram são removidos através de uma técnica de separação, como filtração ou cromatografia. Nestas técnicas de imunoensaio, a quantidade de marcador associado ao complexo está correlacionada de forma positiva com a quantidade de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI presente na amostra. É possível conceber ensaios similares, nos quais o anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI presente na amostra de teste compete com um anticorpo marcado pela ligação a uma quantidade limitante do(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Aqui, a quantidade de marcador está correlacionada de forma negativa com a quantidade de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI presente na amostra.

Em algumas concretizações, a amostra biológica é uma amostra de tecido, ou um eluato de tecido, e a quantidade de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI associado à amostra de tecido é medida, por exemplo, por meio de um ensaio de ligação competitiva. Estes métodos poderão ser especialmente úteis naqueles contextos em que um tecido particular deve ser testado e/ou monitorizado quanto à presença e/ou quantidade de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. Este tipo de ensaio poderá indicar, por exemplo, uma doença particular (ou risco de doença) (tal como uma forma particular de trombose ou de disfunção da

coagulação). Um ensaio deste tipo também poderá ser útil para proporcionar uma determinação mais precisa e sensível da localização do anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, para efeitos de diagnóstico e/ou monitorização. Além disso, as informações sobre a localização do anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI também poderão fornecer ao médico uma indicação sobre as opções de tratamento adequadas.

Considera-se que estes métodos de detecção são aplicáveis numa variedade de contextos clínicos. Por exemplo, a detecção poderá ser utilizada para identificar indivíduos que apresentam um risco de desenvolver doenças ou disfunções associadas a anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI (o que poderá acontecer, pelo seu lado, pelo facto de ser possível distinguir os anticorpos associados à patologia daqueles não associados à patologia). A detecção também poderá ser utilizada para monitorizar o tratamento (por exemplo, a administração de qualquer uma das composições descritas acima). A detecção também poderá ajudar na distinção entre anticorpos patogénicos e anticorpos não patogénicos. A detecção também poderá ajudar o médico a decidir sobre as melhores opções de tratamento e/ou de prognóstico.

Tal como discutido acima, um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI também poderá ser utilizado como um componente de diagnóstico num ensaio de coagulação, especificamente um ensaio em que os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI podem modificar o resultado de um ensaio de coagulação específica. Por exemplo, se a presença de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI alterar o resultado de um ensaio de coagulação (quando comparado com os resultados deste ensaio na ausência de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI), os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI estão implicados na via de coagulação. Como o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI poderão ser úteis na diferenciação dos efeitos mediados por anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI de outros mecanismos da coagulação (como a trombose), o invento inclui métodos para detectar a participação (mediação) de um anticorpo

antifosfolípido dependente de β_2 GPI na coagulação (como a trombose), que compreende (a) efectuar uma análise de coagulação numa amostra biológica adequada de um indivíduo, utilizando um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI; (b) efectuar uma análise de coagulação numa amostra biológica adequada de um indivíduo, sem utilizar um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI; (c) comparar os resultados de (a) e (b), em que a diferença de resultados indica a participação de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI na coagulação. Estes métodos também podem ser utilizados para monitorizar a condição de um doente em termos da mediação da coagulação por parte de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, bem como da detecção inicial. Estes métodos também indicam, ou detectam, uma anomalia de coagulação envolvendo (isto é, mediada por) anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Para estes métodos, é possível utilizar plasma ou soro. Em alternativa, utiliza-se a fracção IgG, isolada utilizando métodos standard da arte. Um exemplo de um sistema de detecção da coagulação é fornecido no Exemplo 11. Em algumas concretizações, os níveis de factor V activado (Va) são determinados, geralmente medindo o tempo de coagulação. Os ensaios, o equipamento e os kits para detectar a coagulação são conhecidos na arte e estão disponíveis comercialmente.

Purificação de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI

O invento também inclui métodos de purificação de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (como seja um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI), que compreendem efectuar o contacto de uma amostra biológica contendo um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI com um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, em condições que permitem a formação de um complexo antigénio-anticorpo estável, e obter o complexo formado, caso exista. Tipicamente, o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI está acoplado a uma matriz de afinidade para purificação em coluna por afinidade. Estes métodos são uma questão de rotina na arte e não precisam de ser aqui descritos em pormenor. O Exemplo 1 também descreve a

purificação por afinidade de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

Métodos de indução de uma tolerância

Os métodos de indução de uma tolerância (isto é, de um estado tolerogénico), que compreendem administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (ou de um polipéptido que compreende um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI), o qual também não possui um epítipo de células T detectável, estão igualmente incluídos neste invento. Preferencialmente, o(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI (ou qualquer polipéptido compreendendo um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI) está também conjugado com uma molécula de plataforma adequada, tal como descrito acima. Para efeitos deste invento, considera-se que a resposta imunitária a reduzir (e/ou eliminar, estabilizar e/ou a taxa de aumento a reduzir), através da indução de uma tolerância, é uma resposta imunitária a β_2 GPI. Por consequência, a tolerância induzida é específica para o antigénio, onde o antigénio é β_2 GPI, e a tolerância é obtida num indivíduo que se determinou possuir (pelo menos antes da administração do(s) polipéptido(s) deste invento) anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Os polipéptidos apropriados deste invento (isto é, os polipéptidos compreendendo um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, que não possui um epítipo de células T) poderão ser utilizados sozinhos ou em conjunção com outros agentes que promovem a actividade/objectivo desejados. Tal como discutido acima, vários polipéptidos poderão também ser utilizados em diversas combinações uns com os outros. Diferentes formulações e meios de administração foram discutidos acima.

A determinação da indução ou não de tolerância pode ser efectuada através de qualquer meio conhecido da arte. Em geral, a tolerância é determinada através de medição da resposta imunitária a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI. Uma resposta imunitária a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI pode ser medida utilizando ensaios standard, que incluem, por exemplo, a medição dos

níveis de um anticorpo que se liga a polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI; a medição da produção de citocinas após imunização com um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI; a realização de análises *in vitro* da resposta das células T a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, após a administração de um polipéptido(s) β_2 GPI do invento, utilizando células T do indivíduo que está a receber esta administração (isto é, um indivíduo com anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI), incluindo, por exemplo, ensaios standard de captação de ^3H -timidina para medir a proliferação de células T quando apresentadas a um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, no contexto de uma célula apresentadora de antigénio; ensaios standard de libertação de ^{51}Cr para medir a morte, levada a cabo por células T citotóxicas, de uma célula apresentadora de um polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI, e ensaios similares.

Os exemplos que se seguem são fornecidos para fins ilustrativos, e não limitativos, do presente invento.

EXEMPLOS

Exemplo 1: O domínio 1 de β_2 GPI é imunorreactivo com anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI

Materiais e Métodos

Construção de mutantes de deleção ao nível dos domínios

O polipéptido β_2 GPI é constituído por 5 domínios "sushi". Para determinar a(s) região(ões) antigénica(s) de β_2 GPI, removemos selectivamente um ou mais domínios de β_2 GPI. Esta abordagem foi utilizada por Igarashi et al ((1996) *Blood* 87:3262-3270, que efectuaram deleções do polipéptido β_2 GPI humano que continham os domínios 4 e 5, os domínios 3 a 5, os domínios 2 a 5, os domínios 1 a 4 e os domínios 1 a 3. Além dos mutantes de deleção ao nível dos domínios descritos por Igarashi et al., construímos mutantes do polipéptido β_2 GPI humano contendo apenas os domínios 1 e 2.

O ponto de partida para a construção destes mutantes de deleção foi o ADNc completo do polipéptido β_2 GPI humano

(Steinkasserer *et al* (1991) *Biochem. J.* 277:387-391) clonado em pBacPAK9 (Clontech), uma oferta de S. Krilis. O passo inicial consistiu em introduzir uma marca GlyHis₆ na extremidade C-terminal. No processo, foi criado um sítio de restrição único MscI (TGGCCA), através de alteração do codão da Cys C-terminal de TGC para TGT, seguido de Gly (GGC) e His (CAC). O objectivo da marca His₆ foi permitir uma purificação fácil das proteínas mutantes através de cromatografia de quelação de Ni.

A marca GlyHis₆ foi introduzida por mutagénesse dirigida de ADN de cadeia simples. O método utilizado seguiu de perto os procedimentos publicados por Kunkel *et al.* *Methods in Enzymology* (1987) 154:367-382. Quando as células contendo o fagemídeo pBacPAK9, no qual foi inserido o ADNc que codifica o polipéptido β_2 GPI humano, foram infectadas por um fago auxiliar, M13K07, as partículas fágicas recolhidas do meio de crescimento continham predominantemente uma versão de ADN de cadeia simples de pBacPAK9. Além disso, caso as células utilizadas tivessem o genótipo *dut* 1, *ung* 1, como CJ236, alguma timidina no ADN foi substituída por uridina. O ADN de cadeia simples foi purificado a partir do fago por extracção com fenol e precipitação com etanol.

O oligonucleótido, ApoH-G6H, com a sequência 5'-AAACCACCTTAATGGTGATGGTGATGGTGCCACATGGCTTTACA-3' (SEQ ID NO:13), que é complementar de regiões em qualquer um dos lados da Cys C-terminal e que codifica GlyHis₆, foi hibridado com o ADN de cadeia simples de pBacPAK9 contendo o gene do polipéptido β_2 GPI humano, que havia sido crescido em *E. coli*, CJ236. O método de Kunkel foi utilizado para alongar o oligonucleótido complementar, resultando em ADN de cadeia dupla. A estirpe *E. coli* K91 foi transformada com a reacção. A estirpe K91 não contém o genótipo *dut* 1, *ung* 1, pelo que o ADN contendo uridina será degradado. A cadeia acabada de sintetizar, que codifica a marca GlyHis₆, deverá ser enriquecida. Os clones foram analisados por sequenciação de ADN, utilizando o *kit* de sequenase de T7 ou o *kit* de termo-sequenase (Amersham Life Sciences).

Os oligonucleótidos seguintes foram utilizados da forma acima descrita para gerar mutantes de deleção do polipéptido β_2 GPI humano ao nível dos domínios:

B2del13-60

5' GAC ATA CTC TGG GTG TCC GTC CTG CAA TAG C 3' (SEQ ID NO:14)

B2del13-120

5' TGG AGG GCA GAT GAT CCG TCC TGC AAT AGC 3' (SEQ ID NO:15)

B2del13-182

5' GAA TGG GCA TTT TAC TTC CCG TCC TGC AAT AGC 3' (SEQ ID NO:16)

B2del13-242

5' AGG TAA TTT ACA AGA TGC CCG TCC TGC AAT AGC 3' (SEQ ID NO:17)

B2del1242-326

5' ATG GTG ATG GTG GCC ACA ACT TGG CAT GGC 3' (SEQ ID NO:18)

B2del1182-326

5' ATG GTG ATG GTG GCC GCA TTC TGG TAA TTT AG 3' (SEQ ID NO:19)

Os números nos oligonucleótidos referem-se aos aminoácidos do β_2 GPI humano. Por exemplo, B2del13-60 refere-se à deleção dos aminoácidos 3-60 de β_2 GPI. A proteína resultante contém os domínios 2-5.

Segue-se um resumo das construções.

<u>Domínio(s)</u>	<u>Construção</u>	<u>Sequência esperada</u> <u>da proteína</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
2,3,4,5	B2del13-60	GRTPR	20
3,4,5	B2del13-120	GRIIC	21
4,5	B2del13-182	GREVK	22
5	B2del13-242	GRASC	23
1,2,3,4	B2del1242-326	GRTCP	24
1,2,3	B2del1182-326	GRTCP	24

Utilizou-se a técnica de PCR para gerar outros mutantes. O modelo para a reacção foi o fagemídeo pBacPAK9 contendo o ADNc que codifica o polipéptido β_2 GPI humano. O oligonucleótido pBacPac9 PCR 1270,1297, que possui a sequência 5'-CTA TAA ATA CGG ATC CCG GGA ATT CG-3' (SEQ ID NO:25) e inicia a síntese a montante da região de

multiclonagem em pBacPAK9, foi utilizado como iniciador 5'. Para construir clones somente com o domínio 1, o oligonucleótido Domain 1 PCR(64) MscI, com a sequência 5'-GCA GCT GGC CAA CTC TGG GTG TAC ATT TCA GAG TG-3' (SEQ ID NO:26), foi utilizado como iniciador 3'. De forma idêntica, para gerar um mutante contendo os domínios 1 e 2, o oligonucleótido Domain 1, 2 PCR(122) MscI, com a sequência 5'-GCA GCT GGC CAA TGA TGG GAG CAC AGA GAG GAA G-3' (SEQ ID NO:27), foi utilizado como iniciador 3'. Efectuaram-se vinte e cinco ciclos de PCR. O produto foi extraído com fenol e precipitado com etanol. Os fragmentos foram digeridos na extremidade 5' com BamHI e com MscI na extremidade 3'. Os fragmentos de ADN digeridos foram purificados em gel e ligados em pBacPAK9, do qual o polipéptido β_2 GPI completo havia sido excisado com as mesmas enzimas de restrição. As ligações foram transformadas em *E. coli* XL1-blue, e os clones foram caracterizados através de sequenciação de ADN. Os resultados foram os seguintes:

<u>Domínio(s)</u>	<u>Construção</u>	<u>Sequência esperada</u> <u>da proteína</u>	<u>SEQ ID NO:</u>
1	B2del165-326	GRTCP	24
1,2	B2del123-326	GRTCP	24

Todos os mutantes de deleção de β_2 GPI foram purificados a partir do meio de células de insecto infectadas. De uma forma geral, as células foram removidas por centrifugação, e o meio foi dialisado contra pelo menos 10 volumes de solução salina tamponada com fosfato (PBS; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM; KH_2PO_4 1,4 mM) durante 18 horas, a 4°C. No dia seguinte, qualquer precipitado foi removido por centrifugação. O meio dialisado foi tornado NaPO_4 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M, e adicionou-se resina Ni-NTA com agitação suave. Após 1 hora a 4°C, a resina foi recolhida com um funil de Buchner e empacotada numa coluna equipada com uma camisa de água mantida a 4°C. A coluna foi extensamente lavada com NaPO_4 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M, até não ser detectável qualquer proteína. A coluna foi eluída sequencialmente com o mesmo tampão contendo imidazole 20 mM, 35 mM ou 100 mM. A análise foi realizada por electroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).

As fracções apropriadas foram reunidas, e a proteína foi concentrada e dialisada contra solução salina tamponada com Tris (TBS; TrisCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM).

Anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI purificados por afinidade

Para isolar os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, dispersões multilamelares de lípidos contendo cardiolipina (e contendo também colesterol e fosfato de dicetilo) são incubadas com plasma (ou soro) contendo anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI. Estes lipossomas são depositados a partir do soro por centrifugação. Após lavagem, a mistura de lipossomas é sujeita a ruptura pelo detergente octilglucósido a 2% e é aplicada numa coluna de proteína A-agarose. Após extensas lavagens para remover primeiro os lípidos e depois os componentes diferentes de IgG, o anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI IgG é eluído da proteína A com ácido fraco, neutralizado, submetido a uma troca de tampão e testado no ensaio ELISA ACA. Este procedimento origina o anticorpo aFL enriquecido até 10.000X, que se encontra isento de qualquer β_2 GPI contaminante, tal como demonstrado por transferência de Western com anti-soros IgG de coelho anti- β_2 GPI humano. Segue-se um exemplo específico deste procedimento.

Purificação de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI a partir de soro

Os anticorpos de vários doentes foram purificados a partir do soro de doentes de diversas idades que apresentavam diferentes sintomas, incluindo: LES, SAF (incluindo várias manifestações de SAF, entre as quais, trombose venosa, aborto, trombocitopenia, AVC (acidente vascular cerebral), AIT (acidente isquémico transitório)) e oclusão arterial.

Num balão de fundo redondo de 25 ml (Kontes Scientific Co., Vineland, N.J.), secou-se uma mistura de 1,2 ml de cardiolipina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, #C-1649); 0,464 ml de colesterol (Sigma Diag., St. Louis, MO., #965-25); e 0,088 ml de 5 mg de fosfato de dicetilo (Sigma Chemical, St. Louis, MO, D-263 1) por ml de clorofórmio

durante aproximadamente 5 minutos, num Rotavap (Buchi, Suíça). Após a remoção do solvente, adicionaram-se 2 ml de NaCl a 0,96% (p/v) (J.T. Baker, Inc., Phillipsburg, NJ) e misturou-se num misturador Vortex Genie (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) durante 11 minutos. A suspensão de lipossomas foi incubada durante 1 hora a 37°C. Entretanto, o soro 6501 foi centrifugado a 600xg numa centrífuga Sorvall RT 6000 (Dupont Co. Wilmington, DE), durante 10 minutos a 8°C. Colocaram-se quatro ml do sobrenadante num balão de fundo redondo de 25 ml contendo 1 ml da suspensão de lipossomas preparada, e a mistura foi incubada com agitação, a uma velocidade média, num agitador orbital Tektator V (Scientific Products, McGraw Park, IL), durante 48 horas a 4°C e durante 2 horas adicionais a 37°C. Adicionaram-se vinte ml de TBS fria, e a mistura foi transferida para um tubo de centrifugação de polycarbonato de 50 ml (Nalge Co., Rochester, NY) e centrifugada a 27000xg durante 15 minutos a 4°C, numa centrífuga RC3 com um rotor SS-34 (Sorvall-Dupont, Wilmington, DE). O precipitado foi lavado 3 vezes com 25 ml de NaCl a 0,96% frio, utilizando a centrífuga RC3. O resíduo foi dissolvido em 1 ml de solução n-octil- β -D-glucopiranosídeo a 2% (p/v) (Calbiochem, La Jolla, CA) em TBS e aplicado numa coluna de agarose reticulada/proteína A de 0,6 ml (Repligen Corporation, Cambridge, MA), que havia sido previamente lavada com 15 vezes o volume do leito de ácido acético 1M e equilibrada com 15 vezes o volume do leito de TBS. A coluna de agarose/proteína A-anticorpo foi lavada com 40 vezes o volume do leito de octilglucopiranosídeo a 2% para remover os lípidos, seguida de lavagens extensas com TBS até a densidade óptica do eluato a 280_{nm} se aproximar da linha de base. O anticorpo ligado foi eluído com ácido acético 1M. Recolheram-se fracções de um ml, que foram imediatamente neutralizadas com 0,34 ml de Tris 3M (Bio-Rad, qualidade electroforética) por fracção e mantidas num banho de gelo. A densidade óptica de cada fracção foi determinada a 280 nm num espectrofotómetro (Hewlett-Packard, 8452A Diode Array Spectrophotometer, Palo Alto, CA). As fracções contendo o anticorpo foram combinadas, concentradas e lavadas 4 vezes com TBS em concentradores Centricon-30 (Amicon Division, W.R. Grace & Co., Beverly, MA), de acordo com o protocolo do fabricante. O rendimento final de anticorpo purificado a

partir de 4 ml de soro 6501 foi determinado por leitura da densidade óptica a 280 nm de uma alíquota da concentração, em que $1 \text{ mg} = 1,34 A_{280\text{nm}}$. O rendimento médio obtido foi de 750 μg de anticorpo a partir de 4 ml de soro 6501. O anticorpo purificado foi testado quanto a actividade ACA e analisado em termos de pureza por meio de electroforese SDS-PAGE de Laemmli.

Ensaio ELISA baseado em cardiolipina

Placas de microtitulação (Immulon 1 #3350 de Dynex Technologies) foram revestidas com 30 μl de uma solução de cardiolipina em etanol 50 $\mu\text{g/ml}$, secas durante a noite a 4°C, lavadas três vezes com PBS, pH 7,2; e bloqueadas durante uma hora à temperatura ambiente com 75 μl de gelatina de peixe a 5% (p/v) (Hipure Liquid Gelatin, Norland Products Inc. 695 Joyce Kilmer Ave., New Brunswick N.J., EUA). As placas foram lavadas três vezes com PBS, carregadas com 50 μl de $\beta_2\text{GPI}$ recombinante completo, numa concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em gelatina de peixe a 5%, e incubadas a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 μl de anticorpos antifosfolípidos dependentes de $\beta_2\text{GPI}$, purificados por afinidade (a concentração de cada anticorpo utilizado está ilustrada na Tabela 2), ou de anticorpo de coelho anti- $\beta_2\text{GPI}$ a cada poço e incubou-se a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 μl de anticorpo anti-imunoglobulina conjugado com fosfatase alcalina (anti-IgG humana, específico para a cadeia gama, Zymed #62-8422) ou de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Zymed #62-6122), diluídos apropriadamente em gelatina de peixe a 5%, e incubou-se a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 μl de substrato cromogénico da fosfatase alcalina (solução PPMP; 7,8 g de monofosfato de fenolftaleína mais 69,5 g de 2-amino-2-metil-1-propanol em 100 ml de água; solução-stock diluída de 1:26 com água imediatamente antes da utilização) e incubou-se durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A densidade óptica, a 550 nm, foi determinada através de leitura das placas num leitor automático de microplacas (Bio-Teck Instruments, modelo EL311).

ELISA de inibição competitiva

Placas de microtitulação (MaxiSorp™, Nalge Nunc International, Dinamarca) foram revestidas com 50 µl de β_2 GPI recombinante completo, numa concentração de 10 µg/ml em bicarbonato 0,1 M, pH 9,5; incubadas durante a noite a 4°C, lavadas três vezes com PBS 0,15 M, pH 7,2; e bloqueadas durante uma hora à temperatura ambiente com 75 µl de leite magro em pó a 2% (Carnation, LMP a 2%). Os inibidores de teste foram diluídos em LMP a 2% e adicionaram-se 25 µl de cada diluição aos poços revestidos. O anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI purificado por afinidade foi diluído em LMP a 2%, e adicionaram-se 25 µl de uma concentração constante aos poços, incluindo um grupo de poços não contendo qualquer inibidor que actuou como controlo positivo. O conteúdo dos poços foi misturado, e as placas foram incubadas a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de anticorpo anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina, específico para a cadeia gama (Zymed #62-8422), diluído apropriadamente em LMP a 2% e incubou-se a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de solução do substrato cromogénico PPMP da fosfatase alcalina e incubou-se durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A densidade óptica, a 550 nm, foi determinada por leitura das placas num leitor automático de microplacas (Bio-Teck Instruments, modelo EL311). A inibição percentual foi determinada por divisão da DO_{550} obtida na presença de inibidor pela DO_{550} média obtida a partir dos poços sem inibidor e depois multiplicando por 100 (mais particularmente, $[A_{550}$ média obtida a partir dos poços de controlo sem inibidor menos A_{550} do fundo] menos $[A_{550}$ obtida em presença de inibidor menos A_{550} do fundo] dividido por $[A_{550}$ média obtida a partir dos poços de controlo sem inibidor menos A_{550} do fundo] vezes 100).

Ligação directa de β_2 GPI recombinante e de mutantes, avaliada através de ELISA

Placas de micropoços revestidas com quelato de níquel (NCP 010 00 Xenopore Corp. 374 Midland Ave. Saddle Brook, NJ EUA) foram cobertas com 50 µl de diluições em série dos vários polipéptidos β_2 GPI recombinantes, em PBS, à temperatura ambiente durante 2 horas. As placas foram

lavadas três vezes com PBS e bloqueadas com 75 µl de uma gelatina a 1% (Sigma #G-2500) em PBS, durante uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade (numa concentração que havia sido previamente demonstrado fornecer cerca de 80% da ligação máxima), ou de anticorpo de coelho anti- β_2 GPI e incubou-se a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de anticorpo anti-imunoglobulina conjugado com fosfatase alcalina (anti-IgG humana, específico para a cadeia gama, Zymed #62-8422) ou de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Zymed #62-6122), diluídos apropriadamente em gelatina a 1%, e incubou-se a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de solução do substrato cromogénico PPMP para a fosfatase alcalina e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. A densidade óptica, a 550 nm, foi determinada através de leitura das placas num leitor automático de microplacas (Bio-Teck Instruments, modelo EL311).

Resultados dos estudos de inibição

Utilizaram-se sete a nove proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes diferentes para determinar a especificidade antigénica de preparações de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, provenientes de 13 doentes distintos. Cada proteína β_2 GPI mutante recombinante foi testada, de uma forma dependente da dose, quanto à capacidade para inibir um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade, de se ligar à proteína β_2 GPI completa recombinante. Os resultados de um ensaio típico estão apresentados na Figura 4. Os resultados dos ensaios de todos os 13 anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, estão resumidos na Tabela 2. Os valores que se seguem foram também observados para a proteína recombinante contendo apenas o domínio 1 (1----; consultar a Tabela 2 para ver as designações):

Ac 6203, Max 20, 50% > 10; Ac 7008, Max 40, 50% > 10; Ac 6501, Max 30, 50% > 10; Ac 6626, Max 50, 50% > 10; Ac 6632, Max 70, 50% 3; Ac 6644, Max 45, 50% > 10; Ac 7015, Max 30,

50% > 10; Ac 7101, Max 20, 50% > 10; Ac 6701, Max 80, 50% 4; Ac 6641, Max 98, 50% > 10.

Apenas os mutantes que continham o domínio 1 inibiram os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI de se ligarem à proteína β_2 GPI completa recombinante (Fig. 4). Este resultado foi verdadeiro para todas as 13 preparações de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI (Tabela 2). O facto de todas as proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes que contêm o domínio 1 terem inibido a ligação em mais de 90% indica que toda a actividade anti- β_2 GPI detectável destes anticorpos é dirigida contra o domínio 1.

Tabela 2

Resumo dos resultados de ensaios de inibição competitiva utilizando 13 preparações diferentes de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI versus nove proteínas β_2 GPI recombinantes.

Max = Inibição máxima observada nas concentrações testadas. 50% = concentração (μ M) para obter uma inibição de 50%.

	12345			1----			12---		123--		1234-		-2345		--345		---45		----5	
Ab#	Max	50%		Max	50%		Max	50%	Max	50%	Max	50%	Max	50%	Max	50%	Max	50%	Max	50%
7104	90	0,8	90	0	0,8		90	1	98	1	90	0,7	10	>57	20	>50	5	>40	0	>47
6203	75	0,8	60	(20)	>10		20	>10	75	1	30	>8	10	>57	10	>50	10	>40	5	>47
7008	90	0,2	70	(40)	>10		40	>10	80	0,4	50	>8	20	>57	20	>50	20	>40	20	>47
6501	80	0,2	70	(30)	30	(>10)	30	>10	85	0,8	30	>8	20	>57	15	>50	15	>40	10	>47
6626	80	0,3	85	(50)	8	(>10)	50	>10	90	0,8	40	>8	18	>57	20	>50	15	>40	10	>47
6632	90	0,8	90	(70)	8	(3)	70	3	90	0,2	60	2	20	>57	20	>50	20	>40	10	>47
6644	90	0,2	90	(45)	8	(>10)	45	>10	90	0,7	50	8	10	>57	10	>50	10	>40	10	>47
7015	90	0,2	90	(30)	8	(>10)	30	>10	90	0,7	50	8	10	>57	10	>50	10	>40	10	>47
7101	80	0,8	70	(20)	8	(>10)	20	>10	70	3	20	>8	5	>57	5	>50	5	>40	5	>47
6652	95	0,8	ND		ND		ND	ND	95	0,3	100	0,5	40	>16	30	>15	20	>5	15	>47
6509	70	0,1	ND		ND		ND	ND	90	0,3	80	3	20	>16	20	>15	20	>5	10	>47
6701	100	0,1	ND	(80)	ND	(4)	ND	ND	95	0,3	30	>8	10	>16	20	>15	15	>5	10	>47
6641	96	0,1	ND	(98)	ND	(>10)	ND	ND	60	4	60	2	20	>16	10	>15	20	>5	10	>47

Resultados do teste de ligação directa de proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes por anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, na ausência de cardiolipina

Examinaram-se sete a nove proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes diferentes para determinar se elas poderiam suportar a ligação directa de preparações de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, na ausência de um fosfolípido aniónico. Todas as

proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes foram analisadas com as preparações de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, provenientes de 11 doentes diferentes. Cada proteína β_2 GPI mutante recombinante foi testada de uma forma dependente da dose, e incluiu-se GST-6his como controlo negativo. As proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes foram ligadas a placas de microtitulação revestidas com níquel por meio da sua cauda 6-his. Todas as proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes testadas se ligaram a anticorpo de coelho anti- β_2 GPI, mostrando que eram analisáveis por anticorpo (Fig. 5). Os resultados de uma experiência de ligação típica indicam que apenas aquelas proteínas que contêm o domínio 1 se ligam ao anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade (Fig. 6). Os resultados dos ensaios de todos os 11 anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, estão resumidos na Tabela 3. Os resultados mostram que os anticorpos de todos os doentes se ligam de forma significativa às proteínas recombinantes β_2 GPI que contêm o domínio 1, ao passo que a ligação específica às proteínas recombinantes sem o domínio 1 foi fraca ou inexistente.

Tabela 3

Ensaio de ligação directa utilizando poços com quelato de níquel carregados com a proteína β_2 GPI recombinante, mutante de deleção, indicada versus 8 preparações diferentes de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI

D.O. máxima para cada combinação de mutante de deleção:anticorpo

	12345	1----	12---	123--	1234-	-2345	--345	---45	----5
Ab#									
6501	1,772	0,911 1	0,028	0,909	0,628	0,018	0,030	0,086	0,004
6626	1,527	0,560	0,073	1,250	0,563	0,008	0,022	0,086	0,028
6652	0,640	0,262	ND	0,320	0,135	0,008	0,016	0,013	0,012
6632	1,419	0,351	0,016	0,121	0,003	0,031	0,004	0,000	0,013
7008	1,380	0,195	0,008	0,360	0,149	0,019	0,018	0,030	0,007
6701	0,948	0,388	ND	0,841	0,715	0,002	0,002	0,000	0,000
6203	1,270	1,029	0,119	0,938	0,668	0,074	0,072	0,142	0,044
7015	1,864	1,102	0,063	1,160	0,454	0,114	0,042	0,167	0,078
6641	2,555	0,252	--	0,530	0,145	0,045	0,019	0,112	0,018
6644	1,848	0,493	--	1,020	0,768	0,041	0,048	0,151	0,017
7101	1,257	0,804	--	0,951	0,843	0,056	0,042	0,167	0,078
Coelho	2,065	1,9737 --		1,971	1,708	1,873	1,993	1,941	1,663

Ligação directa de proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes por anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, na presença de cardiolipina

Examinaram-se sete proteínas mutantes β_2 GPI recombinantes diferentes para determinar se elas poderiam suportar a ligação directa de preparações de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, purificados por afinidade, na presença de fosfolípido aniónico. Todas as sete proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes foram analisadas com anticorpo de coelho anti- β_2 GPI e com uma preparação de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade. Cada proteína β_2 GPI mutante recombinante foi testada de uma forma dependente da dose, e incluiu-se GST-6his como controlo negativo. As proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes foram ligadas a placas de microtitulação que haviam sido previamente revestidas com cardiolipina. Todas as sete proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes se ligaram ao anticorpo de coelho anti- β_2 GPI, indicando que se ligaram à cardiolipina e que são analisáveis por anticorpo (Fig. 7). Os resultados de uma experiência típica com anticorpos de doentes mostram que apenas aquelas proteínas que contêm ambos os domínios 1 e 5 se ligaram ao anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade (Fig. 8).

Com base nos resultados deste exemplo apresentados acima, nós acreditamos que, em determinadas condições, a proteína β_2 GPI está ligada a suportes em fase sólida (tais como placas irradiadas, placas revestidas com cardiolipina, placas de microtitulação da marca Nunc e placas com quelato de níquel no caso das proteínas β_2 GPI recombinantes que contêm uma cauda 6-his) de uma forma que permite que o(s) epítopo(s) antigénico(s) no domínio 1 sejam facilmente acessíveis aos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI, mas que tal não acontece quando a proteína está ligada a outras superfícies, como placas não irradiadas ou muitas outras marcas de placas de microtitulação. Estes estudos de inibição confirmam os relatos de outros autores de que um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI pode ligar-se a β_2 GPI na ausência de fosfolípido. Galli *et al.* (1990) *Lancet* 335:1544; Rouby *et al.* (1995); Arvieux *et al.* (1991) *J.*

Immunol. Methods 143:223. As cinco proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes que promovem uma inibição no ensaio de inibição competitiva - aquelas que contêm o domínio 1 - são as mesmas que se ligam ao anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI nas placas com quelato de níquel. As proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes ligadas às placas com quelato de níquel foram confirmadas por meio da capacidade do anticorpo de coelho anti- β_2 GPI para se ligar a todas as nove proteínas recombinantes. Em contraste, apenas a proteína β_2 GPI recombinante completa (isto é, a única proteína recombinante testada que contém ambos os domínios 1 e 5) pôde ser facilmente detectada em placas revestidas com cardiolipina. As proteínas β_2 GPI mutantes recombinantes ligadas às placas revestidas com cardiolipina foram confirmadas por meio da capacidade do anticorpo de coelho anti- β_2 GPI para se ligar a todas as nove proteínas recombinantes.

Tanto os resultados da inibição (Fig. 4) como da ligação directa (Fig. 6), via placas revestidas com níquel, mostram claramente que a especificidade antigénica das 13 preparações de anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI estudadas é dirigida para um epítopo que está no domínio 1 de β_2 GPI.

Exemplo 2: Especificidade dos anticorpos de doentes com SAF

A localização da região de ligação epitópica nos estudos descritos nos Exemplos anteriores baseou-se na utilização de anticorpos purificados por afinidade provenientes de doentes com SAF com título elevado. A purificação de anticorpos SAF por afinidade necessita de doentes com um título elevado e não se presta facilmente ao estudo de doentes com um título mais baixo ou de grandes populações de doentes. Desta forma, desenvolvemos uma abordagem alternativa para avaliar o(s) domínio(s) de ligação aos anticorpos em amostras de doentes com SAF, que se baseia na utilização de soro e que é mais propensa a permitir a avaliação de um número superior de doentes.

A ressonância plasmónica de superfície (SPR) fornece uma medida quantitativa da interacção entre uma proteína

imobilizada e um analito solúvel. Os presentes estudos aplicaram o SPR para medir a interação entre a proteína β_2 GPI imobilizada e mutantes de deleção de β_2 GPI, ao nível dos domínios, igualmente imobilizados com o plasma humano proveniente de um grupo de doentes normais e de doentes com SAF. Os estudos foram concebidos para determinar se a imunodominância do domínio 1 de β_2 GPI poderia ser generalizada para a maior população de doentes com SAF.

Materiais e métodos

Reagentes. Os *chips* CM5 e os tampões NHS, EDC e HBS-EP foram obtidos de BIAcore. A haptoglobina humana (fenótipo 1-1), uma proteína que contém o motivo consenso de repetição curto encontrado em β_2 GPI, foi imobilizada numa célula de fluxo separada no *chip* e utilizada como controlo negativo. A proteína β_2 GPI recombinante e os mutantes de deleção de β_2 GPI ao nível dos domínios foram expressos em células Tn5, utilizando o sistema de expressão de proteínas de baculovírus, e purificados a partir dos sobrenadantes por coluna de afinidade com quelação de níquel. Iverson et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15542-15546. As amostras de plasma humano normal foram compradas (George King Biomedical) ou obtidas internamente. As amostras de plasma de doentes provenientes de indivíduos diagnosticados com síndrome de anticorpos antifosfolípidos primária ou secundária (para lúpus) foram obtidas a partir de várias fontes clínicas.

Os 55 controlos utilizados neste estudo foram obtidos de uma amostra heterogénea. Incluíram-se na análise trinta amostras de controlo (15 homens; 15 mulheres; idade média: 34 anos; gama de idades: 19-45 anos) compradas de George King Bio-Medical (Overland Park, KS), 5 voluntários locais (3 homens, 2 mulheres), 2 fontes comerciais combinadas e 18 dadores do banco de sangue de origem desconhecida. As amostras dos doentes foram recolhidas de várias fontes e incluíram doentes com histórias de trombose venosa, oclusões arteriais, oclusões vasculares cerebrais, abortos múltiplos e trombocitopenia. Todos os doentes incluídos no estudo possuíam níveis de anticorpo antifosfolípido IgG (GPL) ≥ 20 , tal como determinados por ensaio interno.

A fracção de IgG total foi isolada a partir do plasma, utilizando esferas de agarose e proteína G Immunopure Plus e tampões de eluição e de ligação de IgG Immunopure, de acordo com a recomendação dos fabricantes (Pierce).

Ressonância plasmónica de superfície. Todas as experiências foram efectuadas utilizando um instrumento BIAcore™ 2000 a 25°C, com um caudal de 10 µL/minute. O equilíbrio do *chip* e os estudos de ligação foram efectuados com tampão HBS-EP desgaseificado, que consiste em HEPES 0,01 M pH 7,4; NaCl 0,15 M; EDTA 3mM e tensioactivo P20 a 0,005% (v/v). O acoplamento covalente dos ligandos proteicos, através dos seus grupos amino livres, ao *chip* CM5 foi obtido fazendo fluir 40 µl de NHS 0,05M/EDC 0,2M sobre o *chip* para activá-lo, seguido de exposição ao ligando proteico apropriado. A proteína β_2 GPI(His)₆ recombinante, os mutantes de deleção de β_2 GPI ao nível de domínios e a haptoglobina foram imobilizados sobre o *chip* CM5 activado com NHS, fazendo fluir 50 µl de uma solução 25 µg/ml em acetato 10 mM (pH 4,8). Os grupos reactivos em excesso presentes na superfície do *chip* são depois bloqueados com 40 µl de etanolamina 1 M (pH 8,5). As amostras de plasma humano (130 µl) foram diluídas de 1:1 com HBS-EP, forçadas a fluir sobre o *chip* com β_2 GPI, e os valores de resposta foram recolhidos durante 780 segundos. Os *chips* foram regenerados entre as exposições às amostras com 80 µl de glicina-HCl 0,1 M (pH 2,1); NaCl 0,1 M. Uma vez que a abordagem ao equilíbrio da ligação encontrava-se incompleta durante o período de medição, o valor da ligação no equilíbrio (R_{eq}) foi determinado adaptando as curvas de associação à equação seguinte, utilizando o *software* dos fabricantes (BiaEvaluation versão 2.2, Uppsala, Suécia)

$$R_t = R_{eq}(1 - e^{-k_s(t-t_0)}) + R_0$$

em que R_t é a resposta BIAcore medida no tempo t , R_{eq} é a resposta de patamar no equilíbrio, t é o tempo, t_0 é o tempo inicial, k_s é uma constante de associação aparente ($k_s = k_a C + k_{dis}$, em que k_a é a constante de associação, C é a concentração do analito e k_{dis} é a constante de dissociação) e R_0 é um desvio da resposta. Em algumas experiências, as fracções de IgG total das amostras de plasma humano foram

obtidas através de ligação a proteína G e de eluição a partir desta com ácido. O plasma remanescente após a ligação à proteína G foi remisturado com esferas de proteína G novas e isolado como plasma desprovido de IgG. As preparações de IgG neutralizadas e o plasma desprovido de IgG, diluídos de 1:1 com tampão, foram forçados a fluir sobre o *chip* com β_2 GPI tal como descrito acima.

Resultados e Discussão

As proteínas β_2 GPI recombinantes humanas contendo os domínios 1-5, 2-5 e apenas o domínio 1 foram clonadas em vectores de expressão de baculovírus e expressas em células TN5. Aliquotas das proteínas purificadas foram analisadas e quantificadas através de análise de aminoácidos. Cada proteína continha um único amino-terminal, e os padrões internos permitiram uma quantificação rigorosa com base na análise de aminoácidos.

O grupo de doentes com SAF foi obtido de vários centros e consistiu em 106 doentes com GPL ≥ 20 , que haviam sido diagnosticados com sintomas da síndrome de anticorpos antifosfolípidos (SAF). As histórias dos doentes não estavam completas, mas as histórias disponíveis incluíam trombose venosa, trombose arterial, acidentes vasculares cerebrais, abortos múltiplos, partos prematuros e trombocitopenia. Os valores GPL variaram entre 20 - 807 (413 ± 161 , média \pm DP), com um valor de mediana de 77. A população de controlo normal consistiu em 55 amostras obtidas de doadores internos, fontes comerciais ou do banco de sangue de San Diego.

O soro dos doentes com SAF e dos controlos foi diluído de 1:1 em tampão e avaliado quanto à ligação a β_2 -GPI(D1-5) imobilizada. A magnitude da interacção com β_2 -GPI(D1-5) está apresentada na Tabela 4. A Req média para β_2 -GPI(D1-5) foi de 730 e de 328, com um valor de mediana de 635 e de 201, para os 106 doentes com SAF e para os 55 doentes de controlo, respectivamente. A diferença entre os doentes e o grupo de controlo foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$; teste t de Student). A magnitude da interacção do soro de doentes com SAF e do soro de controlo com β_2 -GPI(D2-5) não foi diferente entre estes grupos (Tabela 4).

Tabela 4: Ligação do soro de doentes

	Doentes (GPL \geq 20)	Controlos
Número de sujeitos	106	55
$R_{eq}D1-5$ (média \pm epm)	730 \pm 42	328 \pm 52
$R_{eq}D2-5$ (média \pm epm)	158 \pm 36	160 \pm 26
Mediana $R_{eq}D1-5$	635	201
Mediana $R_{eq}D2-5$	24	103
% selectivo para D1	88%	12%

Calculou-se uma razão de selectividade para descrever a ligação relativa das amostras de soro aos mutantes de deleção de β_2 -GPI ao nível dos domínios, que diferem apenas na presença do domínio 1. Esta razão de selectividade foi calculada dividindo a ligação (R_{eq}) a β_2 -GPI(D1-5) pela ligação a β_2 -GPI(D2-5). Selecionou-se arbitrariamente um factor de 3 ou superior para definir aqueles doentes que apresentam uma interacção preferencial com a proteína nativa contendo o domínio 1. A magnitude da interacção com ambas as proteínas β_2 -GPI(D1-5) e β_2 -GPI(D2-5) foi baixa no grupo de controlo, e a maioria dos doentes de controlo não apresentou nenhuma selectividade para qualquer uma das proteínas imobilizadas (Tabela 4). Em contraste, 88% dos doentes com SAF apresentaram uma selectividade $\geq 3x$ para a proteína β_2 -GPI contendo o domínio 1. Quarenta e um por cento (43/106) dos doentes com SAF tiveram uma interacção desprezável com β_2 -GPI(D2-5) ($R_{eq} < 9$), resultando em razões de selectividade muito elevadas.

Os soros de 10 doentes com razões de selectividade iguais a 3 foram adicionalmente caracterizados para determinar se as interacções observadas no soro podiam ser atribuídas à fracção IgG. As interacções do plasma completo, do plasma desprovido de IgG e da IgG total com β_2 -GPI(D1-5) estão ilustradas na Tabela 5. A remoção da IgG do soro, através da utilização de proteína G, removeu praticamente todas as interacções de ligação específicas com as proteínas imobilizadas. A fracção IgG foi eluída com ácido a partir da proteína G e foi testada quanto à interacção com as proteínas (denominada "IgG total" na Tabela 5; a

neutralização subsequente diluiu a fracção IgG em 50% relativamente ao plasma completo e ao plasma desprovido de IgG). A fracção IgG apenas mostrou interacção com β_2 -GPI(D1-5) e produziu respostas que foram semelhantes em magnitude à interacção do soro original com β_2 -GPI(D1-5) (salienta-se a diferença de diluição). Assim, a ligação dos soros de doentes, que são selectivos para o domínio 1, à proteína β_2 -GPI pode ser atribuída à fracção IgG neste sistema de ensaios.

Tabela 5: Valores R_{eq} BIAcore para amostras de plasma "selectivo para D1" provenientes de doentes com SAF

Doente	Plasma completo (1:2)		Plasma desprovido de IgG (1:2)		IgG total (1:4)	
	(d2-5)	(d1-5)	(d2-5)	(d1-5)	(d2-5)	(d1-5)
6501	333	1526	0	0	0	732
6701	199	952	0	0	0	460
6626	37	1622	0	49	0	1132
6515	259	1024	0	0	0	440
6207	19	1450	0	0	0	480
6642	8	811	0	48	0	480
7015	158	2092	0	0	0	864
6703	65	1001	0	0	0	556
6601	84	792	0	0	0	266
7201	0	603	0	0	0	292

Um subgrupo dos doentes SAF não selectivos (razão de selectividade <3) foi adicionalmente avaliado para determinar se a sua ligação poderia ser atribuída à fracção IgG. Os resultados estão apresentados na Tabela 6. Tal como no caso dos doentes selectivos para o domínio 1, todas as interacções com qualquer uma das proteínas imobilizadas pôde ser removida através de tratamento do soro com proteína G, para esgotar a fracção IgG. A fracção IgG dos doentes aparentou reflectir a ligação observada na amostra de soro original (Tabela 6).

Tabela 6: Valores R_{eq} BIAcore para amostras de plasma "não selectivo" provenientes de doentes com SAF

Doente	Plasma completo (1:2)		Plasma desprovido de IgG (1:2)		IgG total (1:4)	
	(d2-5)	(d1-5)	(d2-5)	(d1-5)	(d2-5)	(d1-5)
6117	386	324	0	0	79	120
6194	3197	2046	0	0	688	470
6649	553	758	0	0	127	253
6627	549	324	0	0	182	132
7013	167	241	0	0	75	115
6611	1002	892	0	0	177	251

O presente estudo utilizou a técnica de ressonância plasmónica de superfície para localizar o domínio de ligação aos anticorpos, numa população grande e transversal de doentes com SAF (n = 106; GPL ≥ 20). O soro de doentes com SAF apresentou uma ligação significativamente maior a β_2 -GPI que os controlos sem SAF. Adicionalmente, a maioria dos soros dos doentes ligou-se à proteína β_2 -GPI(D1-5) nativa numa extensão maior que a um mutante de deleção de β_2 -GPI ao nível dos domínios, que continha todos os domínios excepto o domínio 1. Oitenta e oito por cento dos doentes apresentaram uma especificidade 3x ou superior para a proteína β_2 -GPI contendo o domínio 1, em relação a um mutante de deleção ao nível dos domínios que não possuía o domínio 1. A actividade de ligação ao domínio 1 no soro dos doentes com SAF foi completamente removida por esgotamento do componente IgG, e a actividade de ligação pôde ser totalmente reconstituída na fracção IgG. Estes resultados indicam que os epítomos de ligação imunodominantes, na maioria dos doentes com SAF, estão localizados no domínio amino-terminal de β_2 -GPI.

Exemplo 3: Análise de fragmentos do domínio 1 quanto à sua imunorreactividade para os anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI

Síntese de hexapéptidos

O aminoácido N- α -Fmoc protegido, preso a resina Wang, foi suspenso duas vezes em piperidina a 20% em

dimetilformamida (DMF), durante um tempo total de reacção de 30 minutos, para desproteger a amina. Os hexapéptidos com prolina C-terminal foram preparados com prolina não protegida ligada a resina clorotritilo, em vez de resina Wang, para prevenir a formação de dicetopiperazina.

A resina foi enxaguada duas vezes com DMF e álcool metílico. Adicionou-se à resina uma solução de N-hidroxibenzotriazole (6 equiv.), 1,3-diisopropilcarbodiimida (6 equiv.) e o segundo aminoácido (6 equiv.) mais indicador, em DMF. A mistura reaccional foi agitada durante um mínimo de 1,5 horas à temperatura ambiente. A resina foi depois enxaguada duas vezes com DMF e álcool metílico. Efectuou-se o teste de Kaiser (2 gotas de ninidrina a 5% em álcool etílico + 1 gota de piridina + 1 gota de fenol a 80% em álcool etílico) numa pequena porção da resina enxaguada, para verificar a ausência da amina livre.

Os passos de desprotecção e de adição de aminoácido foram repetidos para terminar a sequência. O aminoácido final foi desprotegido da forma descrita acima para originar a amina livre.

Os péptidos foram clivados da resina com uma solução de fenol a 7,5% (em peso), etanoditiol a 2,5% (em volume), água a 5,0% (em volume) e tioanisole a 5,0% (em volume) em ácido trifluoroacético (TFA). A mistura foi agitada durante um mínimo de três horas. O TFA foi removido utilizando vácuo, e o péptido foi precipitado e lavado duas vezes com éter. O sólido foi dissolvido em acetonitrilo/água 1:1 para análise. Os péptidos foram caracterizados por LC-MS numa coluna C18 (5µ, 150Å) de 1,0 x 150 mm (A: TFA a 0,1%; acetonitrilo a 2% em água; B: TFA a 0,08%; água a 2% em acetonitrilo).

O acetonitrilo e a água foram removidos sob vácuo ou por liofilização, e os péptidos foram armazenados a 0°C.

Os péptidos que apresentaram actividade foram novamente preparados em maior escala e purificados utilizando uma coluna C18 (A: TFA a 0,1% em água; B: TFA a 0,08% em acetonitrilo).

ELISA de inibição competitiva

Placas de microtitulação (MaxiSorp™, Nalge Nunc International, Dinamarca) foram revestidas com 50 µl de proteína β_2 GPI completa recombinante, numa concentração de 10 µg/ml em bicarbonato 0,1 M; pH 9,5; incubadas durante a noite a 4°C, lavadas três vezes com PBS 0,15 M, pH 7,2 e bloqueadas durante uma hora à temperatura ambiente com 75 µl de leite magro em pó a 2% (Carnation, LMP a 2%). Os inibidores de teste foram diluídos em LMP a 2% e adicionaram-se 25 µl de cada diluição aos poços revestidos. O anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, purificado por afinidade, foi diluído em LMP a 2% e adicionaram-se 25 µl de uma concentração constante aos poços, incluindo a um grupo de 11 poços não contendo qualquer inibidor que actuou como controlo positivo. O conteúdo dos poços foi misturado, e as placas foram incubadas a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de anticorpo anti-IgG humana, específico para a cadeia gama, conjugado com fosfatase alcalina (Zymed #62-8422), diluído apropriadamente em LMP a 2%, e incubou-se a 37°C durante uma hora. As placas foram lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de solução do substrato cromogénico PPMP da fosfatase alcalina e incubou-se durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A densidade óptica, a 550 nm, foi determinada por leitura das placas num leitor automático de microplacas (Bio-Teck Instruments, modelo EL311). A inibição percentual foi determinada por divisão da DO_{550} obtida na presença de inibidor pela DO_{550} média obtida a partir dos 11 poços sem inibidor e depois multiplicando por 100.

Estudos de inibição

Sintetizaram-se setenta e quatro péptidos, que foram rastreados no ensaio ELISA de inibição competitiva. Resumidamente, os péptidos “brutos”, isto é, não purificados, foram rastreados, utilizando uma diluição de 1:2, contra três anticorpos anti-cardiolipina diferentes purificados por afinidade. Os péptidos que se mostraram positivos, a uma diluição de 1:2, foram depois novamente rastreados utilizando uma nova diluição dupla. Vinte e oito péptidos, que mostraram inibição a diluição elevada, foram novamente sintetizados e purificados. Estes péptidos

purificados foram depois analisados no ensaio de inibição competitiva. A proteína β_2 GPI recombinante foi também analisada como controlo positivo.

Os resultados, que estão apresentados na Figura 9, mostram que alguns dos péptidos podem inibir a ligação dos anticorpos anti-cardiolipina a β_2 GPI. A maioria dos péptidos testados não inibiu esta ligação, conferindo, assim, um grau de especificidade aqueles que efectivamente inibem a ligação. Com excepção de dois, todos os péptidos positivos estão agrupados à volta dos dois conjuntos de cisteínas ligadas por meio de pontes de dissulfureto presentes no domínio 1. Os dois péptidos que não estão agrupados desta forma são também os que apresentam uma inibição mais fraca. Estas cisteínas ligadas por meio de pontes de dissulfureto poderão criar estruturas que são reconhecidas pelos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

Exemplo 4: Resultados de mutagénese e de "micropanning" para determinar os resíduos de aminoácidos presentes no domínio 1 que são críticos para a ligação a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI

PCR propenso a erros

O PCR propenso a erros foi efectuado da forma que se segue. O domínio 1 da proteína β_2 GPI humana foi amplificado por PCR em condições que aumentam a taxa de erro da Taq-polimerase. Os iniciadores utilizados permitiram a amplificação dos aminoácidos 1-64. Um sítio de restrição SfcI foi incorporado como parte do aminoácido 1. Na extremidade 3', incorporou-se um sítio de restrição SalI após o aminoácido 64. A reacção de PCR foi efectuada da forma descrita por Leung et al. (1989) *Technique* 1:11, utilizando $MnCl_2$ 0,25 mM. O produto de PCR foi digerido com SfcI e SalI e clonado em fd-tet-DOG2, que havia sido digerido com ApaI e SalI. Isto posiciona o domínio 1 na extremidade N-terminal de pIII, imediatamente após a sequência sinal de pIII. A reacção de ligação foi submetida a electroporação em *E. coli* K91. Os fagos foram colhidos e titulados por métodos standard. Os clones fágicos resultantes foram analisados utilizando uma técnica de "micropanning" (procedimento de microselecção).

"Micropanning"

Revestiram-se placas Immulon de tipo 2 com proteína G. A proteína G foi preparada numa concentração de 5 µg/ml em NaHCO₃ 0,1 M, adicionaram-se 100 µl por poço aos poços das placas de microtitulação e incubou-se durante a noite a 4°C. Após eliminar o excesso de solução de proteína G das placas, cada poço foi bloqueado com 200 µl de 2YT durante 1 hora à temperatura ambiente, com agitação numa plataforma oscilante. Utilizou-se solução salina tamponada com Tris, pH 7,4/Tween 20 a 0,5% (TBS/Tween), com um lavador automático de placas, para lavar os poços 4 vezes com 200 µl. Adicionaram-se cem µl dos anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI humana 6626, 6501, 6701, de anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI de coelho ou de IgG normal de controlo, diluídos para uma concentração de 2,5 µg/ml com 2YT, aos poços lavados. A placa foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente numa plataforma rotativa.

Os fagos a testar por "*micropanning*" foram obtidos a partir das placas de ágar geradas por "*biopanning*". Cada clone a testar foi transferido, utilizando palitos estéreis, para um poço separado de uma placa de microtitulação de 96 poços de fundo redondo (Coming, Corning, NY), contendo 200 µl de 2YT/Tet por poço, e cultivado durante a noite a 30°C. Após a incubação durante a noite, as culturas de fagos foram centrifugadas a 1300 xg, durante 10 minutos à temperatura ambiente, utilizando um suporte de placas de microtitulação. Os sobrenadantes constituíram a fonte de fagos "puros". Os fagos puros foram diluídos de 1:100-1:1000 e adicionaram-se 100 µl à placa contendo o anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI 6501 ligado a proteína G e contendo IgG normal, preparada da forma descrita acima. A incubação dos fagos diluídos com anticorpo aFL ou com IgG de controlo foi realizada durante 2 horas à temperatura ambiente, num dispositivo rotativo plano. Após 9 lavagens com TBS/Tween num lavador automático de placas, os fagos ligados a IgG foram eluídos com 20 µl de HCl-glicina 0,2 N/BSA a 0,1%, pH 2,2. A incubação de eluição continuou durante 10 minutos à temperatura ambiente. Durante este período, preparou-se uma nova placa de microtitulação

Corning contendo 20 µl por poço de *E. coli* mantida sem alimento, que se conservou gelada. Adicionaram-se cento e quarenta µl de Tris 29 mM à placa contendo os eluatos fágicos, de forma a neutralizar o pH, após o que se transferiram 20 µl da suspensão fágica de cada poço para o poço correspondente na placa contendo *E. coli* mantida sem alimento. Após uma incubação de 10 minutos a 37°C, adicionaram-se 200 µl de 2YT e prosseguiu-se a incubação durante mais 30 minutos a 37°C. Utilizando pipetas multicanal, aplicaram-se 8 µl de cada poço em pontos numa placa grande de ágar 2YT/Tet, conservando a orientação e o padrão de 8 x 12 poços original da última placa de microtitulação. Após permitir a secagem dos pontos durante 30 minutos, a placa foi incubada durante a noite a 30°C. No dia seguinte, as colónias foram classificadas semiquantitativamente de 0 a 4+, com 0 simbolizando <10 colónias; 1+= 10-30; 2+= 30 colónias até uma confluência de 70%; 3+= confluência de 70%-90%; 4+= confluência.

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 7A e 7B. No caso da Tabela 7A, o anticorpo de coelho anti-β₂GPI humana foi executado em duas ocasiões separadas. As mutações são identificadas pelo aminoácido original, o número da posição e a identidade do aminoácido nessa posição no mutante. Por exemplo, S31F indica que a Ser na posição 31 foi mutada para uma Phe. O domínio 1 não mutado possui uma classificação 3+, enquanto o fago contendo o domínio 5 originou uma classificação -. As mutações silenciosas não são apresentadas. Os clones começam na extremidade N-terminal e progridem na direcção da extremidade C-terminal.

A Tabela 7B representa uma expansão da análise mutacional e ilustra mutantes adicionais que foram testados contra anticorpos adicionais. Os quatro clones fágicos finais possuem mutações designadas por um asterisco, indicando que o fago possui mutações múltiplas (3A4: D8A, S13T; 3F123: L10I, P17Q, Y22C; 3G1:R2W, S38T; 4D1:N56T, R63G).

Os resultados indicam, entre outros aspectos (ver abaixo), que (a) o ensaio é consistente; (b) nem todos os anticorpos reagem da mesma forma; (c) mutações diferentes na

mesma posição podem ter efeitos muito diferentes (ver Met 42, por exemplo).

Os resultados globais estão representados no modelo da estrutura terciária do domínio 1 apresentado na Fig. 3. Aparentemente, os aminoácidos 55-58 (Ile, Asn, Leu), os aminoácidos 40-45 (incluindo os aminoácidos 43-45, nomeadamente, Arg, Lys, Phe) e o aminoácido 19 (Lys) são importantes para a ligação a um anticorpo aCL.

Tabela 7A
"Micropans" de fagos contendo um domínio 1 mutante

Clone	Mutação	Classificação dos "µpan"			
		6626	6501	6701	Coelho
2D9	T3P	2	3	3	2
A4	D8A	2	3	2	3, 3
A10	D8G	2	2	2	2, 2
H9	F12L	2	2	2	3
D1	T14A	2	2	3	3, 3
B6	K19E	ND	1	1	2, 3
C4	K19L	--	ND	ND	1
E3	T20L	2	ND	ND	4
2A1	T20S	3	3	3	3
H1	K33E	3	ND	ND	4
2B2	V37E	3	3	3	3
B11	M42K	3	3	3	3, 4
2D4	M42T	1	2	3	3
A6	M42V	ND	2	2	3, 3
C1	R43G	1	ND	ND	3
A1	R43T	3	2	--	2, 3
2D12	F45L	2	3	2	3
C3	F45S	--	ND	ND	4
A7	L52Q	3	3	3	3, 3
2C3	P54S	1	1	1	3
D11	N56D	--	ND	--	2, 3
B1	N56T	4	3	--	2, 3
B2	L58N	1	ND	ND	3

"Micropans" de fagos contendo um domínio 1 mutante

[illegible]

Exemplo 5: Polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI conjugados com plataformas**Síntese da plataforma tetravalente BA/PIZ/IDA/TEG (BA/PITG)**

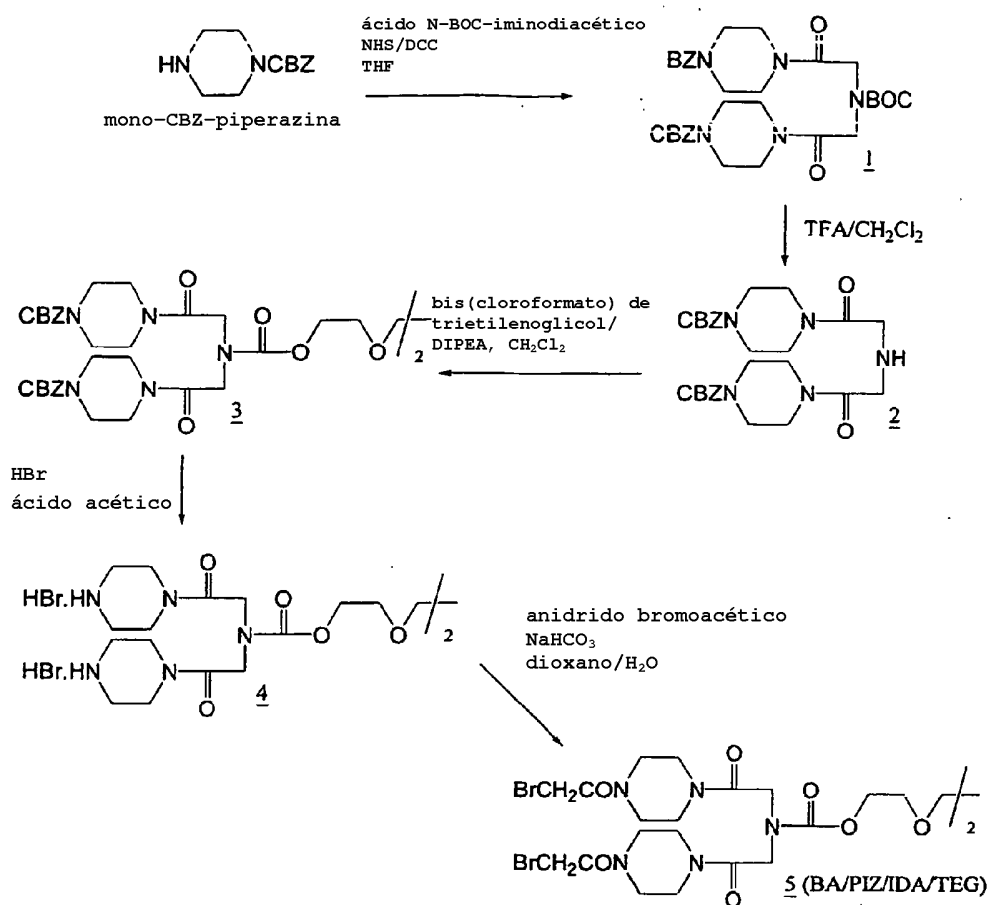
Composto 1: A uma solução de 1,02 g (4,37 mmol) de ácido N-(t-butoxicarbonil)iminodiacético (composto 5 da Patente U.S. 5,552,391, Moléculas de plataforma de valência não poliméricas e quimicamente definidas e seus conjugados) e 1,01 g (8,75 mmol) de N-hidroxissuccinimida em 50 ml de THF seco, arrefecido a 0°C, adicionaram-se 2,26 g (10,94 mmol) de diciclo-hexilcarbodiimida. A mistura foi agitada durante 16 horas, permitindo-se que aquecesse lentamente até à temperatura ambiente, e adicionou-se à mistura uma solução de 2,22 g (10,1 mmol) de mono-CBZ-piperazina em 25 ml de THF, seguida de 1,22 ml (887 mg; 8,75 mmol) de Et₃N. A mistura foi agitada durante 7 horas à temperatura ambiente e filtrada. O filtrado foi concentrado, e o resíduo foi dissolvido em 125 ml de EtOAc, agitado com 2 x 125 ml de HCl 1 N, 125 ml de solução saturada de NaHCO₃, seco (MgSO₄), filtrado e concentrado para fornecer 2,39 g de um sólido pegajoso. A purificação por cromatografia em gel de sílica (95/5 CH₂Cl₂/MeOH) originou 1,85 g (66%) de 1.

Composto 2: A uma solução de 1,74 g (2,74 mmol) de composto 1 em 10 ml de CH₂Cl₂ adicionaram-se 10 ml de ácido trifluoroacético, e a mistura foi agitada durante 3 horas à temperatura ambiente. A mistura foi concentrada, e o resíduo foi dissolvido em 5 ml de CH₂Cl₂. A mistura foi arrefecida até 0°C e adicionaram-se 100 ml de solução saturada de NaHCO₃. A mistura foi depois extraída com quatro porções de 100 ml de CH₂Cl₂. As camadas de CH₂Cl₂ foram combinadas, secas (MgSO₄), filtradas e concentradas para originar 1,46 g (99%) de 2 sob a forma de um sólido higroscópico pegajoso, que foi utilizado directamente no passo seguinte.

Composto 3: A uma solução de 0,7 g (1,3 mmol) de composto 2 e 226 μ l (168 mg; 1,30 mmol) de diisopropiletilamina, a 0°C, adicionou-se uma solução de 127 μ l de bis(cloroformato) de trietilenoglicol em 4 ml de CH₂Cl₂, e a mistura foi agitada durante 3 horas à temperatura ambiente. A mistura foi submetida a partição entre 80 ml de CH₂Cl₂ e 80 ml de HCl 1 N. A camada de CH₂Cl₂ foi lavada com

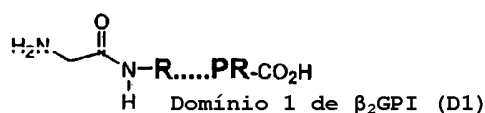
duas porções de 80 ml de água, seca (MgSO_4), filtrada e concentrada para originar 736 mg (93%) de composto 3 sob a forma de um sólido cristalino.

Composto 5: O composto 3 (61 mg; 0,48 mmol) foi dissolvido em 3 ml de HBr a 30%/HOAc, e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora, altura em que se adicionaram 5 ml de Et_2O . A mistura foi colocada no congelador durante 1 hora e centrifugada. O resíduo resultante foi lavado com Et_2O e seco para fornecer o sal tetrabromidrato 4, que foi dissolvido em 1 ml de H_2O . Adicionaram-se à mistura 49 mg (0,58 mmol) de NaHCO_3 e 3 ml de dioxano. Adiciona-se mais NaHCO_3 , se necessário, para tornar a mistura básica. A mistura foi arrefecida até 0°C e adicionaram-se 748 mg (2,89 mmol) de anidrido bromoacético. A mistura foi agitada durante 2 horas e sujeita a partição entre 20 ml de H_2SO_4 1 N e 20 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 80/20. A camada orgânica foi seca (Na_2SO_4), filtrada e concentrada para fornecer o composto 5 bruto, que foi purificado por cromatografia em gel de sílica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) para fornecer 5.

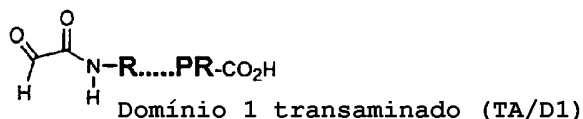
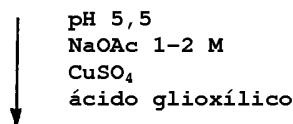


Síntese do conjugado do polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI com a plataforma tetramérica AOA/PITG – composto 44

Transaminação do domínio 1 (TA/D1): A água e o tampão acetato de sódio foram lavados com hélio antes de serem utilizados. O domínio 1 (10,55 mg; 1,49 μ mol) foi dissolvido em 0,5 ml de H_2O , num tubo de polipropileno, e adicionaram-se 4,0 ml de tampão NaOAc 2 M, pH 5,5. Adicionou-se à mistura uma solução de 3,73 mg (14,9 μ mol) de $CuSO_4$ em 0,5 ml de H_2O , seguida de uma solução de 2,75 mg (29,9 μ mol) de ácido glioxílico em 0,5 ml de tampão NaOAc 2 M, pH 5,5. A mistura foi mantida sob atmosfera de azoto e suavemente agitada durante 18 horas, altura em que a reacção pareceu estar completa via HPLC analítica, utilizando uma coluna de bifênolo (Vydac), 300 Å, 5 μ m, de 4,6 mm X 250 mm, com detecção a 280 nm (1 ml/min; gradiente 25%-45% B, 0-20 min, A = TFA a 0,1%/H₂O, B = TFA a 0,1%/CH₃CN). Os tempos de retenção aproximados são como se segue – D: 13,2 min; TA/D1: 13,7 min; TA/D1 oxidado: 13,4 min. A mistura foi diluída para um volume de 20 ml com H_2O , filtrada e purificada por HPLC (coluna de bifênolo, 22,4 mm X 250 mm, 300 Å, 10 μ m (Vydac, Hesperia, CA) (12 ml/min; gradiente 25%-40% B, 0-40 min, A = TFA a 0,1%/H₂O, B = TFA a 0,1%/CH₃CN). As fracções contendo TA/D1 puro, tal como evidenciadas por HPLC analítica, foram combinadas e liofilizadas para proporcionar 5,0 mg (48%) de TA/D1.



**D1 = H₂N-GRTCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG
GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPR-CO₂H (SEQ ID NO: 28)**



**TA/D1 = glioxil-HN-RTPCPKPDDL PFSTVVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG
GMRKFICPLT GLWPINTLKC TPR-CO₂H (SEQ ID NO: 29)**

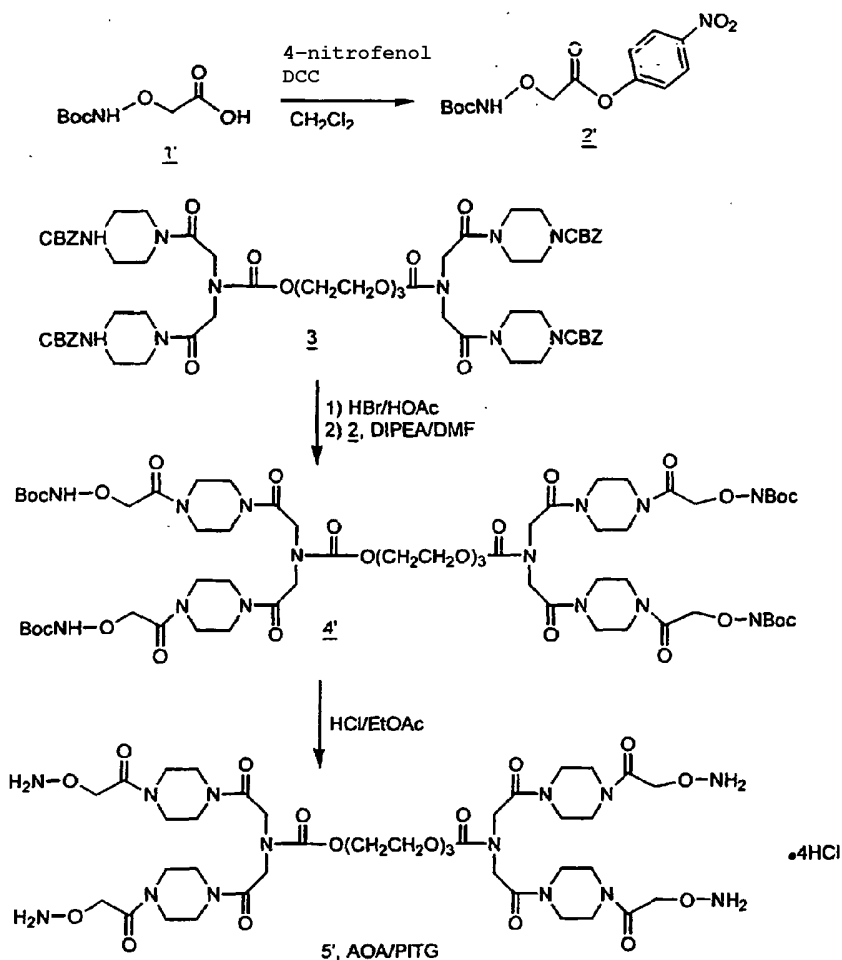
Síntese da plataforma amino-oxiacetilo (AOA)/PITG

4-Nitrofenil-N-(terc-butiloxycarbonil)amino-oxi-acetato, 2': A uma solução agitada de 1,5 g (7,85 mmol) de ácido N-(terc-butiloxycarbonil)amino-oxiacético (Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO), composto 1', em 35 ml de THF anidro, a 0°C, adicionaram-se 1,09 g (7,85 mmol) de 4-nitrofenol, seguidos de 1,62 g (7,85 mmol) de DCC. A mistura foi agitada sob uma atmosfera de azoto durante 0,5 horas a 0°C, e à temperatura ambiente durante 18 horas. A mistura foi filtrada para remover a diciclo-hexilureia, e o filtrado foi concentrado e purificado por cromatografia em gel de sílica (CHCl₃/álcool isopropílico 95/5) para fornecer 2,30 g (94%) de composto 2', sob a forma de um sólido branco. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,51 (s, 9H); 4,73 (s, 2H); 7,36 (d, 2H); 7,73 (s, 1H); 8,32 (d, 2H).

Síntese da plataforma AOA/PITG protegida com BOC, 4': O composto 3 (300 mg; 0,235 mmol) foi tratado com 1,5 ml de uma solução de HBr a 30% em ácido acético, durante 30 minutos. O sal HBr da tetra-amina resultante foi precipitado por adição de éter dietílico. A mistura foi centrifugada, e o sobrenadante foi removido e eliminado. O sólido remanescente foi lavado com éter, seco sob vácuo e dissolvido em 9 ml de DMF. À mistura resultante adicionaram-se 294 µl (1,69 mmol) de diisopropiletilamina, seguidos de uma solução de 410 mg (1,31 mmol) de composto 2 em 3 ml de DMF. A mistura foi agitada sob atmosfera de azoto durante 4 horas e sujeita a partição entre CHCl₃/MeOH 15/1 e salmoura. A camada aquosa foi lavada duas vezes com CHCl₃/MeOH 15/1, e as camadas orgânicas combinadas foram secas (Na₂SO₄) e concentradas para fornecer 680 mg de um óleo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau de 95/5 até 75/25 de CHCl₃/MeOH) originou 215 mg (65%) de composto 4' como um sólido branco. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,49 (s, 36H); 3,40-3,73 (m, 40H); 4,24 (m, 12H); 4,59 (singuletos sobrepostos, 8H); 8,21 (s, 2H); 8,32 (s, 2H).

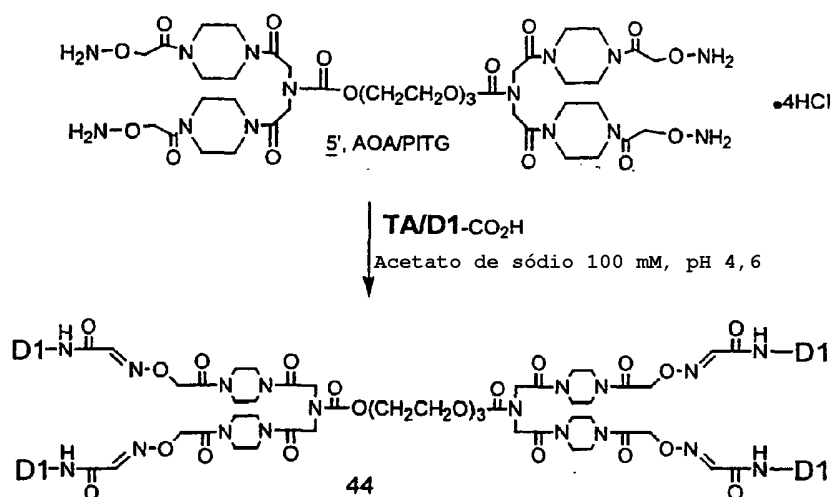
Plataforma AOA/PITG, composto 5': Fez-se borbulhar HCl gasoso através de uma solução agitada de 67 mg (0,047 mmol) de composto 4' em EtOAc/CHCl₃/MeOH 10/1/1 durante 15 minutos, e a mistura foi agitada durante 15 minutos adicionais. A

mistura foi concentrada sob vácuo e mantida sob vácuo durante 16 horas, para fornecer 43 mg (78%) de composto 5' como um sólido branco. ^1H -RMN (DMSO) δ 3,33-3,67 (m, 40H); 4,08 (m, 4H); 4,18 (s, 8H); 4,90 (s, 8H). Espectro de massa (EM) m/z calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{69}\text{N}_{14}\text{O}_{18}$: 1033. Obtido: 1033.



Síntese do conjugado D1 tetraivalente - Composto 44: A espécie TA/D1 (0,90 mg; $1,28 \times 10^{-7}$ mol) foi dissolvida em 250 μl de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,60, num tubo de polipropileno. Adicionaram-se à mistura 16,6 μl (18,9 μg ; $1,60 \times 10^{-8}$ mol) de uma solução 0,97 $\mu\text{mol/ml}$ de plataforma AOA/PITG, composto 5', em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,60. A mistura foi suavemente agitada sob azoto durante 6 dias, altura em que a reacção pareceu estar completa via HPLC analítica, utilizando uma coluna de bifenilo (Vydac), 300 Å, 5 μm , de 4,6 mm X 250 mm, com detecção a 280 nm (1 ml/min; gradiente 25%-45% B, 0-20 min, A = TFA a 0,1%/H₂O,

B = TFA a 0,1%/CH₃CN). Os tempos de retenção aproximados são como se segue - TA/D1: 13,7 min; composto 44: 17,2 min. A mistura foi diluída com água/acetonitrilo 95/5 para um volume de 1 ml e purificada por HPLC (coluna de bifênolo (Vydac), 300 Å, 5 µm, 10 mm X 250 mm) (3 ml/min; gradiente 25%-45% B, 0-40 min, A = TFA a 0,1%/H₂O, B = TFA a 0,1%/CH₃CN). As fracções contendo o conjugado puro, composto 44, tal como evidenciadas por HPLC analítica, foram combinadas e liofilizadas para fornecer 0,4 mg (25%) de composto 44. Espectro de massa (EM, m/z média) calculado para C₁₃₂₀H₂₀₃₂N₃₃₈O₃₇₀S₂₀: 29198; Obtido: 29218.



Síntese do conjugado do polipeptído contendo o domínio 1 de β_2 GPI com a plataforma tetramérica AOTEG/DEA/DEG

2-[2-(2-iodoetoxi)etoxi]etanol, 7: Dissolveu-se 2-[2-(2-cloroetoxi)etoxi]etanol (12,66 g; 75,1 mmol) e iodeto de sódio (33,77 g; 225,3 mmol) em 250 ml de acetona. Acoplou-se um condensador de refluxo ao balão, e a mistura foi aquecida ao refluxo durante 18 horas. Uma vez arrefecida, a mistura foi concentrada, e o resíduo foi agitado juntamente com 400 ml de CH₂Cl₂ e uma mistura de 300 ml de água e 100 ml de solução aquosa saturada de bissulfito de sódio. A camada aquosa foi lavada duas vezes com porções de 400 ml de CH₂Cl₂, e as camadas de CH₂Cl₂ combinadas foram secas (MgSO₄), filtradas e concentradas para proporcionar 18,3 g (94%) do composto 7 sob a forma de um óleo amarelo claro, que foi

utilizado no passo seguinte sem qualquer purificação adicional. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 2,43 (s 1g, 1H); 3,28 (t, 2H); 3,61 (m, 2H); 3,68 (s, 4H); 3,78 (m, 4H); espectro de massa (EM) m/z calculado para $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{INa}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 283,0; Obtido: 283,0.

2-[2-(2-N-(terc-butiloxicarbonil)amino-oxietoxi)etoxi]-etanol, 8: A 5,85 g (1,50 mmol) de 2-[2-(2-iodoetoxi)etoxi]-etanol, composto 7, adicionaram-se 2,00 g (1,00 mmol) de N-(terc-butiloxicarbonil)hidroxiamina (Aldrich Chemical Co.) e 3,36 ml (3,42 g; 1,50 mmol) de DBU. A mistura foi agitada para fornecer um líquido viscoso, que ficou quente ao toque, e foi colocada num banho de óleo a 55°C durante 18 horas, resultando na formação de um precipitado branco que solidificou a mistura. A mistura foi dissolvida em 20 ml de CH_2Cl_2 e adicionada a 500 ml de EtOAc agitado, resultando na formação de um precipitado que foi removido por filtração. O filtrado foi concentrado para fornecer um óleo amarelo acastanhado. A purificação por cromatografia *flash* (acetona a 50%/hexano) proporcionou 2,61 g (67%) de 8 como um óleo. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,50 (s, 9H); 3,65 (t, 2H); 3,70 (s 1g, 4H); 3,76 (m, 4H); 4,06 (t, 2H); 7,83 (s 1g, 1H); ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 28,0; 61,3; 68,9; 70,1; 70,3; 72,5; 72,6; 75,1; 81,2; 157,1.

Brometo de 2-[2-(2-N-(terc-butiloxicarbonil)amino-oxietoxi)etoxi]etilo, composto 9: Adicionou-se bromo (cerca de 0,283 mmol), gota a gota, a uma solução de 50 mg (0,188 mmol) de composto 8, 74 mg (0,283 mmol) de trifetilfosfina e 31 μl (30 mg; 0,377 mmol) de piridina em 2 ml de CH_2Cl_2 , até à obtenção de uma cor laranja persistente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 0,5 horas e adicionou-se 1 ml de uma solução saturada de bissulfito de sódio para neutralizar o excesso de bromo. A mistura foi depois submetida a partição entre 10 ml de H_2O e 2 x 15 ml de EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas (Na_2SO_4), filtradas e concentradas. A purificação do resíduo por cromatografia em gel de sílica (acetona/hexano 35/65) forneceu 54 mg de composto 9 sob a forma de um óleo. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,49 (s, 9H); 3,48 (t, 2H); 3,68 (s, 4H); 3,73 (m, 2H); 3,84 (t, 2H); 4,03 (t, 2H);

7,50 (s, 1H); ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 28,3; 30,4; 69,4; 70,6 (dois sinais); 71,3; 75,5; 81,7; 156,9.

2-[2-(2-N-(terc-butiloxicarbonil) amino-oxietoxi) etoxi]-etilazida, 10:

Síntese a partir do composto 9: Uma solução de 100 mg (0,305 mmol) de composto 9 em 0,25 ml de DMF anidra foi adicionada a uma solução de 159 mg (2,44 mmol) de azida de sódio em 0,5 ml de DMF anidra. Utilizaram-se mais 0,25 ml de DMF para arrastar o composto 9 residual para a mistura reaccional, e a mistura foi aquecida a 115°C durante 3 horas. Uma vez arrefecida, a mistura foi submetida a partição entre 3 ml de H_2O e 4 x 3 ml de CH_2Cl_2 . As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com 10 ml de H_2O , secas (Na_2SO_4), filtradas e concentradas para fornecer um óleo amarelo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (acetona/hexano 35/65) forneceu 67 mg (76%) de 10 sob a forma de um óleo. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,47 (s, 9H); 3,41 (t, 2H); 3,69 (s lg, 4H); 3,73 (m, 4H); 4,03 (t, 2H); 7,50 (s, 1H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 28,1; 50,5; 69,1; 70,1; 70,4 (dois sinais); 75,2; 81,3; 156,7.

Síntese de 10 a partir do composto 13: A uma solução de 258 mg (0,69 mmol) de composto 13 em 5 ml de DMF, sob atmosfera de azoto, adicionaram-se 358 mg (5,50 mmol) de azida de sódio. A mistura foi agitada durante 18 horas à temperatura ambiente, adicionaram-se 100 ml de água, e a mistura foi extraída com 3 x 50 ml de EtOAc. As camadas de EtOAc foram combinadas e lavadas com 50 ml de água, secas (Na_2SO_4), filtradas e concentradas para fornecer 294 mg de um óleo incolor. A purificação por cromatografia em gel de sílica (acetona/hexanos 30/70) originou o composto 10 sob a forma de um óleo incolor.

Composto 11: (MR-508-128) O composto 10 (1,36 g; 4,70 mmol) e trifenilfosfina (1,48 g; 5,64 mmol) foram dissolvidos em 24 ml de THF e 8 ml de H_2O , e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. Adicionaram-se cerca de 160 μl (oito gotas) de NaOH 1 N, e a mistura foi agitada durante 18 horas. A mistura foi concentrada sob vácuo, e o concentrado foi

purificado por cromatografia em gel de sílica ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ concentrado, 80/8/2) para fornecer 1,16 g (94%) de 11 sob a forma de um óleo amarelo. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,50 (s, 9H); 1,90 (br d, 2H); 2,88 (t, 2H); 3,56 (t, 2H); 3,65 (m, 4H); 3,71 (m, 2H); 4,01 (m, 2H).

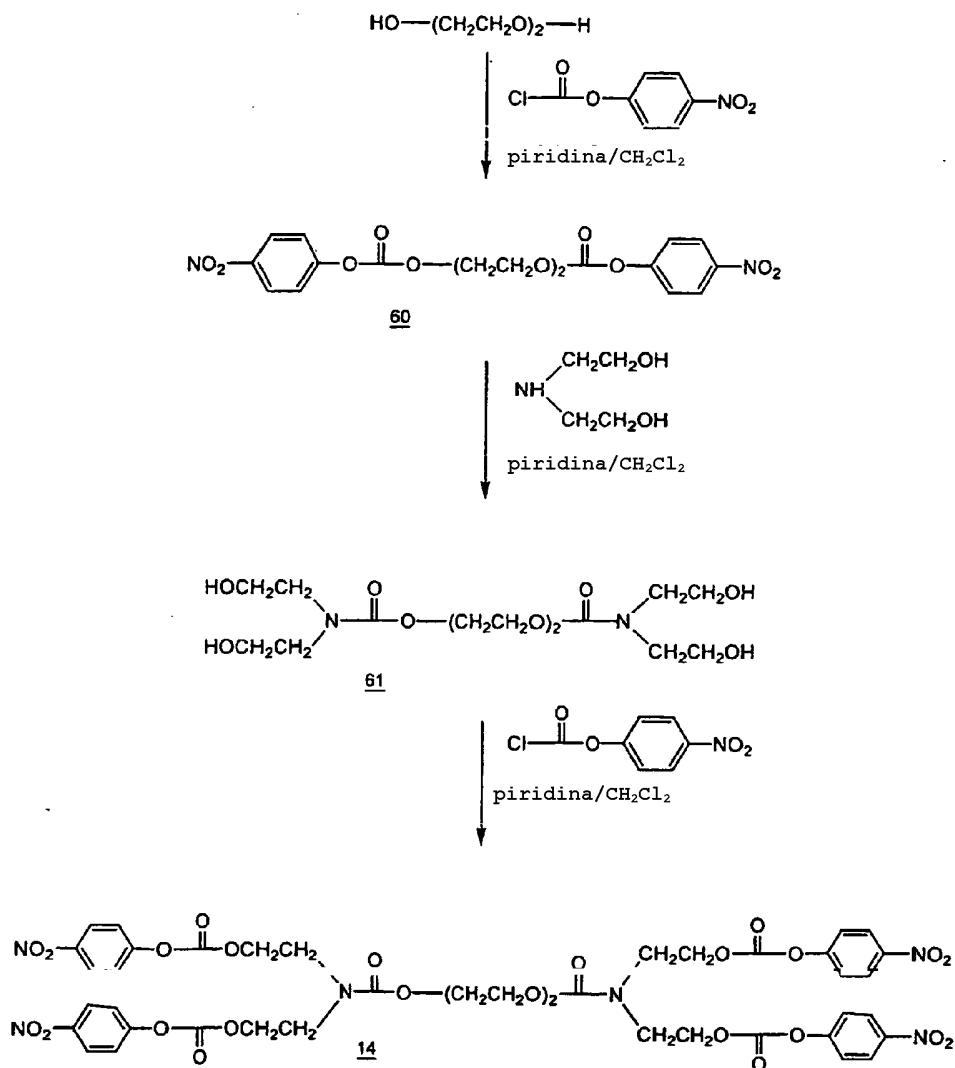
1,2-Bis(2-iodoetoxi)etano, composto 12: Uma solução de 10,0 g (5,3 mmol) de 1,2-bis(2-cloroetoxi)etano (Aldrich Chemical Co.) e 16,0 g (107 mmol) de iodeto de sódio em 110 ml de acetona foi aquecida ao refluxo durante 18 horas. A mistura foi concentrada, e o resíduo foi triturado com CHCl_3 para dissolver o produto, enquanto os sais permaneceram não dissolvidos. A mistura foi filtrada, e o filtrado foi concentrado para fornecer um óleo cor de laranja. A purificação por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau, EtOAc/hexanos 10/90 até EtOAc/hexanos 15/85) originou 17,8 g (90%) de um óleo cor-de-laranja. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 3,28 (t, 4H); 3,67 (s, 4H); 3,78 (t, 4H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 3,6; 70,5; 72,2.

Composto 13: Adicionou-se DBU (284 μl ; 290 mg; 1,90 mol) a uma mistura de 266 mg (2,0 mmol) de N-(terc-butiloxicarbonil)hidroxilamina (Aldrich Chemical Co.) e 2,96 g (8,0 mmol) de composto 12, e a mistura foi tapada e agitada até à homogeneidade. Após 15 minutos, a mistura solidificou e foi deixada em repouso durante 45 minutos. Adicionaram-se 5 ml de CH_2Cl_2 , e a mistura foi novamente agitada para dissolver os sólidos. A solução resultante foi adicionada a 200 ml de EtOAc. Adicionaram-se mais 50 ml de EtOAc, e a mistura foi filtrada para remover os sólidos. O filtrado foi concentrado para fornecer um óleo, que foi sujeito a partição entre 100 ml de EtOAc e 3 x 50 ml de solução de HCl 1 N. A camada de EtOAc foi lavada com 2 x 50 ml de NaOH 1 N, seguidos de 2 x 50 ml de solução de bissulfito de sódio a 5%, e foi concentrada para proporcionar 2,6 g de um óleo amarelo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau, EtOAc/hexanos 20/80 até 45/55) forneceu 515 mg (69%) de composto 13 como um óleo amarelo. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,50 (s, 9H); 3,28 (t, 2H); 3,68 (s, 4H); 3,72 (m, 4H); 4,02 (t, 2H); 7,72 (s, 1H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 2,9; 28,3; 68,9; 69,4; 70,2; 70,6; 72,0; 75,4; 81,6; 156,9.

Bis(4-nitrofenilcarbonato) de dietilenoglicol,
Composto 60: Adicionou-se lentamente piridina (30,5 ml; 377 mmol) a uma solução, a 0°C, de 5,0 g (47,11 mmol) de dietilenoglicol e 23,74 g (118 mmol) de cloroformato de 4-nitrofenilo em 500 ml de THF. Retirou-se o banho de arrefecimento, e a mistura foi agitada durante 18 horas à temperatura ambiente. A mistura foi novamente arrefecida para 0°C, acidificada com HCl 6 N e sujeita a partição entre 400 ml de HCl 1 N e 2 x 400 ml de CH₂Cl₂. As camadas orgânicas combinadas foram secas (MgSO₄), filtradas e concentradas para fornecer 24,3 g de um sólido branco. A cristalização a partir de hexanos/EtOAc originou 16,0 g (78%) do composto 37 sob a forma de um pó branco. P.f. = 110°C. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 3,89 (t, 4H); 4,50 (t, 4H); 7,40 (d, 4H); 8,26 (d, 4H).

Composto 61: Uma solução de 2,5 g (5,73 mmol) de composto 37 em 17 ml de piridina foi adicionada a uma solução a 0°C de 1,8 g (17,2 mmol) de dietanolamina em 3 ml de piridina. Retirou-se o banho de arrefecimento, e a mistura foi agitada durante 5 horas à temperatura ambiente para originar o composto 38, que não foi isolado e foi utilizado tal qual no passo seguinte.

Composto 14: A mistura do passo anterior foi novamente arrefecida para 0°C, adicionaram-se 40 ml de CH₂Cl₂ seguidos de uma solução de 11,55 g (57,3 mmol) de cloroformato de 4-nitrofenilo em 60 ml de CH₂Cl₂, e a mistura foi agitada durante 20 horas à temperatura ambiente. A mistura foi novamente arrefecida para 0°C, acidificada com HCl 1 N e sujeita a partição entre 300 ml de HCl 1 N e 2 x 200 ml de CH₂Cl₂. As camadas orgânicas combinadas foram secas (MgSO₄), filtradas e concentradas para fornecer 13,6 g de um sólido amarelo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (CH₂Cl₂/MeOH e EtOAc/hexanos) proporcionou 4,91 g (83%) do composto 39 sob a forma de um sólido amorfo pegajoso. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 3,72 (m, 12H); 4,31 (t, 4H); 4,48 (m, 8H); 7,40 (m, 8H); 8,29 (m, 8H).



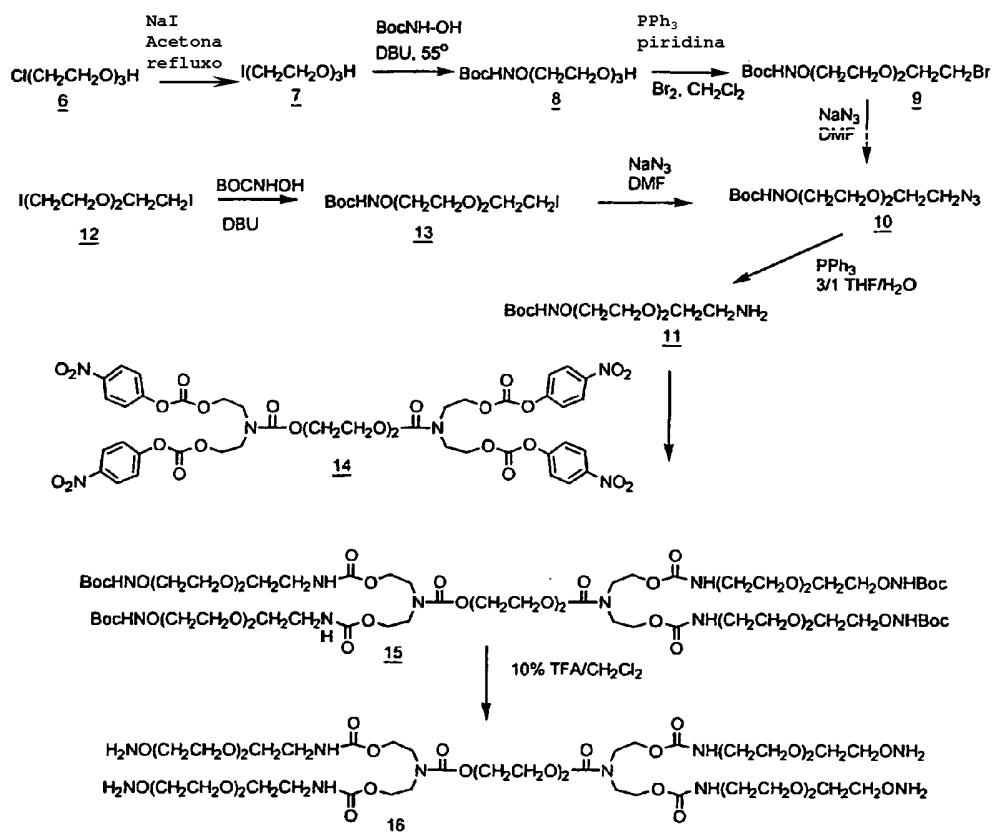
Plataforma AOTEG/DEA/DEG protegida com BOC, Composto 15:

Adicionou-se trietilamina (157 μl ; 114 mg; 1,13 mmol) a uma solução agitada de 193 mg (0,188 mmol) de composto 14 (preparado da forma descrita acima e na Patente U.S. com o n.º de série 60/111,641, apresentada em 9 de Dezembro de 1998), seguido de 298 mg (1,13 mmol) de composto 11. Permitiu-se que a mistura atingisse a temperatura ambiente e agitou-se durante a noite. A mistura foi arrefecida até 0°C, acidificada com HCl 1 N e submetida a partição entre 20 ml de HCl 1 N e 4 x 20 ml de CH_2Cl_2 . As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaHCO_3 , secas (MgSO_4), filtradas e concentradas para fornecer 279 mg de óleo amarelo. A purificação por cromatografia em gel de sílica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97/3) forneceu 138 mg (48%) de composto

15 como um óleo. ^1H -RMN(CDCl_3) δ 1,49 (s, 36H); 3,35 (m, 8H); 3,46-3,78 (m, 44H); 4,04 (t, 8H); 4,21 (m, 12H); 5,80 (m, 4H); 7,91 (s, 4H). Espectro de massa (EM) m/z calculado para $\text{C}_{62}\text{H}_{117}\text{N}_{10}\text{O}_{33}$ $(\text{M}+\text{H})^+$: 1528,8. Obtido: 1528,5.

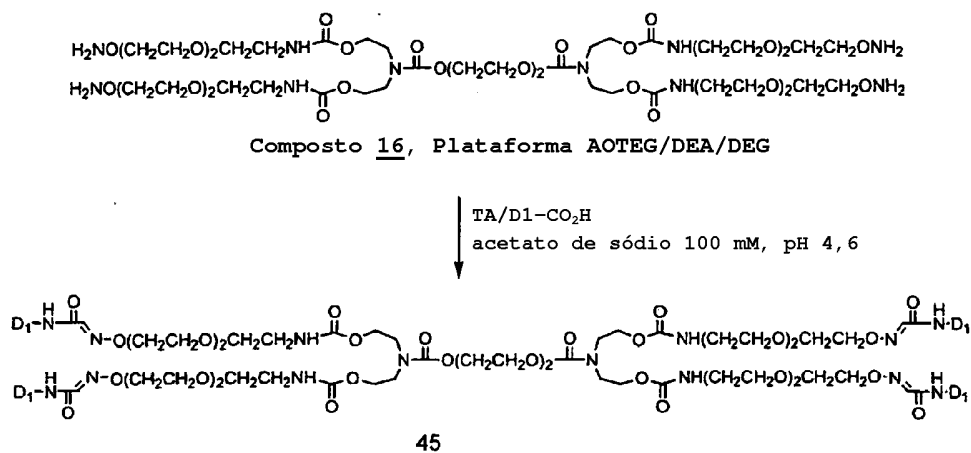
Composto 16: O composto 15 (60 mg; 39,2 μmol) foi dissolvido em 10 ml de ácido trifluoroacético/ CH_2Cl_2 1/9, e a mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 3 horas. Utilizou-se uma corrente suave de azoto para evaporar o solvente, e o resíduo foi dissolvido numa quantidade mínima de solvente de cromatografia (NH_4OH conc./ $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 5/7,5/87,5), que foi utilizada para carregar a mistura numa coluna de gel de sílica. A purificação por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau, NH_4OH conc./ $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 5/7,5/87,5 até 5/10/85) forneceu 36 mg (82%) de 16 sob a forma de um óleo incolor. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 3,37 (m, 8H); 3,58 (m, 16H); 3,67 (s, 16H); 3,71 (m, 12H); 3,86 (m, 8H); 4,17-4,29 (m, 12H); 4,93 (br d, 8H); 5,91 (m, 4H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 40,9; 47,7; 48,2; 62,9; 64,7; 69,4; 69,6; 70,2; 70,3; 70,5; 74,8; 156,1; 156,6. Espectro de massa (EM) m/z calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{N}_{10}\text{O}_{25}$ $(\text{M}+\text{H})$: 1129. Obtido: 1129.

Com o objectivo de verificar a pureza por HPLC analítica, a tetracetona-oxima foi preparada da forma que se segue. O composto 16 (0,38 mg; 0,34 μmol) foi dissolvido em 240 μl de tampão NaOAc 0,1 M, num frasco de amostra para HPLC. Adicionaram-se 10 μl de uma solução de 49 μl de acetona em 2,0 ml de tampão NaOAc 0,1 M. Deixou-se a mistura repousar durante 1 hora e analisou-se uma alíquota por HPLC (coluna C_{18} de 4,6 mm, 1 ml/min, detecção a 210 nm, gradiente, 10-60% B ao longo de 20 min, A = TFA a 0,1%/H₂O, B = TFA a 0,1%/CH₃CN, t_R = 19 min); Espectro de massa do eluente recolhido (EM) m/z calculado para $\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{N}_{10}\text{O}_{25}$ $(\text{M}+\text{H})$: 1289. Obtido: 1289.



Síntese do conjugado D1 tetravalente, Composto 45: A espécie TA/D1 (5,20 mg; $7,37 \times 10^{-7}$ mol) foi dissolvida em 2,0 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,60, aspergido com He, num tubo de polipropileno. Adicionaram-se à mistura 15,07 μl (139 μg ; $1,23 \times 10^{-7}$ mol) de uma solução 8,147 $\mu\text{mol/ml}$ da plataforma AOTEG/DEA/DEG, composto **16**, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,60. A mistura foi suavemente agitada sob azoto durante 23 horas, altura em que a reacção pareceu estar completa via HPLC analítica, utilizando uma coluna de bifênilo (Vydac), 300 Å, 5 μm , 4,6 mm X 250 mm, com detecção a 280 nm (1 ml/min; gradiente 25%-45% B, 0-20 min, A = TFA a 0,1%/H₂O, B = TFA a 0,1%/CH₃CN). Os tempos de retenção aproximados são os seguintes: TA/D1, 13,7 min; composto conjugado 45, 17,2 min. A mistura foi diluída com água para um volume de 5 ml e purificada por HPLC (coluna de bifênilo (Vydac), 300 Å, 5 μm , 10 mm X 250 mm) (3 ml/min; gradiente 25%-45% B, 0-40 min, A = TFA a 0,1%/H₂O, B = TFA a 0,1%/CH₃CN). As fracções contendo o composto conjugado 45 puro, tal como evidenciado por HPLC analítica, foram combinadas e liofilizadas para fornecer 1,73 mg (48%) de composto conjugado 45. Espectro de

massa (EM, m/z média) calculado para $C_{1322}H_{2048}N_{334}O_{377}S_{20}$:
29.294. Obtido: 29.294.



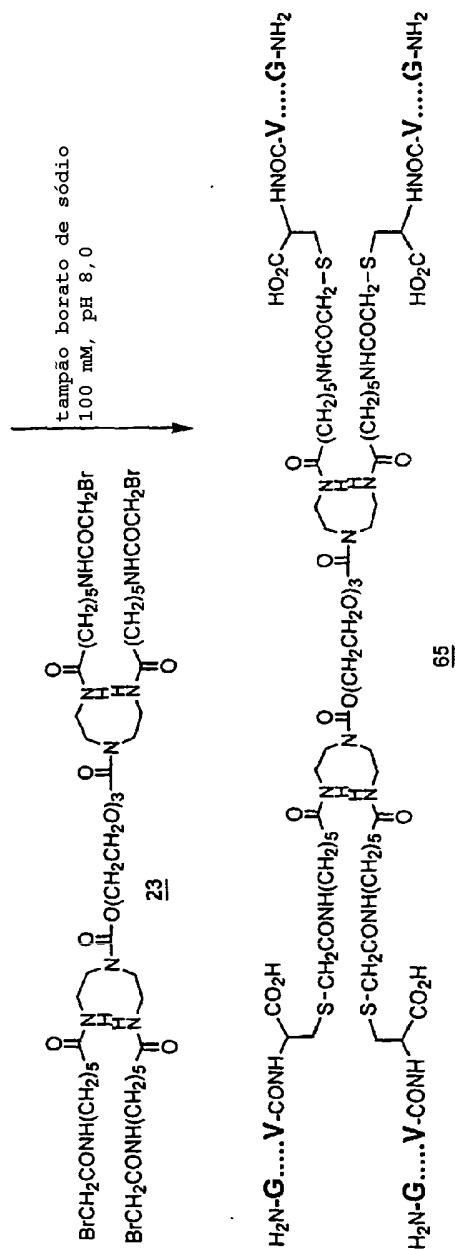
Preparação do conjugado D1 tetravalente via alquilação da quinta Cys com uma plataforma de halogeneto de alquilo,
Composto 65: O domínio 1 possui quatro cisteínas que estão na forma oxidada, e o domínio 1 correctamente enrolado possui duas ligações dissulfureto. É possível incluir uma quinta cisteína em qualquer posição da extremidade N-terminal ou C-terminal, fora das cisteínas nativas. Neste exemplo, é incluída uma quinta cisteína que é nativa do segundo domínio de β_2 GPI. Devido ao seu grupo sulfidrilo livre, é possível utilizar uma quinta cisteína para reagir com uma plataforma concebida para reagir com grupos sulfidrilo. Uma destas plataformas é uma plataforma de haloacetilo, como seja o composto 23.

O domínio D1 contendo a quinta Cys (quatro equivalentes) é dissolvido em tampão borato de sódio 100 mM, pH 8,0, aspergido com hélio. A solução é mantida sob atmosfera de azoto e adiciona-se uma solução da plataforma bromoacetilada, composto 23 (um equivalente). A mistura é agitada até a reacção estar completa, e a purificação da mistura por HPLC preparativa proporciona o conjugado tetravalente, composto 65.



Domínio 1 de β_2 GPI contendo quinta Cys (HS/D1)

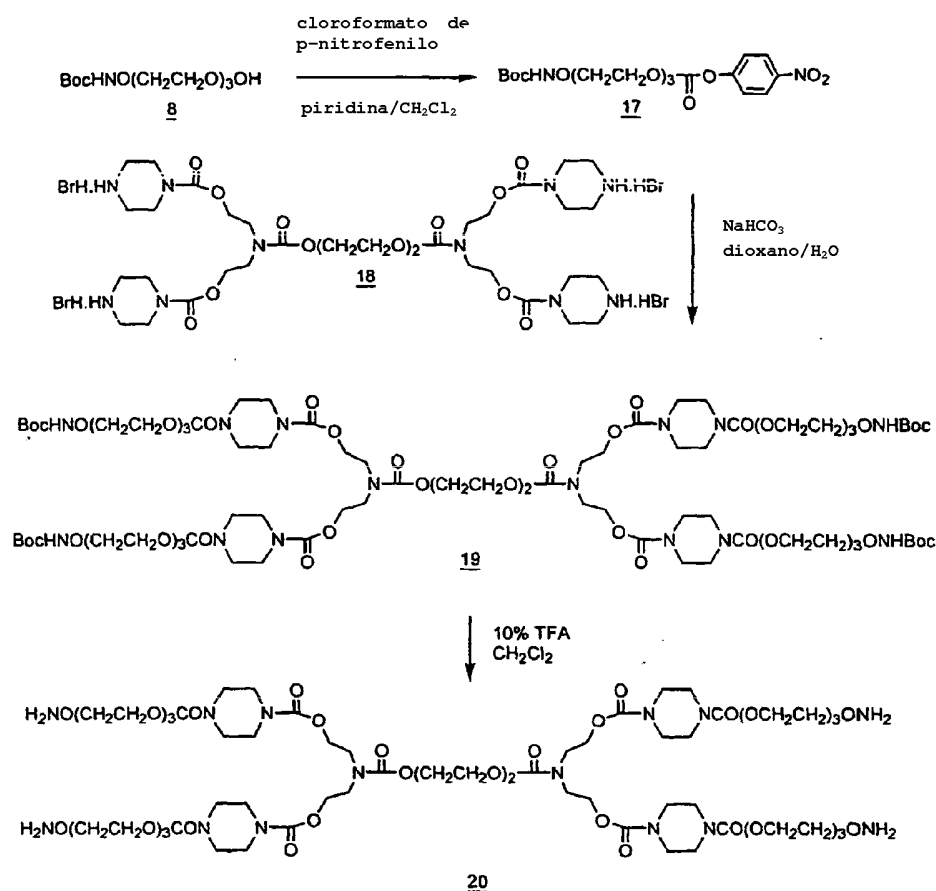
HS/D1 = D1 contendo quinta Cys = $\text{H}_2\text{N-GRTCPKPDLL PFSTVPLKT FYEPGEEITY SCKPGYVSRG}$
GMIRKFICPLT GLWPINTLKC TPRVC_(SH)-CO₂H (SEQ ID NO:30)



Síntese da plataforma AOTEG/PIZ/DEA/DEG, Composto 17:
Adicionou-se lentamente piridina (610 µl; 596 mg; 7,54 mmol) a uma solução agitada de 500 mg (1,88 mmol) de composto 8 e 760 mg (3,77 mmol) de cloroformato de p-nitrofenilo em 14 ml de CH₂Cl₂, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 18 horas. A mistura foi arrefecida até 0°C e acidificada com HCl aquoso 1 N. A mistura resultante foi submetida a partição entre 100 ml de HCl aquoso 1 N e 3 x 100 ml de CH₂Cl₂. As camadas orgânicas combinadas foram secas (MgSO₄), filtradas e concentradas para fornecer 1,05 g de um sólido pegajoso. A purificação por cromatografia em gel de sílica (hexanos/EtOAc 6/4) forneceu 505 mg (62%) de composto 17 sob a forma de um óleo ligeiramente amarelo. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,47 (s, 9H); 3,67-3,78 (m, 6H); 3,80 (m, 2H); 4,02 (m, 2H); 4,48 (m, 2H); 7,40 (d, 2H); 7,50 (s, 1H); 8,29 (d, 2H). Espectro de massa (EM) m/z calculado para C₁₈H₂₆N₂O₁₀Na (M+Na): 453,1. Obtido: 453,0.

Plataforma AOTEG/PIZ/DEA/DEG protegida com BOC, composto 19: A uma solução de composto 18 (preparado da forma descrita na Patente U.S. com o n.º de série 60/111,641, apresentada em 9 de Dezembro de 1998) numa mistura de bicarbonato de sódio aquoso e dioxano, adiciona-se uma solução de quatro equivalentes de composto 17 em dioxano. Após a reacção terminar, a mistura é sujeita a partição entre água e CH₂Cl₂. A camada de CH₂Cl₂ é concentrada, seca e purificada por cromatografia em gel de sílica para fornecer o composto 19.

Plataforma AOTEG/PIZ/DEA/DEG, composto 20: Os grupos protectores BOC são removidos do composto 19 de uma forma essencialmente semelhante aquela descrita para a preparação do composto 16, para proporcionar o composto 20.

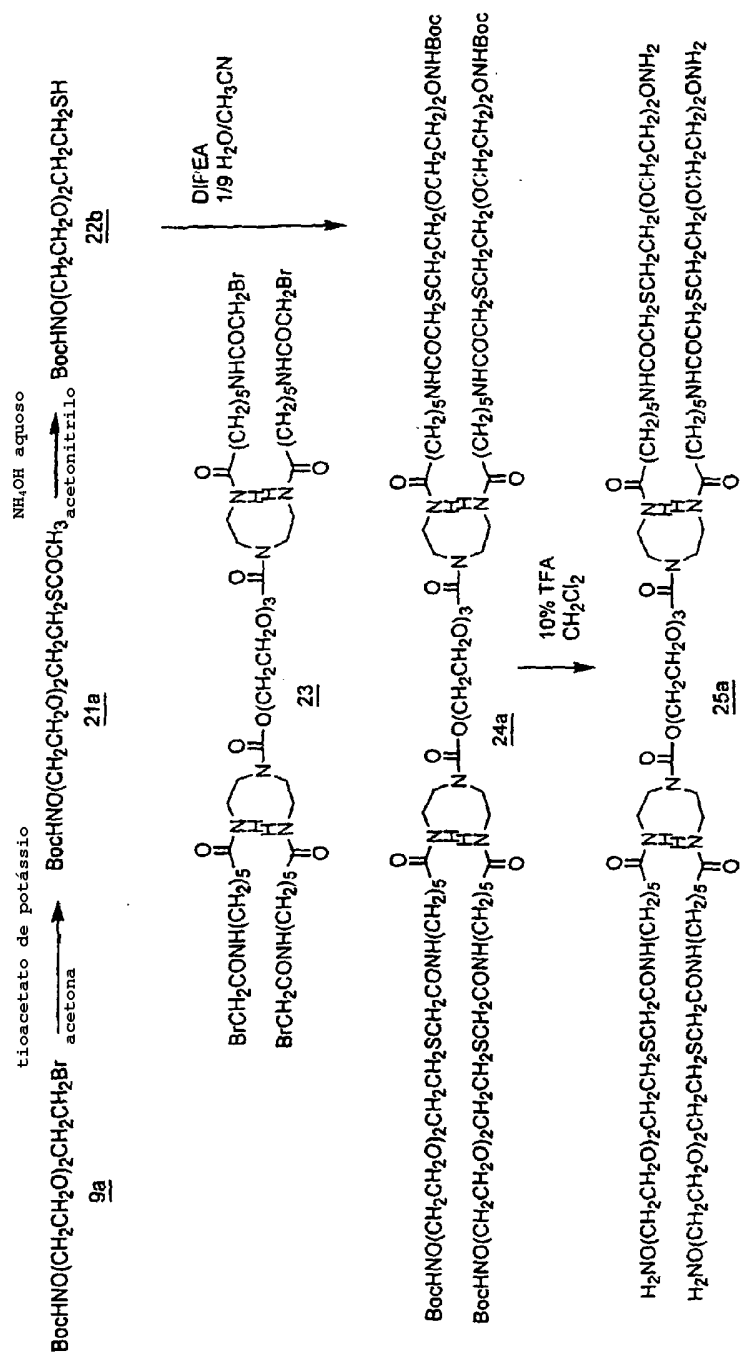


Síntese da plataforma AOTEG/SA/AHAB/TEG, S-acetil-2-[2-(2-N-terc-butiloxicarbonilamino-oxietiloxi)etoxi]etil-mercaptano, Composto 21a: A uma solução de 500 mg (1,52 mmol) de composto 9a em 30 ml de acetona adicionaram-se 191 mg (1,68 mmol) de tioacetato de potássio (Aldrich Chemical Co.). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 18 horas, e o precipitado resultante foi removido por filtração. O filtrado foi concentrado e sujeito a partição entre 300 ml de EtOAc e 2 x 80 ml de salmoura. A camada de EtOAc foi seca (NaSO_4), filtrada e concentrada para fornecer 460 mg (93%) de composto 21a, sob a forma de um óleo castanho claro. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,48 (s, 9H); 2,35 (s, 3H); 3,12 (t, 2H); 3,61 (t, 2H); 3,64 (m, 4H); 3,73 (m, 2H); 4,02 (m, 2H); 5,52 (s, 1H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 28,3; 28,8; 30,6; 69,3; 69,8; 70,2; 70,5; 75,3; 81,5; 156,8; 195,3.

2-[2-(2-N-terc-butiloxicarbonilamino-oxietiloxi)etoxi]-etilmercaptano, Composto 22a: O composto 21a é tratado com uma solução aspergida com azoto de NH_4OH 6N/ CH_3CN 4/1, numa atmosfera de azoto, durante 1 hora à temperatura ambiente. A mistura é concentrada sob vácuo para fornecer o composto 22a, que pode ser utilizado sem qualquer purificação adicional.

Plataforma AOTEG/SA/AHAB/TEG protegida com BOC, 24a: O composto 23 (preparado da forma descrita; Jones *et al.* J. Med. Chem. 1995, 38, 2138-2144) é adicionado a uma solução de quatro equivalentes de composto 22a em $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 10/90 aspergida com azoto. Adicionam-se quatro equivalentes de diisopropiletilamina à solução resultante. Após a reacção terminar, a mistura é submetida a partição entre água e CH_2Cl_2 . A camada de CH_2Cl_2 é concentrada, seca e purificada por cromatografia em gel de sílica para fornecer o composto 24a.

Plataforma AOTEG/SA/AHAB/TEG, 25a: Os grupos protectores BOC são removidos do composto 24a de uma forma essencialmente semelhante aquela descrita para a preparação do composto 16, para proporcionar o composto 25a.



Síntese da plataforma AOHEX/SA/AHAB/TEG, 1-iodo-6-(N-terc-butiloxicarbonil)amino-oxi-hexano, composto 9b: A uma mistura heterogênea de 140 mg (1,05 mmol) de N-(terc-butiloxicarbonil)hidroxilamina (Aldrich Chemical Co.) e 658 µl (1,35 mg; 4,0 mmol) de composto 12 adicionaram-se 149 µl (152 mg; 1,0 mmol) de DBU. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 segundos, altura em que a mistura reaccional solidificou. Deixou-se a massa sólida em repouso durante a noite e dissolveu-se em 50 ml de CH₂Cl₂. A solução foi lavada com 2 x 25 ml de NaOH 1 N e 3 x 25 ml de HCl 1 N. As camadas aquosas básicas combinadas foram extraídas com 25 ml de CH₂Cl₂, e as camadas aquosas ácidas combinadas foram extraídas com 25 ml de CH₂Cl₂. As camadas de CH₂Cl₂ combinadas foram secas (Na₂SO₄), filtradas e concentradas para fornecer um óleo amarelo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau; EtOAc/hexanos/MeOH 1/99/0,1 até 15/85/0,1) forneceu 216 mg (68%) de 9b sob a forma de um óleo amarelo. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,40 (m, 4H); 1,48 (s, 9H); 1,62 (m, 2H); 1,83 (m, 2H); 3,20 (t, 2H); 3,84 (t, 2H); 7,10 (s, 1H).

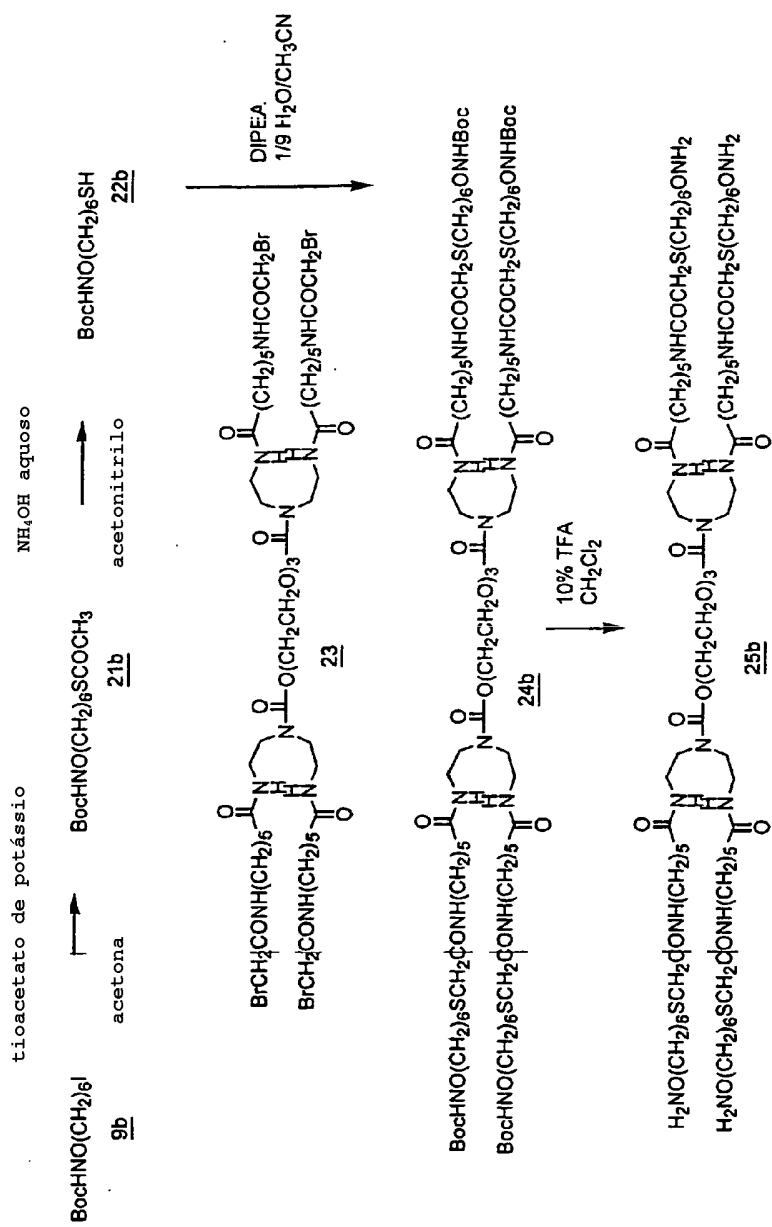
S-acetil-6-(N-terc-butiloxicarbonil)amino-oxi-hexan-1-tiol, Composto 21b: O composto 9b (209 mg; 0,61 mmol) foi adicionado a uma solução de tioacetato de potássio em 15 ml de acetona, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 18 horas. A acetona foi removida sob vácuo, e o resíduo foi sujeito a partição entre 50 ml de CH₂Cl₂ e 3 x 25 ml de NaOH 1 N. A camada de CH₂Cl₂ foi seca (Na₂SO₄), filtrada e concentrada para fornecer um óleo castanho. A purificação por cromatografia em gel de sílica (EtOAc/hexanos 15/85) forneceu 166 mg (94%) de composto 21b sob a forma de um óleo incolor. ¹H-RMN (CDCl₃) δ 1,39 (m, 4H); 1,48 (s, 9H); 1,59 (m, 4H); 2,32 (s, 3H); 2,86 (t, 2H); 3,82 (t, 2H); 7,10 (s, 1H).

6-(N-terc-butiloxicarbonil)amino-oxi-hexan-1-tiol, Composto 22b: Uma amostra purificada de 22b foi preparada da forma que se segue. O composto 21b (50 mg; 172 µmol) e 22 µl (17,4 mg; 85,8 µmol) de tri-n-butilfosfina foram colocados sob azoto, e adicionaram-se 2 ml de uma solução de NaOH 1 M em MeOH aspergida com azoto. A mistura foi agitada durante 18 horas à temperatura ambiente e adicionaram-se 172 µl

(180 mg; 3 mmol) de ácido trifluoroacético. A mistura foi sujeita a partição entre 25 ml de EtOAc e 3 x 25 ml de HCl 1 N. As camadas aquosas combinadas foram extraídas com 25 ml de EtOAc, secas (Na_2SO_4), filtradas e concentradas para fornecer um óleo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (EtOAc/ hexanos/MeOH 15/85/0,1) forneceu 28 mg de 22b sob a forma de um óleo incolor. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,32 (t, 1H); 1,40 (m, 4H); 1,49 (s, 9H); 1,62 (m, 4H); 2,53 (d de t, 2H); 3,84 (t, 2H); 7,09 (s, 1H).

Plataforma AOHEX/SA/AHAB/TEG protegida com BOC, 24b: O composto 21b (13 mg; 45 μmol) e 6 μl (4,5 mg; 22,3 μmol) de tri-n-butilfosfina foram colocados sob azoto e adicionaram-se à mistura 3 ml de uma solução de NH_4OH 6 N/ CH_3CN 4/1 aspergida com azoto. A mistura foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente e concentrada sob vácuo. O resíduo foi dissolvido em 3 ml de uma solução de água/ CH_3CN 10/90 aspergida com azoto. À solução resultante, que foi mantida sob atmosfera de azoto, adicionaram-se 10 mg (7,44 μmol) de composto 23, seguidos de 8 μl (5,77 mg; 44,6 μmol) de diisopropiletilamina. A mistura foi agitada durante 18 horas e concentrada sob vácuo. O resíduo foi purificado por cromatografia em gel de sílica (gradiente em múltiplos degraus, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1/99 até 5/95 até 7,5/92,5 até 10/90 até 15/85) para fornecer 14 mg (93%) de 24b sob a forma de um óleo incolor. CCF ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 10/90) R_f = 0,3; espectro de massa (EM) m/z calculado para $\text{C}_{92}\text{H}_{173}\text{N}_{14}\text{O}_{26}\text{S}_4$ (M+H): 2018. Obtido: 2018.

Plataforma AOHEX/SA/AHAB/TEG, 25b: Os grupos protectores BOC são removidos do composto 24b de uma forma essencialmente semelhante aquela descrita para a preparação do composto 16.



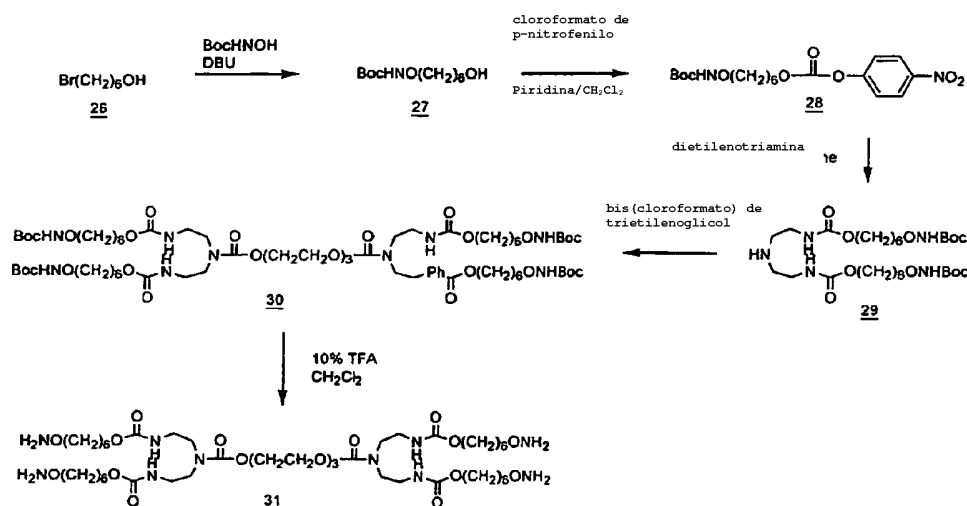
Síntese da plataforma AOHOC/DT/TEG, 6-(terc-butiloxi-carbonilamino-oxi)hexan-1-ol, 27: A uma solução de 179 μ l (183 mg; 1,2 mmol) de DBU em 1 ml de CH_2Cl_2 adicionaram-se 133 mg (1,0 mmol) de N-(terc-butiloxicarbonil)hidroxilamina (Aldrich Chemical Co.) e 157 μ l (217 mg; 1,2 mmol) de 6-bromo-hexan-1-ol (Aldrich Chemical Co.), e a mistura foi agitada durante 18 horas à temperatura ambiente. A mistura foi concentrada para fornecer um óleo amarelo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (EtOAc/MeOH/hexanos 35/5/65) forneceu 180 mg (77%) de composto 27 sob a forma de um óleo incolor. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,39 (m, 4H); 1,48 (s, 9H); 1,59 (m, 4H); 3,63 (t, 2H); 3,85 (t, 2H); 7,42 (s, 1H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 25,6; 25,8; 28,1; 28,4; 62,8; 76,8; 81,7; 157,2.

Composto 28: A uma solução de 100 mg (0,428 mmol) de composto 27 em 2 ml de CH_2Cl_2 , a 0°C , adicionaram-se 90 μ l (88,1 mg; 1,11 mmol) de piridina, seguidos de 113 mg (0,557 mg) de cloroformato de p-nitrofenilo (Aldrich Chemical Co.). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 horas, arrefecida para 0°C , acidificada com HCl 1 N e sujeita a partição entre 20 ml de HCl 1 N e 3 x 20 ml de CH_2Cl_2 . As camadas de CH_2Cl_2 combinadas foram lavadas com uma solução saturada de NaHCO_3 , secas (MgSO_4), filtradas e concentradas. A purificação por cromatografia em gel de sílica forneceu o composto 28.

Composto 29: A uma solução de dietilenotriamina em EtOAc adicionaram-se dois equivalentes de diisopropiletilamina, seguidos de dois equivalentes de composto 28. A mistura foi agitada até a reacção estar terminada. Os solventes foram removidos, e o produto, o composto 29, foi purificado por cromatografia em gel de sílica.

Plataforma AOHOC/DT/TEG protegida com BOC, 30: A uma solução de bis(cloroformato) de trietilenoglicol (Aldrich Chemical Co.) em piridina adicionaram-se dois equivalentes de composto 29. A mistura foi agitada até a reacção estar completa e foi sujeita a partição entre HCl 1 N e CH_2Cl_2 . A camada de CH_2Cl_2 foi seca e concentrada, e o produto foi purificado por cromatografia em gel de sílica para originar o composto 30.

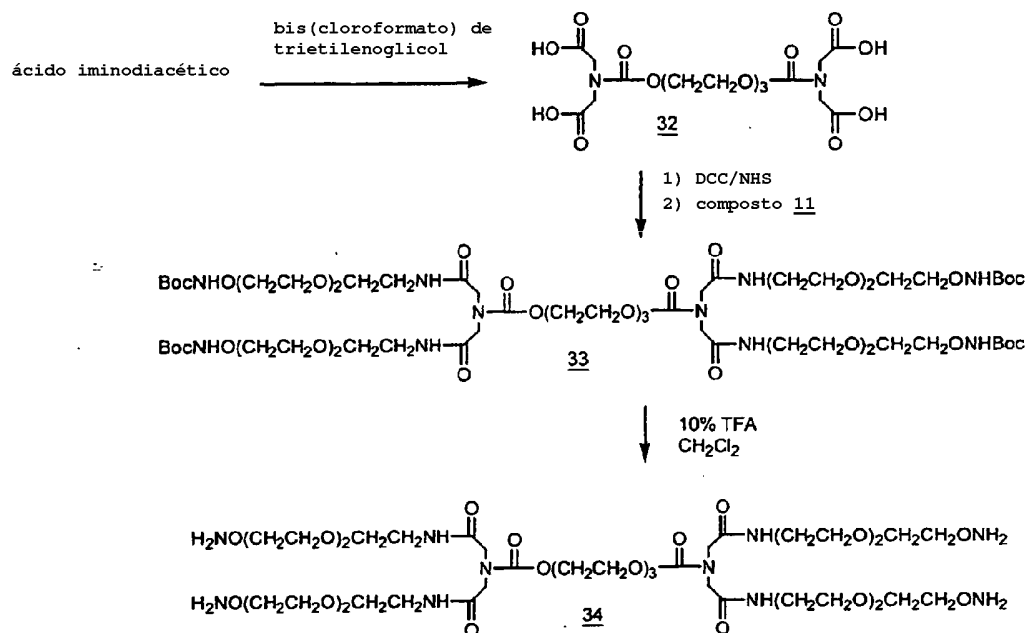
Plataforma AOHOC/DT/TEG, 31: Os grupos protectores BOC foram removidos do composto 30 de uma forma essencialmente semelhante aquela descrita para a preparação do composto 16.



Síntese da plataforma AOTEG/IDA/TEG, Composto 32: A uma solução de bis(chloroformato) de trietilenoglicol (Aldrich Chemical Co.) em piridina adicionaram-se dois equivalentes de ácido iminodiacético (Aldrich Chemical Co.). A mistura foi agitada até a reacção estar completa e foi sujeita a partição entre HCl 1 N e CH_2Cl_2 . A camada de CH_2Cl_2 foi seca e concentrada, e o produto foi purificado por cromatografia em gel de sílica para originar o composto 32.

Composto 33: Uma solução de composto 32 em THF foi tratada com 6 equivalentes de NHS e 6 equivalentes de DCC durante 1 hora. Adicionaram-se à mistura 4 equivalentes de composto 11, e a mistura foi agitada até a reacção estar completa. Adicionou-se ácido acético para neutralizar a DCC em excesso, e os sólidos resultantes foram removidos por filtração. O filtrado foi concentrado e purificado por cromatografia em gel de sílica para fornecer o composto 33.

Composto 34: Os grupos protectores BOC foram removidos do composto 33 de uma forma essencialmente semelhante aquela descrita para a preparação do composto 16.



Síntese de AOTEGO/LEV/PITG

Plataforma, levulinato de p-nitrofenilo, 35: A uma solução de 800 mg (6,89 mmol) de ácido levulínico (Aldrich Chemical Co.) em 4,25 ml de piridina adicionaram-se 1,78 g (7,58 mmol) de trifluoroacetato de 4-nitrofenilo (Aldrich Chemical Co.). A solução resultante foi agitada durante 15 minutos e sujeita a partição entre 28 ml de água e 2 x 28 ml de CH_2Cl_2 . As camadas de CH_2Cl_2 combinadas foram secas (MgSO_4), filtradas e concentradas. A purificação do concentrado por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau, EtOAc/hexanos 25/75 até 30/70) forneceu 1,06 g (74%) de composto 35. $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ 2,28 (s, 3H); 2,87 (m, 4H); 7,29 (d, 2H); 8,28 (d, 2H).

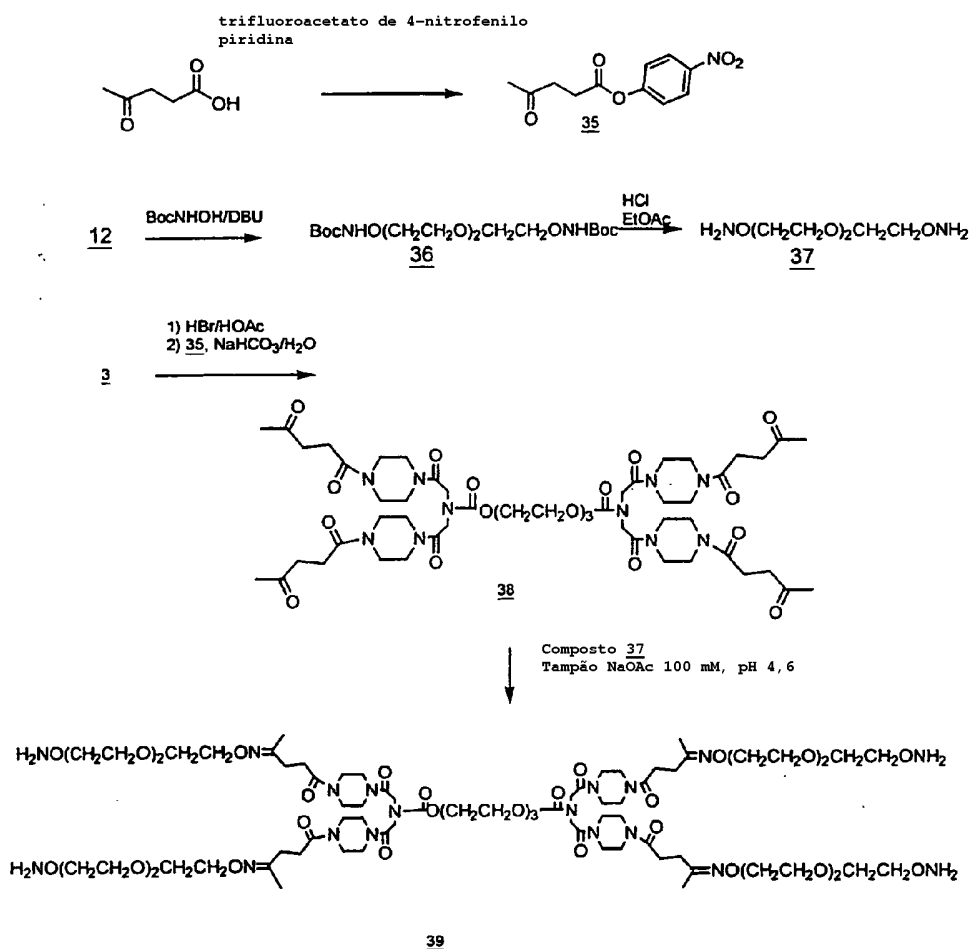
1,2-Bis(2-(terc-butiloxycarbonil)amino-oxietoxi)etano, composto 36: A 243 mg (0,66 mmol) de composto 12 adicionaram-se 219 mg (1,64 mmol) de N-(terc-butiloxycarbonil)-hidroxilamina (Aldrich Chemical Co.), seguidos de 246 μl (250 mg; 1,64 mmol) de DBU. A mistura foi agitada à temperatura ambiente até solidificar (cerca de 1 hora). Após repouso durante mais uma hora, a mistura foi dissolvida em 2 ml de CH_2Cl_2 , e a solução resultante foi adicionada a 100 ml de EtOAc para precipitar o sal HI de

DBU. Adicionaram-se mais 50 ml de EtOAc, e a mistura foi filtrada. O filtrado foi lavado com 2 x 50 ml de HCl 1 N, 2 x 50 ml de solução de bissulfito de sódio a 5% e 25 ml de salmoura. A camada de EtOAc foi seca (Na_2SO_4), filtrada e concentrada para fornecer um óleo. A purificação por cromatografia em gel de sílica (gradiente em degrau, EtOAc/hexanos 40/60 até 50/50 até 80/20) forneceu 164 mg (65%) de composto 36 sob a forma de um óleo incolor. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 1,48 (s, 18H); 3,65 (s, 4H); 3,72 (t, 4H); 4,02 (t, 4H); 7,80 (s, 2H). ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ 28,2; 69,0; 70,3; 75,2; 81,3; 156,8.

1,2-Bis(2-amino-oxietoxi)etano, composto 37: O composto 36 (559 mg; 1,47 mmol) foi dissolvido em 15 ml de EtOAc e fez-se borbulhar HCl gasoso através da solução durante 30 minutos. A mistura foi concentrada sob vácuo para fornecer 72 mg (90%) de composto 37 como sal HCl, sob a forma de um resíduo pegajoso. ^1H -RMN (D_2O) δ 3,75 (s, 4H); 3,87 (m, 4H); 4,27 (m, 4H). Espectro de massa (EM) m/z calculado para $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$ (M+H): 181,1. Obtido: 181,1.

Composto 38: O composto 3 foi tratado com uma solução de HBr a 30% em ácido acético para remover os grupos protectores CBZ e fornecer um sal HBr da tetra-amina. A tetra-amina foi dissolvida numa solução de bicarbonato de sódio em água e dioxano, e adicionaram-se à solução resultante quatro equivalentes de composto 35. Uma vez a reacção terminada, a mistura foi sujeita a partição entre água e CH_2Cl_2 . A camada de CH_2Cl_2 foi concentrada, seca e purificada por cromatografia em gel de sílica para fornecer o composto 38.

Plataforma AOTEGO/LEV/PITG, composto 39: A uma solução de composto 38 em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6, adicionaram-se vinte equivalentes de composto 37. Uma vez a reacção terminada, a mistura foi sujeita a partição entre água e CH_2Cl_2 . A camada de CH_2Cl_2 foi concentrada, seca e purificada por cromatografia em gel de sílica para fornecer o composto 39.

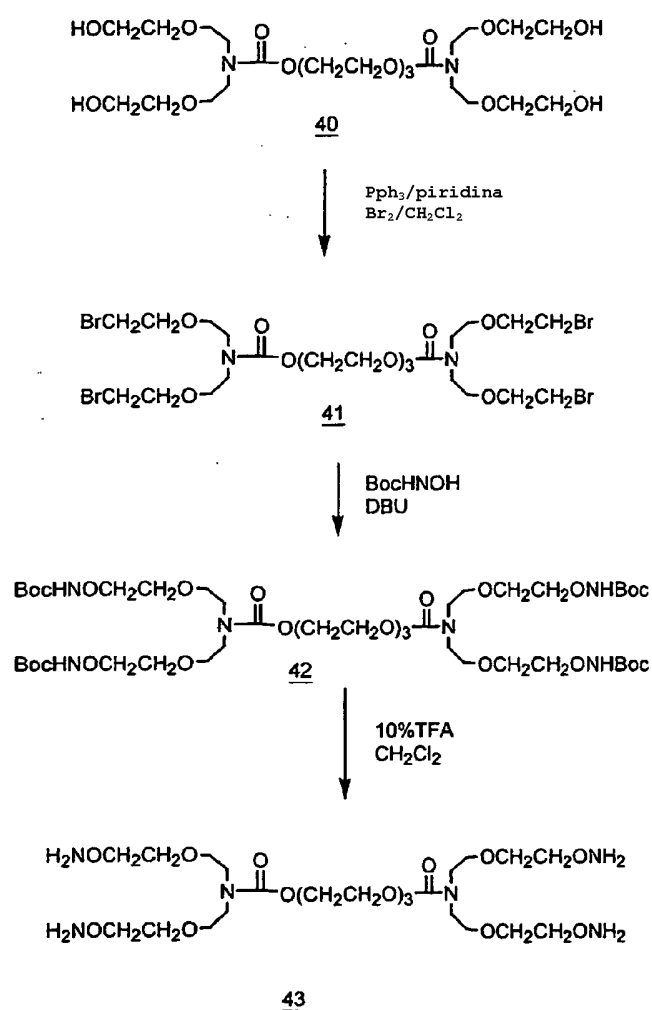


Síntese da plataforma AO/DEGA/DEG, Composto 41:
Adiciona-se, gota a gota, bromo (aproximadamente seis equivalentes) a uma solução de composto 40, seis equivalentes de trifenilfosfina e 8 equivalentes de piridina em CH_2Cl_2 , até à obtenção de uma cor laranja persistente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 0,5 horas ou até a reacção estar terminada, e adicionou-se uma solução saturada de bissulfito de sódio para destruir o bromo em excesso. A mistura foi depois submetida a partição entre H_2O e EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secas (Na_2SO_4), filtradas, concentradas e purificadas por cromatografia em gel de sílica para fornecer o composto 41.

Composto 42: Ao composto 41 adicionaram-se seis equivalentes de N-(terc-butiloxicarbonil)hidroxilamina (Aldrich Chemical Co.) e seis equivalentes de DBU. A mistura foi aquecida durante o tempo necessário para a reacção ser

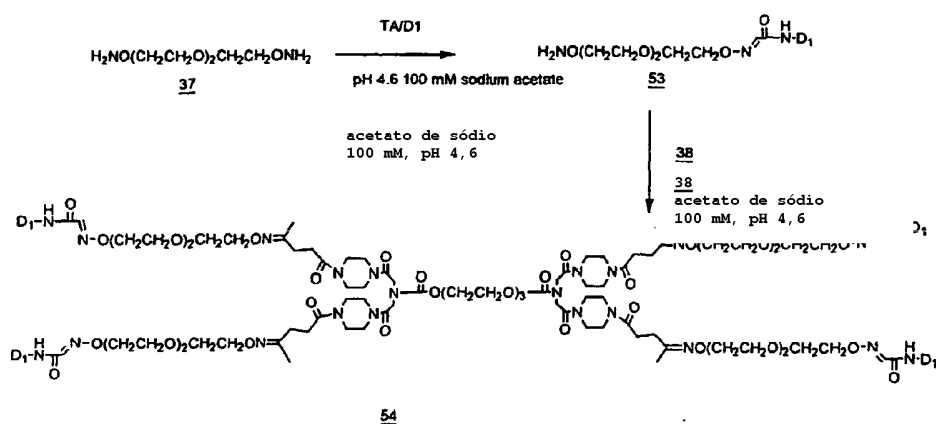
concluída. Uma vez arrefecida, a mistura foi dissolvida em CH_2Cl_2 . A solução resultante foi adicionada a EtOAc, resultando na formação de um precipitado que foi removido por filtração, sendo o filtrado concentrado. A purificação por cromatografia *flash* forneceu 8.

Composto 43: Os grupos protectores BOC foram removidos do composto 42 de uma forma essencialmente semelhante aquela descrita para a preparação do composto 16.

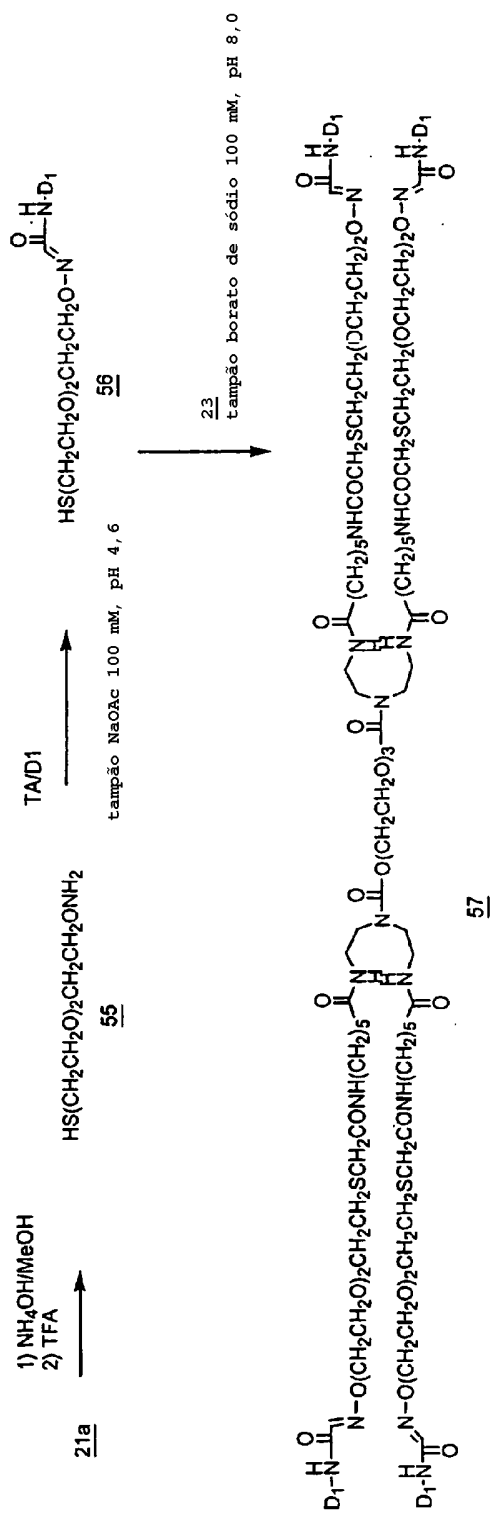


Método alternativo de preparação de um conjugado tetravalente, utilizando o composto 37 como um adaptador bifuncional: Como alternativa à reacção directa de um domínio 1 transaminado do polipéptido β_2 GPI com uma

plataforma amino-oxi tetravalente, o domínio 1 transaminado pode reagir com um excesso de composto 37 em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,6, para fornecer o composto 53, no qual um adaptador amino-oxi está ligado ao domínio 1 do polipéptido β_2 GPI através de uma ligação oxima. O composto 53 é separado do adaptador em excesso, e fazem-se reagir quatro equivalentes de composto 53 com a plataforma 38, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,6, para formar um segundo conjunto de ligações oxima, proporcionando um conjugado tetravalente, composto 54.



Método alternativo de preparação de um conjugado tetravalente, utilizando o composto 21a como precursor de um adaptador bifuncional: O tratamento do composto 21a com hidróxido de amónio, para remover o grupo protector acetil- enxofre, e depois com ácido trifluoroacético, para remover o grupo protector BOC, origina o adaptador 55. Efectua-se a reacção de um polipéptido contendo glioxilo, neste caso TA/D1, com o composto 55 para fornecer o composto 56 - o domínio 1 do polipéptido β_2 GPI com um adaptador sulfidrido ligado via uma ligação oxima. Quatro equivalentes de composto 56 podem reagir com a plataforma 23 para proporcionar um conjugado tetravalente do domínio 1 do polipéptido β_2 GPI, composto 57.



Exemplo 6: Propriedades de ligação do conjugado tetramérico de polipeptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI, composto 44

A ligação do conjugado tetramérico, composto 44, a dois anticorpos humanos anti- β_2 GPI, purificados por afinidade, foi analisada utilizando ressonância plasmónica de superfície.

Materiais e métodos para as determinações de Kd do conjugado tetramérico, composto 44

Reagentes. Os *chips* CM5 e os tampões NHS, EDC e HBS-EP foram obtidos de BIAcore. A IgG humana, normal e combinada (Zymed) foi imobilizada numa célula de fluxo separada, no *chip*, e utilizada como controlo negativo. Os anticorpos específicos para o domínio 1 de β_2 -GPI, purificados por afinidade, de 2 doentes (6701 e 6626) foram imobilizados em células de fluxo separadas.

Ressonância plasmónica de superfície. Todas as experiências foram efectuadas utilizando um instrumento BIAcore™ 2000 a 25°C, com um caudal de 10 μ l/minuto. O equilíbrio dos *chips* e os estudos de ligação foram efectuados com tampão HBS-EP desgaseificado, que consiste em HEPES 0,01 M pH 7,4; NaCl 0,15 M; EDTA 3mM e tensioactivo P20 a 0,005% (v/v). O acoplamento covalente dos ligandos proteicos, através dos seus grupos amino livres, ao *chip* CM5 foi obtido fazendo fluir 40 μ l de NHS 0,05M/EDC 0,2M sobre o *chip* para activá-lo, seguido de exposição ao ligando proteico apropriado. Os anticorpos purificados por afinidade e a IgG normal foram imobilizados fazendo fluir 100 μ l de uma solução 100 μ g/ml em acetato 10 mM (pH 4,8) sobre o *chip* CM5 activado com NHS. Os grupos reactivos em excesso na superfície do *chip* são depois bloqueados com 40 μ l de etanolamina 1 M (pH 8,5).

Titulações. O domínio 1 de β_2 -GPI expresso em baculovírus e o composto 44 tetramérico foram diluídos com HBS-EP, forçados a fluir sobre o *chip*, e os valores de resposta foram recolhidos durante 780 segundos. Os *chips* foram regenerados entre as exposições às amostras com 80 μ l de glicina-HCl 0,1 M (pH 2,1); NaCl 0,1 M. Foi efectuada uma série de cinco titulações para cada amostra. Uma vez que a

abordagem ao equilíbrio da ligação encontrava-se incompleta durante o período de medição, o valor da ligação no equilíbrio (R_{eq}) foi determinado adaptando as curvas de associação à equação seguinte, utilizando o *software* do fabricante (BiaEvaluation versão 2.2, Uppsala, Suécia) :

$$R_t = R_{eq}(1 - e^{-k_s(t-t_0)}) + R_0$$

em que R_t é a resposta BIAcore medida no tempo t , R_{eq} é a resposta de patamar no equilíbrio, t é o tempo, t_0 é o tempo inicial, k_s é uma constante de associação aparente ($k_s = k_a C + k_{dis}$, em que k_a é a constante de associação, C é a concentração do analito e k_{dis} é a constante de dissociação) e R_0 é um desvio da resposta (algoritmo de Marquart-Levenberg).

A cada curva de associação/titulação foi-lhe subtraído o valor do fundo da célula de controlo negativo (IgG normal) para essa titulação. Os valores de R_{eq} calculados foram representados em função da concentração, utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 2.01. Os resultados são ajustados para uma ligação a um sítio (hipérbole rectangular: $Y = B_{max} * X / [K_d + X]$) e os valores de K_d são calculados em unidades molares. As concentrações molares do domínio 1 e do composto 44 foram determinadas através da absorvância a 280 nm e um coeficiente de extinção de 1,85.

Resultados e discussão

Os anticorpos purificados por afinidade dos doentes 6701 e 6626 foram imobilizados em câmaras microfluídicas separadas e expostos a concentrações variáveis do domínio 1 de β_2 GPI humano ou de composto 44. O valor da ligação no equilíbrio foi determinado para cada concentração e representado graficamente, para se determinar a constante de dissociação aparente no equilíbrio. As isotérmicas de ligação são apresentadas nas Figuras 10 e 11 (coeficiente de extinção = 1,85; anticorpo imobilizado 100 μ g/ml), e as constantes de dissociação estão indicadas na Tabela 8.

Estas experiências demonstram que os anticorpos antifosfolípidos purificados por afinidade se ligam ao domínio 1 de β_2 GPI. Além disso, elas demonstram que os conjugados tetraméricos de um polipéptido contendo o

domínio 1 de β_2 GPI ligado a uma plataforma também são capazes de se ligarem a estes anticorpos, com afinidades que são equivalentes ou superiores à concentração molar de domínio 1 presente no tetrâmero.

Tabela 8: Constantes de dissociação aparentes no equilíbrio para a ligação do domínio 1 e do composto 44 a anticorpos antifosfolípidos purificados por afinidade

<i>Doente</i>	<i>Domínio 1</i>	<i>Composto 44</i>
6626	333 \pm 18 nM	66 \pm 23 nM
6701	417 \pm 36 nM	24 \pm 9

Exemplo 7: Análise de conjugados de polipéptidos contendo o domínio 1 de β_2 GPI quanto a ligação competitiva de anticorpos *in vitro*

Microplacas Nunc Maxisorp (Nalge Nunc International, Dinamarca) foram revestidas com 100 μ l/poço de β_2 GPI numa concentração de 2,5 μ g/ml em PBS, incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente e bloqueadas durante 2 horas, à temperatura ambiente, com 250 μ l/poço de leite magro a 2% contendo 0,4% de Tween-80 (Sigma Chemical Co.). Após cinco lavagens com TBS, adicionaram-se a cada poço 100 μ l de uma solução preparada menos de uma hora antes e concebida para distribuir, por poço, uma diluição final de 1:200 de plasma do doente 6501 e quantidades variáveis de conjugados tetraméricos do domínio 1, composto 44 e composto 45, ou de monómeros de domínio 1 de controlo, todos em leite magro a 2% contendo 0,4% de Tween-80. Após incubação durante uma hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5x com TBS. Adicionaram-se a cada poço 100 μ l de anticorpo anti-IgG humana conjugado com fosfatase alcalina, específico para a cadeia gama (Zymed), diluído de 1:1000 em leite magro a 2% contendo 0,4% de Tween-80. Após uma hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5x com TBS. Adicionaram-se a cada poço 100 μ l de solução do substrato cromogénico PPMP para desenvolvimento da cor à temperatura ambiente. A absorvância óptica por poço foi determinada a A_{550nm} num leitor de microplacas comercial (Bio-Tek Instruments EL311). Os resultados apresentados na Figura 12 indicam que

ambos os compostos 44 e 45 competem efectivamente pelo anticorpo antifosfolípido presente no soro (doente 6501). O domínio 1 reduzido e alquilado não apresenta qualquer competição deste tipo e é um controlo negativo. Uma ligação competitiva também é apresentada pelo domínio 1 monomérico regular e encontra-se incluída como controlo positivo.

Exemplo 8: Modelo de ratinho imunizado para testar conjugados de polipéptidos contendo o domínio 1 de β 2GPI

Os requisitos de um modelo imunizado para testar a tolerância a polipéptidos contendo o domínio 1 de β 2GPI são: (1) a imunização tem que produzir anticorpos que reconhecem o domínio 1 e (2) a imunização não pode produzir células T que reconheçam o domínio 1. A imunização com o conjugado de polipéptidos contendo o domínio 1-KLH produz células T que reconhecem KLH, mas não uma reactividade detectável perante o domínio 1. Com este intuito, preparámos, no sistema de células de insecto, um polipéptido contendo o domínio 1 de β 2GPI que contém uma quinta cisteína na extremidade carboxilo (aminoácido 1 ao aminoácido 66 da SEQ ID NO:1). Esta molécula foi ligada covalentemente a KLH através da quinta cisteína. Este conjugado foi utilizado para imunizar ratinhos. A imunização com o conjugado de domínio 1-KLH produz células T que reconhecem KLH, mas não uma reactividade detectável perante o domínio 1. Por outro lado, a imunização com o conjugado de domínio 1-KLH resulta efectivamente na produção de anticorpos específicos para o domínio 1.

Materiais e métodos

Ensaio ELISA para detectar um anticorpo anti-domínio 1

Os poços de placas de microtitulação NUNC foram revestidos com 50 μ l de β 2GPI numa concentração de 5 μ g/ml em bicarbonato 0,1 M (pH 9,5), durante a noite. Os poços foram lavados com PBS e depois foram bloqueados durante uma hora com leite magro em pó a 2% (LMP). Os poços foram lavados, adicionou-se 50 μ l de diluições em série, em LMP a 2%, de soro de ratinho individual, incubou-se à temperatura ambiente durante uma hora, lavou-se, adicionou-se 50 μ l de anticorpo anti-IgG de ratinho conjugado com fosfatase

alcalina, incubou-se durante uma hora à temperatura ambiente, lavou-se e adicionou-se 50 µl de substrato. A DO a 550 nm foi lida após 30 minutos. Preparou-se um conjunto de soros dos ratinhos que haviam sido sensibilizados de forma activa com 50 µg do conjugado. Este conjunto foi testado em todos os ensaios, e os resultados são expressos em percentagem deste conjunto padrão.

Ensaio ELISA de inibição competitiva

As placas de microtitulação NUNC foram revestidas com 50 µl de β2GPI recombinante, numa concentração de 5 µg/ml em bicarbonato 0,1 M, pH 9,5, incubadas durante a noite a 4°C, lavadas três vezes com PBS 0,15 M (pH 7,2) e bloqueadas durante uma hora à temperatura ambiente com 75 µl de leite magro em pó a 2% em PBS (LMP a 2%). Os inibidores de teste foram diluídos em LMP a 2%, e adicionaram-se 25 µl de cada diluição ou de LMP sozinho aos poços revestidos. O anticorpo monoclonal foi diluído em LMP a 2% e adicionaram-se 25 µl de uma concentração constante aos poços. O conteúdo dos poços foi misturado, e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante uma hora. Após as placas terem sido lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de anticorpo anti-IgG de ratinho conjugado com fosfatase alcalina, específico para a cadeia gama, diluído de forma apropriada em LMP a 2%, e incubou-se a 37°C durante uma hora. Após as placas terem sido lavadas três vezes com PBS, adicionaram-se 50 µl de substrato cromogénico da fosfatase alcalina, e as placas foram incubadas durante 30 minutos a 20°C. A A_{550} foi medida num leitor automático de placas de microtitulação. A inibição percentual foi determinada da seguinte forma: $[(A_{550} \text{ média obtida a partir dos poços de controlo sem inibidor menos } A_{550} \text{ do fundo}) - (A_{550} \text{ obtida em presença de inibidor menos } A_{550} \text{ do fundo})] / (A_{550} \text{ média obtida a partir dos poços de controlo sem inibidor menos } A_{550} \text{ do fundo})] \text{ vezes } 100$.

Modelo de ratinho imunizado dirigido para anticorpos anti-domínio 1

Grupos de 5 ratinhos C57Bl/6 foram sensibilizados de forma activa com 10, 50 ou 100 µg do conjugado de KLH-domínio 1 adsorvido em alúmen, mais 2×10^9 organismos da tosse convulsa como adjuvante. Três semanas mais tarde, todos os ratinhos receberam um reforço com 10 µg do

conjugado em solução salina. Sete dias após o reforço, os ratinhos foram sangrados, e o soro foi colhido e testado quanto a actividade anti-domínio 1. Os resultados estão apresentados na Figura 14. A imunização com o conjugado de domínio 1-KLH não produziu uma resposta de anticorpos específicos para o domínio 1.

Imunização de ratinhos e ensaio de proliferação das células T

Os ratinhos C57Bl/6 foram injectados na almofada da pata traseira com 25 µg de conjugado de domínio 1 (D1)-KLH emulsionado em adjuvante completo de Freund (ACF). Outro grupo de ratinhos foi injectado na almofada da pata traseira com ACF emulsionado (sem antigénio). Sete dias mais tarde, os nódulos linfáticos poplíteos foram colhidos de 5 ratinhos de cada grupos. Os nódulos provenientes de imunizações semelhantes foram combinados e prepararam-se suspensões de célula única. As células foram cultivadas da forma descrita acima para as células humanas, tirando o facto dos antigénios de teste serem D1-KLH, KLH e o domínio 1 (não conjugados). Utilizou-se PPD como controlo positivo. No dia 4, adicionaram-se 25 µl de ³H-timidina contendo 1 µCi a cada poço. No dia 5, o conteúdo dos poços foi recolhido, e a quantidade de radioactividade em cada um deles foi determinada. Calculou-se um índice de estimulação (IE) para cada poço, dividindo as CPM do poço pelas CPM médias dos controlos negativos. Determinou-se o IE médio (e o desvio padrão) para cada um dos duplicados.

Resultados e discussão

A especificidade do anticorpo policlonal de ratinho anti-conjugado KLH-domínio 1 foi determinada através de um ensaio ELISA de inibição competitiva. Várias formas recombinantes de β_2 GPI foram misturadas com quantidades limitantes de anticorpo, em poços que haviam sido revestidos com β_2 GPI. A quantidade de anticorpo que permaneceu ligada aos poços foi depois detectada com um segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina. A inibição percentual foi determinada da forma descrita na secção dos métodos e representada graficamente em função da concentração µmolar do inibidor. Os resultados estão apresentados na Figura 15. A imunização com o mesmo conjugado produz efectivamente uma

resposta de anticorpos que é específica para o domínio 1 (Figura 15).

No que diz respeito à proliferação de células T, os resultados apresentados na Figura 13 demonstram que as células de ratinhos sensibilizados de forma activa com domínio 1-KLH proliferaram em resposta ao conjugado de domínio 1-KLH e a KLH, assim como ao controlo positivo PPD. Elas não responderam ao domínio 1 (não conjugado). Por outro lado, as células de ACF só sensibilizaram ratinhos que não responderam aos antigénios de teste, mas responderam ao controlo positivo PPD.

Para um modelo de ratinho imunizado, nomeadamente, em que a sensibilização activa não pode sensibilizar células T que reconhecem um dado tolerogénio, mas tem que gerar células B de memória que reconhecerão o tolerogénio, ambos os requisitos básicos para um modelo de ratinho imunizado foram alcançados no modelo de ratinho imunizado aqui apresentado.

Exemplo 9: Teste de um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI como tolerogénio *in vivo*

Os ratinhos são sensibilizados de forma activa com um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI conjugado com hemocianina de lapa (KLH) em alúmen, mais organismos da tosse convulsa como adjuvante, tal como descrito acima. Três semanas mais tarde, os ratinhos são tratados com uma gama de doses de tolerogénio, que poderá ou não estar conjugado com uma plataforma. Um grupo não é tratado e actua como grupo de controlo. Cinco dias mais tarde, todos os ratinhos, incluindo o grupo de controlo, são reforçados com 10 μ g de polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI conjugado com KLH e, sete dias mais tarde, os ratinhos são sangrados. Os soros são analisados quanto a anticorpos anti-domínio 1 de β_2 GP2 por qualquer método conhecido, incluindo, por exemplo, um ensaio ELISA como descrito nos exemplos anteriores. Estes valores são depois utilizados para determinar uma média e um desvio padrão para todos os indivíduos de um grupo.

Exemplo 10: Teste da reactividade das células T

O estabelecimento da ausência de reactividade das células T face a um polipéptido contendo o domínio 1 de β_2 GPI indicaria que, como tolerogénio, ele não fornece quaisquer epítomos para um segundo sinal das células T para as células B. Reciprocamente, caso o tolerogénio proporcione um sinal de proliferação (activação) para as células T, é possível que ele exacerbe a resposta das células B.

Para determinar a activação das células T, os linfócitos circulantes são recolhidos e colocados em cultura de tecidos. O(s) polipéptido(s) contendo o domínio 1 de β_2 GPI que se pretende testar são adicionados à cultura durante aproximadamente uma semana. No final da semana, as células T são pulsadas com ^3H -timidina para determinar se existiu proliferação celular. Opcionalmente, a presença de citocinas no sobrenadante da cultura de tecido é também determinada.

Exemplo 11: Os anticorpos anti- β_2 GPI contribuem para a hipercoagulação ao atrasarem a inactivação do factor Va**Métodos**

Os níveis de factor V activado (factor Va) foram determinados no plasma humano normal, após iniciação da coagulação na presença e na ausência de anticorpos purificados por afinidade ou de preparações de IgG total de doentes diagnosticados com síndrome antifosfolipídica (SAF). Os anticorpos purificados por afinidade foram caracterizados como sendo anticorpos anti-domínio 1 de β_2 GPI. A IgG total foi preparada a partir do soro dos doentes da forma descrita abaixo.

A medição dos níveis de factor Va foi determinada num ensaio de coagulação modificado em duas etapas, utilizando um microcoagulómetro Amelung KC4A da forma que se segue. Cinquenta μl de plasma humano deficiente em factor V (Chromogenix) foram pré-incubados durante 1 minuto a 37°C numa microcuvete giratória. As amostras foram diluídas de 1:10 com tampão de Owren (Sigma) pré-aquecido (37°C). Cinquenta μl da amostra diluída foram adicionados aos 50 μl do plasma deficiente em factor V. Adicionaram-se cem μl de ThromboMAX mais cálcio (Sigma) a 37°C para iniciar a

coagulação. O tempo de coagulação foi registado. Uma unidade de actividade de factor Va é definida como sendo o tempo de coagulação do plasma deficiente em factor V com uma diluição de 1:10 em relação ao plasma humano normal de referência (Accuclot, Sigma). Uma unidade de actividade de factor Va neste sistema experimental corresponde a um tempo de coagulação de aproximadamente 30 segundos.

Para determinar a quantidade de factor Va que é produzida ao longo do tempo, na presença ou na ausência de anticorpo antifosfolípido ou de IgG, utilizou-se o sistema que se segue para produzir as amostras testadas no ensaio standard descrito acima. Os seguintes reagentes foram misturados e incubados a 37°C: uma parte de plasma humano normal de referência (Accuclot, Sigma), uma parte de CaCl_2 25 mM e uma parte que consiste em reagente de fosfatidilserina (125 µg/ml), solução salina tamponada com Tris (TBS) e anticorpo ou IgG (se aplicável, na concentração desejada). A TBS foi utilizada para efectuar a correcção devido aos volumes variáveis de anticorpo ou de IgG. O plasma normal, a fosfatidilserina, o anticorpo ou a IgG (se presente) e a TBS foram misturados e incubados a 37°C durante 2 minutos, antes da adição de CaCl_2 a 37°C para iniciar a coagulação. O coágulo foi removido manualmente à medida que se formou. O volume total da mistura da amostra dependeu do número de pontos analisados. Para cada ponto, retiraram-se 12,5 µl da amostra em incubação, diluiu-se de 1:10 em tampão de Owren e analisou-se no ensaio standard para o factor Va descrito acima. Os níveis de factor Va gerados na amostra ao longo do tempo estão reflectidos numa correcção do tempo de coagulação do plasma deficiente em factor V. O pico dos níveis Va ocorre aos 4-5 minutos após o início da coagulação, e os níveis encontram-se no intervalo de 4-7 unidades de actividade de factor Va. Isto corresponde a um tempo de coagulação de aproximadamente 5-6 segundos no ensaio standard para este sistema experimental.

Nos casos em que a IgG de doentes com SAF foi adicionada ao ensaio, a IgG total foi preparada a partir de amostras de soro humano, através da combinação de 100 µl de soro (diluído de 1:1 com tampão de ligação de IgG de Pierce

Immunopure) com 100 µl de esferas de proteína G imobilizadas em agarose (Pierce Immunopure Plus).

A mistura foi agitada lentamente à temperatura ambiente durante 10 minutos. A proteína G liga-se à região F_c de todas as subclasses da imunoglobulina G humana. Após 10 minutos, a mistura foi brevemente centrifugada para depositar as esferas. O sobrenadante da mistura de soros foi eliminado.

As esferas com IgG ligada foram depois lavadas três vezes com 200 µl de tampão de ligação de IgG para remover as proteínas adsorvidas. A IgG ligada foi seguidamente eluída das esferas de proteína G com 3 x 100 µl de tampão de eluição de IgG (Pierce, tampão de eluição de IgG Immunopure). A IgG eluída foi imediatamente neutralizada com 100 µl de NaPO₄ 1M, pH 7,5, para um volume final total de 400 µl da preparação de IgG a partir da amostra de plasma de 100 µl. As preparações de IgG neutralizadas são armazenadas a 4°C até serem analisadas.

A concentração de proteína das preparações de IgG foi determinada pelo método standard de microtitulação de Bradford (reagente Bio-Rad). Analisaram-se cinco µl de cada amostra em triplicado, com uma curva-padrão de albumina sérica bovina em cada placa. As concentrações de proteína foram calculadas pelo *software* KC4.

Para a análise no ensaio de coagulação com factor Va, 100 µl da preparação de IgG foram concentrados para 25 µl com um dispositivo de filtração centrífuga Microcon (Amicon, limite de exclusão de pesos moleculares de 30000). Utilizam-se os 25 µl totais para o ponto único no ensaio do factor Va.

Resultados

O efeito da IgG total de doentes com síndrome antifosfolipídica e de anticorpos purificados por afinidade de controlos normais foi comparado quanto à capacidade para atrasar a inactivação do factor Va, num ensaio de coagulação *in vitro*. Os resultados para a IgG total e para os anticorpos purificados por afinidade estão apresentados na Tabela 9 e na Figura 16, respectivamente. A IgG e os anticorpos purificados por afinidade de sujeitos de controlo

normais não alteraram a inactivação do factor Va observada aos 20 minutos após o início da coagulação. Em contraste, a fracção IgG de doentes com síndrome antifosfolipídica atrasou a inactivação do factor Va ($p < 0,05$ pelo teste t de Student). Observaram-se efeitos semelhantes na inactivação do factor Va para os anticorpos purificados por afinidade. Estes resultados sugerem que os anticorpos anti- β_2 GPI humano podem criar um estado de hipercoagulação, em parte através de um atraso da inactivação do factor Va.

Tabela 9

I.D.	IgG de doentes com SAF		
	Va 20" (Unidades)	IgG (mg)	actividade (Unidades/mg)
7308	0,98	0,08	12,25
7309	0,85	0,06	14,17
7310	0,85	0,06	14,17
7311	0,84	0,07	12,00
7312	0,92	0,06	15,33
7313	0,82	0,06	13,67
7314	1,13	0,06	18,83
7315	0,99	0,07	14,14
7316	0,87	0,06	14,50
7317	0,92	0,08	11,50
7318	0,81	0,08	10,13
7319	0,95	0,10	9,50
7320	0,83	0,05	16,60
7321	0,84	0,07	12,00
7322	0,81	0,06	13,50
7323	0,83	0,09	9,76
7301	0,83	0,05	16,60
7302	0,87	0,05	17,40
7303	1,05	0,08	13,13
7304	1,44	0,07	20,57
7305	0,79	0,08	9,88
7306	0,90	0,07	12,86
7307	1,10	0,07	15,71
6501	1,16	0,06	19,33
6636	1,21	0,05	24,20
6625	0,86	0,10	8,60
6646	0,72	0,05	14,40
6623	1,17	0,07	16,71
6510	0,70	0,05	14,00
média	0,93	0,07	14,33
DP	0,17	0,01	3,55

I.D.	Va 20" (Unidades)	IgG Normal	
		IgG (mg)	actividade (Unidades/mg)
N260F	0,77	0,06	12,83
N712M	0,69	0,07	9,86
N266F	0,78	0,09	8,67
N199F	0,79	0,08	9,88
N280M	0,76	0,07	10,86
média	0,76	0,07	10,42
DP	0,039623	0,011402	1,557503

Embora o invento precedente tenha sido descrito em algum detalhe por meio de ilustrações e de exemplos, com o objectivo de proporcionar uma melhor compreensão, os peritos na arte compreenderão que determinadas alterações e modificações serão realizadas. Assim, a descrição e os exemplos não deverão ser interpretados como uma limitação ao âmbito do invento, que é delineado pelas reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

- <110> M. David Marquis
M. Gilbert Iverson
J. Edward Victoria
S. David Jones
Matthew Linnik
- <120> POLIPÉPTIDOS TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO CONTENDO O
DOMÍNIO 1 DE β_2 GPI E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS
- <130> 252312006900
- <140> não atribuído
- <141> 1999-06-08
- <150> 60/088,656
- <151> 1998-06-09
- <150> 60/103,088
- <151> 1998-10-05
- <160> 30
- <170> FastSEQ for Windows Versão 3.0
- <210> 1
- <211> 978
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)...(978)
- <400> 1.
- | | |
|---|-----|
| gga cgg acc tgt ccc aag cca gat gat tta cca ttt tcc aca gtg gtc | 48 |
| Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser Thr Val Val | |
| 1 5 10 15 | |
| ccg tta aaa aca ttc tat gag cca gga gaa gag att acg tat tcc tgc | 96 |
| Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr Tyr Ser Cys | |
| 20 25 30 | |
| aag ccg ggc tat gtg tcc cga gga ggg atg aga aag ttt atc tgc cct | 144 |
| Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe Ile Cys Pro | |
| 35 40 45 | |
| ctc aca gga ctg tgg ccc atc aac act ctg aaa tgt aca ccc aga gta | 192 |
| Leu Thr Gly Leu Trp Pro Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr Pro Arg Val | |
| 50 55 60 | |
| tgt cct ttt gct gga atc tta gaa aat gga gcc gta cgc tat acg act | 240 |
| Cys Pro Phe Ala Gly Ile Leu Glu Asn Gly Ala Val Arg Tyr Thr Thr | |
| 65 70 75 80 | |
| ttt gaa tat ccc aac acg atc agt ttt tct tgt aac act ggg ttt tat | 288 |

Phe	Glu	Tyr	Pro	Asn	Thr	Ile	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Thr	Gly	Phe	Tyr		
				85					90					95			
ctg	aat	ggc	gct	gat	tct	gcc	aag	tgc	act	gag	gaa	gga	aaa	tgg	agc		336
Leu	Asn	Gly	Ala	Asp	Ser	Ala	Lys	Cys	Thr	Glu	Glu	Gly	Lys	Trp	Ser		
			100					105					110				
ccg	gag	ctt	cct	gtc	tgt	gct	ccc	atc	atc	tgc	cct	cca	cca	tcc	ata		384
Pro	Glu	Leu	Pro	Val	Cys	Ala	Pro	Ile	Ile	Cys	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile		
		115					120					125					
cct	acg	ttt	gca	aca	ctt	cgt	gtt	tat	aag	cca	tca	gct	gga	aac	aat		432
Pro	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg	Val	Tyr	Lys	Pro	Ser	Ala	Gly	Asn	Asn		
		130				135					140						
tcc	ctc	tat	cgg	gac	aca	gca	gtt	ttt	gaa	tgt	ttg	cca	caa	cat	gcg		480
Ser	Leu	Tyr	Arg	Asp	Thr	Ala	Val	Phe	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	His			
145				150					155					160			
atg	ttt	gga	aat	gat	aca	att	acc	tgc	acg	aca	cat	gga	aat	tgg	act		528
Met	Phe	Gly	Asn	Asp	Thr	Ile	Thr	Cys	Thr	Thr	His	Gly	Asn	Trp	Thr		
			165					170					175				
aaa	tta	cca	gaa	tgc	agg	gaa	gta	aaa	tgc	cca	ttc	cca	tca	aga	cca		576
Lys	Leu	Pro	Glu	Cys	Arg	Glu	Val	Lys	Cys	Pro	Phe	Pro	Ser	Arg	Pro		
		180						185				190					
gac	aat	gga	ttt	gtg	aac	tat	cct	gca	aaa	cca	aca	ctt	tat	tac	aag		624
Asp	Asn	Gly	Phe	Val	Asn	Tyr	Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Lys		
		195				200						205					
gat	aaa	gcc	aca	ttt	ggc	tgc	cat	gat	gga	tat	tct	ctg	gat	ggc	ccg		672
Asp	Lys	Ala	Thr	Phe	Gly	Cys	His	Asp	Gly	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Pro		
	210				215						220						
gaa	gaa	ata	gaa	tgt	acc	aaa	ctg	gga	aac	tgg	tct	gcc	atg	cca	agt		720
Glu	Glu	Ile	Glu	Cys	Thr	Lys	Leu	Gly	Asn	Trp	Ser	Ala	Met	Pro	Ser		
225				230				235					240				
tgt	aaa	gca	tct	tgt	aaa	tta	cct	gtg	aaa	aaa	gcc	act	gtg	gtg	tac		768
Cys	Lys	Ala	Ser	Cys	Lys	Leu	Pro	Val	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Val	Tyr		
			245					250					255				
caa	gga	gag	aga	gta	aag	att	cag	gaa	aaa	ttt	aag	aat	gga	atg	cta		816
Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Lys	Ile	Gln	Glu	Lys	Phe	Lys	Asn	Gly	Met	Leu		
		260					265						270				
cat	ggt	gat	aaa	gtt	tct	ttc	ttc	tgc	aaa	aat	aag	gaa	aag	aag	tgt		864
His	Gly	Asp	Lys	Val	Ser	Phe	Phe	Cys	Lys	Asn	Lys	Glu	Lys	Lys	Cys		
		275				280						285					
agc	tat	aca	gag	gat	gct	cag	tgt	ata	gat	ggc	act	atc	gaa	gtc	ccc		912
Ser	Tyr	Thr	Glu	Asp	Ala	Gln	Cys	Ile	Asp	Gly	Thr	Ile	Glu	Val	Pro		
	290				295						300						
aaa	tgc	ttc	aag	gaa	cac	agt	tct	ctg	gct	ttt	tgg	aaa	act	gat	gca		960
Lys	Cys	Phe	Lys	Glu	His	Ser	Ser	Leu	Ala	Phe	Trp	Lys	Thr	Asp	Ala		
305				310				315						320			
tcc	gat	gta	aag	cca	tgc												978
Ser	Asp	Val	Lys	Pro	Cys												
				325													

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser Thr Val Val
 1          5          10          15
Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr Tyr Ser Cys
 20          25          30
Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe Ile Cys Pro
 35          40          45
Leu Thr Gly Leu Trp Pro Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr Pro Arg Val
 50          55          60
Cys Pro Phe Ala Gly Ile Leu Glu Asn Gly Ala Val Arg Tyr Thr Thr
 65          70          75          80
Phe Glu Tyr Pro Asn Thr Ile Ser Phe Ser Cys Asn Thr Gly Phe Tyr
 85          90          95
Leu Asn Gly Ala Asp Ser Ala Lys Cys Thr Glu Glu Gly Lys Trp Ser
100          105          110
Pro Glu Leu Pro Val Cys Ala Pro Ile Ile Cys Pro Pro Pro Ser Ile
115          120          125
Pro Thr Phe Ala Thr Leu Arg Val Tyr Lys Pro Ser Ala Gly Asn Asn
130          135          140
Ser Leu Tyr Arg Asp Thr Ala Val Phe Glu Cys Leu Pro Gln His Ala
145          150          155          160
Met Phe Gly Asn Asp Thr Ile Thr Cys Thr Thr His Gly Asn Trp Thr
165          170          175
Lys Leu Pro Glu Cys Arg Glu Val Lys Cys Pro Phe Pro Ser Arg Pro
180          185          190
Asp Asn Gly Phe Val Asn Tyr Pro Ala Lys Pro Thr Leu Tyr Tyr Lys
195          200          205
Asp Lys Ala Thr Phe Gly Cys His Asp Gly Tyr Ser Leu Asp Gly Pro
210          215          220
Glu Glu Ile Glu Cys Thr Lys Leu Gly Asn Trp Ser Ala Met Pro Ser
225          230          235          240
Cys Lys Ala Ser Cys Lys Leu Pro Val Lys Lys Ala Thr Val Val Tyr
245          250          255
Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu
260          265          270
His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys
275          280          285
Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro
290          295          300
Lys Cys Phe Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys Thr Asp Ala
305          310          315          320
Ser Asp Val Lys Pro Cys
          325

```

<210> 3

<211> 192

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(192)

<400> 3

```

gga cgg acc tgt ccc aag cca gat gat tta cca ttt tcc aca gtg gtc      48
Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser Thr Val Val
 1             5             10             15

ccg tta aaa aca ttc tat gag cca gga gaa gag att acg tat tcc tgc      96
Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr Tyr Ser Cys
      20             25             30

aag ccg ggc tat gtg tcc cga gga ggg atg aga aag ttt atc tgc cct      144
Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe Ile Cys Pro
      35             40             45

ctc aca gga ctg tgg ccc atc aac act ctg aaa tgt aca ccc aga gta      192
Leu Thr Gly Leu Trp Pro Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr Pro Arg Val
      50             55             60

```

<210> 4
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

```

<400> 4
Gly Arg Thr Cys Pro Lys Pro Asp Asp Leu Pro Phe Ser Thr Val Val
 1             5             10             15
Pro Leu Lys Thr Phe Tyr Glu Pro Gly Glu Glu Ile Thr Tyr Ser Cys
      20             25             30
Lys Pro Gly Tyr Val Ser Arg Gly Gly Met Arg Lys Phe Ile Cys Pro
      35             40             45
Leu Thr Gly Leu Trp Pro Ile Asn Thr Leu Lys Cys Thr Pro Arg Val
      50             55             60

```

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

```

<400> 5
Cys Thr Pro Arg Val Cys
 1             5

```

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

```

<400> 6
Phe Ser Thr Val Val Pro
 1             5

```

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

```

<400> 7
Lys Pro Asp Asp Leu Pro
 1             5

```

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 8
Gly Arg Thr Cys Pro Lys
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 9
Thr Leu Lys Cys Thr Pro
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 10
Ile Cys Pro Leu Thr Gly
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 11
Phe Ile Cys Pro Leu Thr
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 12
Ile Thr Tyr Ser Cys Lys
1 5

<210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> construção sintética.

<400> 13
aaaccacctt aatggtgatg gtgatggtgg ccacatggct ttaca 45

<210> 14
<211> 31
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> construção sintética
<400> 14
gacatactct ggggtgtccgt cctgcaatag c 31

<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> construção sintética
<400> 15
tggagggcag atgatccgtc ctgcaatagc 30

<210> 16
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> construção sintética
<400> 16
gaatgggcat ttacttccc gtcttgcaat agc 33

<210> 17
<211> 33
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> construção sintética
<400> 17
aggtaattta caagatgccc gtcttgcaat agc 33

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> construção sintética

<400> 18
atggtgatgg tggccacaac ttggcatggc 30

<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> construção sintética
<400> 19
atggtgatgg tggccgcatt ctggtaattt ag 32

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Os aminoácidos 3-60 foram eliminados de β_2 GPI (SEQ ID NO:2)
<400> 20
Gly Arg Thr Pro Arg
1 5

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Os aminoácidos 3-120 foram eliminados de β_2 GPI (SEQ ID NO:2)
<400> 21
Gly Arg Ile Ile Cys
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial
<220>
<223> Os aminoácidos 3-182 foram eliminados de β_2 GPI (SEQ ID NO:2)
<400> 22
Gly Arg Glu Val Lys
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Os aminoácidos 3-242 foram eliminados de β_2 GPI (SEQ ID NO:2)

<400> 23

Gly Arg Ala Ser Cys
1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Os aminoácidos 242-326 foram eliminados ou os aminoácidos 182-326 foram eliminados ou os aminoácidos 165-326 foram eliminados ou os aminoácidos 123-326 foram eliminados de β_2 GPI (SEQ ID NO:2)

<400> 24

Gly Arg Thr Cys Pro
1 5

<210> 25

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 25

ctataaatac ggatcccgga aattcg 26

<210> 26

<211> 35

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 26

gcagctggcc aactctgggt gtacatttca gagg 35

<210> 27

<211> 34

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 27

gcagctggcc aatgatggga gcacagagag gaag 34

<210> 28

<211> 63

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val
1				5					10					15	
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys
		20						25					30		
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro
		35					40					45			
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	
	50					55					60				

<210> 29

<211> 62

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val	Pro
1				5				10						15	
Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys	Lys
		20						25					30		
Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro	Leu
		35					40					45			
Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg		
	50					55					60				

<210> 30

<211> 65

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> construção sintética

<400> 30

Gly	Arg	Thr	Cys	Pro	Lys	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Val
1				5					10					15	
Pro	Leu	Lys	Thr	Phe	Tyr	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ile	Thr	Tyr	Ser	Cys
		20						25					30		
Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Met	Arg	Lys	Phe	Ile	Cys	Pro
		35					40					45			
Leu	Thr	Gly	Leu	Trp	Pro	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Thr	Pro	Arg	Val
	50					55					60				
Cys															
65															

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado que compreende uma molécula de plataforma de valência e um polipéptido que compreende pelo menos seis aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4, que possui um comprimento inferior a 100 aminoácidos e que se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI

2. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido compreende o domínio 1 do polipéptido β_2 GPI de SEQ ID NO: 4.

3. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, em que os referidos seis aminoácidos contíguos são seleccionados entre as SEQ ID NOS: 5 a 12.

4. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido compreende do aminoácido 4 ao aminoácido 60 da SEQ ID NO: 4.

5. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido compreende pelo menos quinze aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4.

6. Conjugado de acordo com a reivindicação 5, em que o polipéptido compreende pelo menos trinta aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4.

7. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, em que o polipéptido possui um comprimento inferior a 75 aminoácidos.

8. Conjugado de acordo com a reivindicação 7, em que o polipéptido possui um comprimento inferior a 50 aminoácidos.

9. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o polipéptido faz parte de uma proteína de fusão contendo um ou mais dos referidos polipéptidos e uma outra sequência de aminoácidos que não está ligada ao(s) referido(s) polipéptido(s) na molécula nativa.

10. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o polipéptido não possui um epítopo de células T, o referido epítopo de células T sendo capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

11. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a molécula de plataforma é proteica.

12. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a molécula de plataforma não é proteica.

13. Conjugado de acordo com a reivindicação 12, em que a molécula de plataforma é o polietilenoglicol.

14. Conjugado de acordo com a reivindicação 13, em que o polietilenoglicol possui um peso molecular de 200 a 8000.

15. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o peso molecular de uma população de moléculas de plataforma de valência é homogéneo.

16. Conjugado de acordo com a reivindicação 15, em que a molécula de plataforma é 2,2'-etilenodioxidiethylamina derivatizada ou trietilenoglicol.

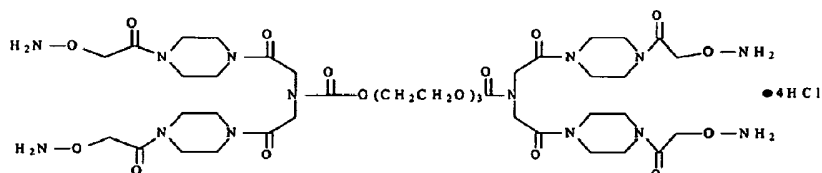
17. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a molécula de plataforma está ligada ao polipéptido através de uma ligação tioéter.

18. Conjugado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a molécula de plataforma está ligada ao polipéptido através de uma ligação oxima.

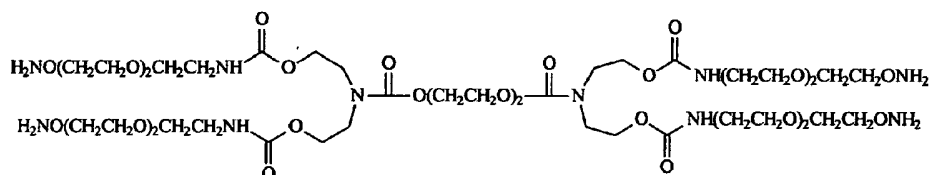
19. Conjugado de acordo com a reivindicação 18, que foi formado por reacção de um referido polipéptido possuindo um grupo carbonilo com uma referida molécula de plataforma que contém um grupo reactivo amino-oxi.

20. Conjugado de acordo com a reivindicação 19, em que o grupo reactivo amino-oxi é um grupo amino-oxi, amino-oxiacetilo ou amino-oxialquilo.

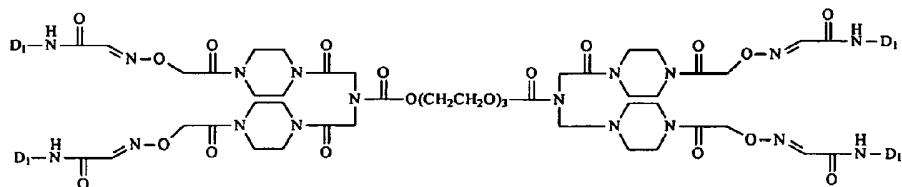
21. Conjugado de acordo com a reivindicação 20, em que a molécula de plataforma é



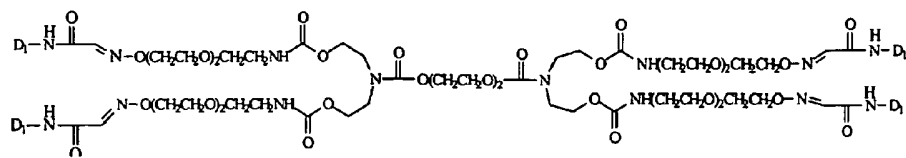
ou



22. Conjugado de acordo com a reivindicação 1, em que o conjugado é:



onde D1 é um referido polipéptido, ou



onde D1 é um referido polipéptido.

23. Polipéptido que se liga especificamente a um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, que possui um comprimento inferior a 75 aminoácidos e que compreende pelo menos 30 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 4 ou, se possuir um comprimento inferior a 30 aminoácidos, compreende pelo

menos seis aminoácidos contíguos seleccionados entre as SEQ ID NOS: 5, 9, 10, 11 e 12.

24. Polipéptido de acordo com a reivindicação 23, que compreende o domínio 1 do polipéptido β_2 GPI de SEQ ID NO: 4.

25. Polipéptido de acordo com a reivindicação 23, que compreende pelo menos seis aminoácidos contíguos seleccionados entre as SEQ ID NOS: 5 a 12.

26. Polipéptido de acordo com a reivindicação 23, que compreende do aminoácido 4 ao aminoácido 60 de SEQ ID NO: 4.

27. Polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, que não possui um epítopo de células T, o referido epítopo de células T sendo capaz de activar as células T num indivíduo que possui anticorpos antifosfolípidos dependentes de β_2 GPI.

28. Polipéptido de fusão compreendendo um polipéptido definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 27.

29. Polinucleótido isolado, de ocorrência natural ou não natural, que codifica um polipéptido definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ou 23 a 28.

30. Vector de expressão ou de clonagem compreendendo um polinucleótido definido de acordo com a reivindicação 29.

31. Célula hospedeira transformada com um polinucleótido definido de acordo com a reivindicação 29.

32. *Kit* para detectar

(a) um anticorpo que se liga especificamente a um domínio 1 do polipéptido β_2 GPI ou

(b) coagulação,

em que o referido *kit* compreende um conjugado definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22 ou um polipéptido definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 23 a 28, numa embalagem apropriada.

33. Composição compreendendo uma quantidade eficaz de um conjugado definido de acordo com a reivindicação 10 ou de um polipéptido definido de acordo com a reivindicação 10 ou 27, em que uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para induzir tolerância.

34. Composição de acordo com a reivindicação 33, em que a tolerância é indicada por uma estabilização ou uma redução da produção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

35. Composição de acordo com a reivindicação 33 ou 34, compreendendo ainda um excipiente farmacologicamente aceitável.

36. Composição compreendendo uma quantidade eficaz de um conjugado definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22 ou de um polipéptido definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 23 a 28, em que uma quantidade eficaz é uma quantidade suficiente para detectar um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

37. Método de detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um polipéptido definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 23 a 28, numa amostra, que compreende (a) colocar o anticorpo da amostra em contacto com um conjugado definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22 ou com um referido polipéptido, em condições que permitem a formação de um complexo antígeno-anticorpo estável; e (b) detectar o complexo estável formado na etapa (a), caso exista.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, em que o anticorpo é um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

39. Método de purificação de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, que compreende colocar uma amostra biológica em contacto com um conjugado definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22 ou com um polipéptido definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 23 a 28, em condições que permitem a

formação de um complexo antigénio-anticorpo estável, e obter o complexo formado, caso exista.

40. Polipéptido definido de acordo com a reivindicação 10 ou 27 ou conjugado definido de acordo com a reivindicação 10, para utilizar num método de indução de tolerância num indivíduo.

41. Polipéptido ou conjugado de acordo com a reivindicação 40, em que a tolerância é indicada por uma estabilização ou uma redução da produção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

42. Polipéptido ou conjugado de acordo com a reivindicação 40 ou 41, em que o indivíduo é um ser humano.

43. Conjugado de acordo com a reivindicação 10, em que o polipéptido consiste na sequência do aminoácido 1 ao aminoácido 60 de SEQ ID NO:4, para utilizar num método descrito de acordo com a reivindicação 40.

44. Método de detecção da mediação da coagulação por um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI, que compreende as etapas de:

- (a) efectuar uma primeira análise de coagulação utilizando uma amostra biológica adequada de um indivíduo, em que um conjugado definido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22 ou um polipéptido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 e 23 a 28 é adicionado à análise;
- (b) efectuar uma segunda análise de coagulação utilizando uma amostra biológica adequada do indivíduo, na ausência do polipéptido; e
- (c) comparar os resultados das análises das etapas (a) e (b), em que uma diferença nos resultados indica uma mediação da coagulação por um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

45. Utilização de um polipéptido de acordo com a reivindicação 10 ou 27 ou de um conjugado definido de acordo com a reivindicação 10, para o fabrico de um medicamento destinado a induzir tolerância num indivíduo.

46. Utilização de acordo com a reivindicação 45, em que a tolerância é indicada por uma estabilização ou uma redução da produção de um anticorpo antifosfolípido dependente de β_2 GPI.

47. Utilização de acordo com a reivindicação 45 ou 46, em que o indivíduo é um ser humano.

Lisboa,

FIGURA 1A

FIGURA 1B

FIGURA 1C

FIGURA 1

FIGURA 1A

1	GGA	CGG	ACC	TGT	CCC	AAG	CCA	GAT	GAT	TTA	CCA	TTT	TCC	ACA	GTG	GTC	CCG	TTA	AAA	ACA	20
	gly	arg	thr	cys	pro	lys	pro	asp	asp	leu	pro	phe	ser	thr	val	val	pro	leu	lys	thr	40
										30											
	TTC	TAT	GAG	CCA	GGA	GAA	GAG	ATT	ACG	TAT	TCC	TGC	AAG	CCG	GGC	TAT	GTG	TCC	CGA	GGA	40
	phe	tyr	glu	pro	gly	glu	glu	ile	thr	tyr	ser	cys	lys	pro	gly	tyr	val	ser	arg	gly	60
										50											
	GGG	ATG	AGA	AAG	TTT	ATC	TGC	CCT	CTC	ACA	GGA	CTG	TGG	CCC	ATC	AAC	ACT	CTG	AAA	TGT	60
	gly	met	arg	lys	phe	ile	cys	pro	leu	thr	gly	leu	trp	pro	ile	asn	thr	leu	lys	cys	80
										70											
	ACA	CCC	AGA	GTA	TGT	CCT	TTT	GCT	GGA	ATC	TTA	GAA	AAT	GGA	GCC	GTA	CGC	TAT	ACG	ACT	80
	thr	pro	arg	val	cys	pro	phe	ala	gly	ile	leu	glu	asn	gly	ala	val	arg	tyr	thr	thr	100
										90											
	TTT	GAA	TAT	CCC	AAC	ACG	ATC	AGT	TTT	TCT	IGT	AAC	ACT	GGG	TTT	TAT	CTG	AAT	GGC	GCT	100
	phe	glu	tyr	pro	asn	thr	ile	ser	phe	ser	cys	asn	thr	gly	phe	tyr	leu	asn	gly	ala	

110																			120
GAT	TCT	GCC	AAG	TGC	ACT	GAG	GAA	GGA	AAA	TGG	AGC	CCG	GAG	CTT	CCT	GTC	TGT	GCT	CCC
asp	ser	ala	lys	cys	thr	glu	glu	gly	lys	trp	ser	pro	glu	leu	pro	val	cys	ala	pro
130																			140
ATC	ATC	TGC	CCT	CCA	CCA	TCC	ATA	CCT	ACG	TTT	GCA	ACA	CTT	CGT	GTT	TAT	AAG	CCA	TCA
ile	ile	cys	pro	pro	pro	ser	ile	pro	thr	phe	ala	thr	leu	arg	val	tyr	lys	pro	ser
150																			160
GCT	GGA	AAC	AAT	TCC	CTC	TAT	CGG	GAC	ACA	GCA	GTT	TTT	GAA	TGT	TTG	CCA	CAA	CAT	GCG
ala	gly	asn	asn	ser	leu	tyr	arg	asp	thr	ala	val	phe	glu	cys	leu	pro	gln	his	ala
170																			180
ATG	TTT	GGA	AAT	GAT	ACA	ATT	ACC	TGC	ACG	ACA	CAT	GGA	AAT	TGG	ACT	AAA	TTA	CCA	GAA
met	phe	gly	asn	asp	thr	ile	thr	cys	thr	thr	his	gly	asn	trp	thr	lys	leu	pro	glu
190																			200
TGC	AGG	GAA	GTA	AAA	TGC	CCA	TTC	CCA	TCA	AGA	CCA	GAC	AAT	GGA	TTT	GTG	AAC	TAT	CCT
cys	arg	glu	val	lys	cys	pro	phe	pro	ser	arg	pro	asp	asn	gly	phe	val	asn	tyr	pro
210																			220
GCA	AAA	CCA	ACA	CTT	TAT	TAC	AAG	GAT	AAA	GCC	ACA	TTT	GGC	TGC	CAT	GAT	GGA	TAT	TCT
ala	lys	pro	thr	leu	tyr	tyr	lys	asp	lys	ala	thr	phe	gly	cys	his	asp	gly	tyr	ser
230																			240
CTG	GAT	GGC	CCG	GAA	GAA	ATA	GAA	TGT	ACC	AAA	CTG	GGA	AAC	TGG	TCT	GCC	ATG	CCA	AGT
leu	asp	gly	pro	glu	glu	ile	glu	cys	thr	lys	leu	gly	asn	trp	ser	ala	met	pro	ser

FIGURA 1B


```

-----
TGT AAA GCA TCT TGT AAA TTA CCT GTG AAA AAA GCC ACT GTG GTG TAC CAA GGA GAG AGA      260
cys lys ala ser cys lys lys leu pro val lys lys ala thr val val tyr gln gly glu arg
GTA AAG ATT CAG GAA AAA TTT AAG AAT GGA ATG CTA CAT GGT GAT AAA GTT TCT TTC TTC      280
val lys ile gln glu lys phe lys asn gly met leu his gly asp lys val ser phe phe
TGC AAA AAT AAG GAA AAG AAG TGT AGC TAT ACA GAG GAT GCT CAG TGT ATA GAT GGC ACT      300
cys lys asn lys lys lys cys ser tyr thr glu asp ala gln cys ile asp gly thr
ATC GAA GTC CCC AAA TGC TTC AAG GAA CAC AGT TCT CTG GCT TTT TGG AAA ACT GAT GCA      320
ile glu val pro lys cys phe lys glu his ser ser leu ala phe trp lys thr asp ala

TCC GAT GTA AAG CCA TGC
ser asp val lys pro cys

```

FIGURA 1C

1	GCA	CGG	ACC	TGT	CCC	AAG	CCA	GAT	GAT	TTA	CCA	TTT	TCC	ACA	GTG	GTC	CCG	TTA	AAA	ACA	20
	gly	arg	thr	cys	pro	lys	pro	asp	asp	leu	pro	phe	ser	thr	val	val	pro	leu	lys	thr	40
	TTC	TAT	GAG	CCA	GGA	GAA	GAG	ATT	ACG	TAT	TCC	TGC	AAG	CCG	GGC	TAT	GTG	TCC	CGA	GGA	
	phe	tyr	glu	pro	gly	glu	glu	ile	thr	tyr	ser	cys	lys	pro	gly	tyr	val	ser	arg	gly	60
	GGG	ATG	AGA	AAG	TTT	ATC	TGC	CCT	CTC	ACA	GGA	CTG	TGG	CCC	ATC	AAC	ACT	CTG	AAA	TGT	
	gly	met	arg	lys	phe	ile	cys	pro	leu	thr	gly	leu	trp	pro	ile	asn	thr	leu	lys	cys	80
	ACA	CCC	AGA	GTA																	
	thr	pro	arg	val																	

FIGURA 2

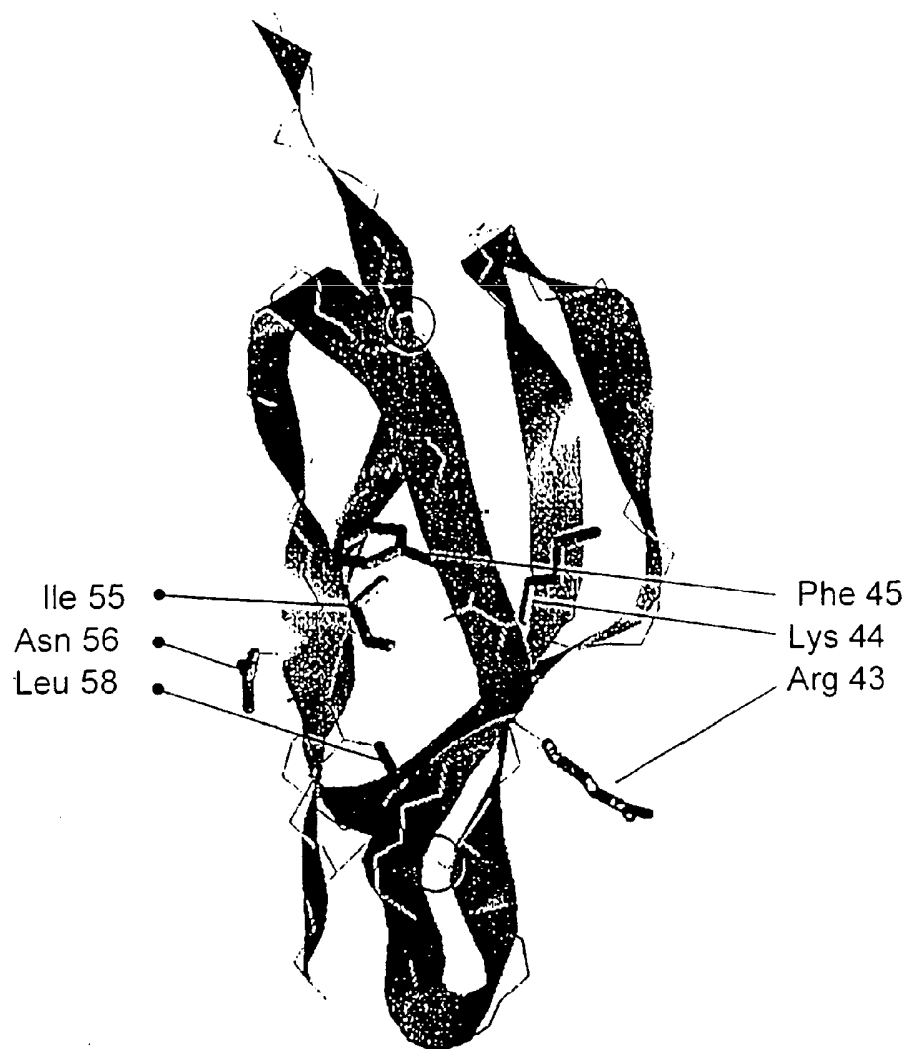


FIGURA 3

FIGURA 5

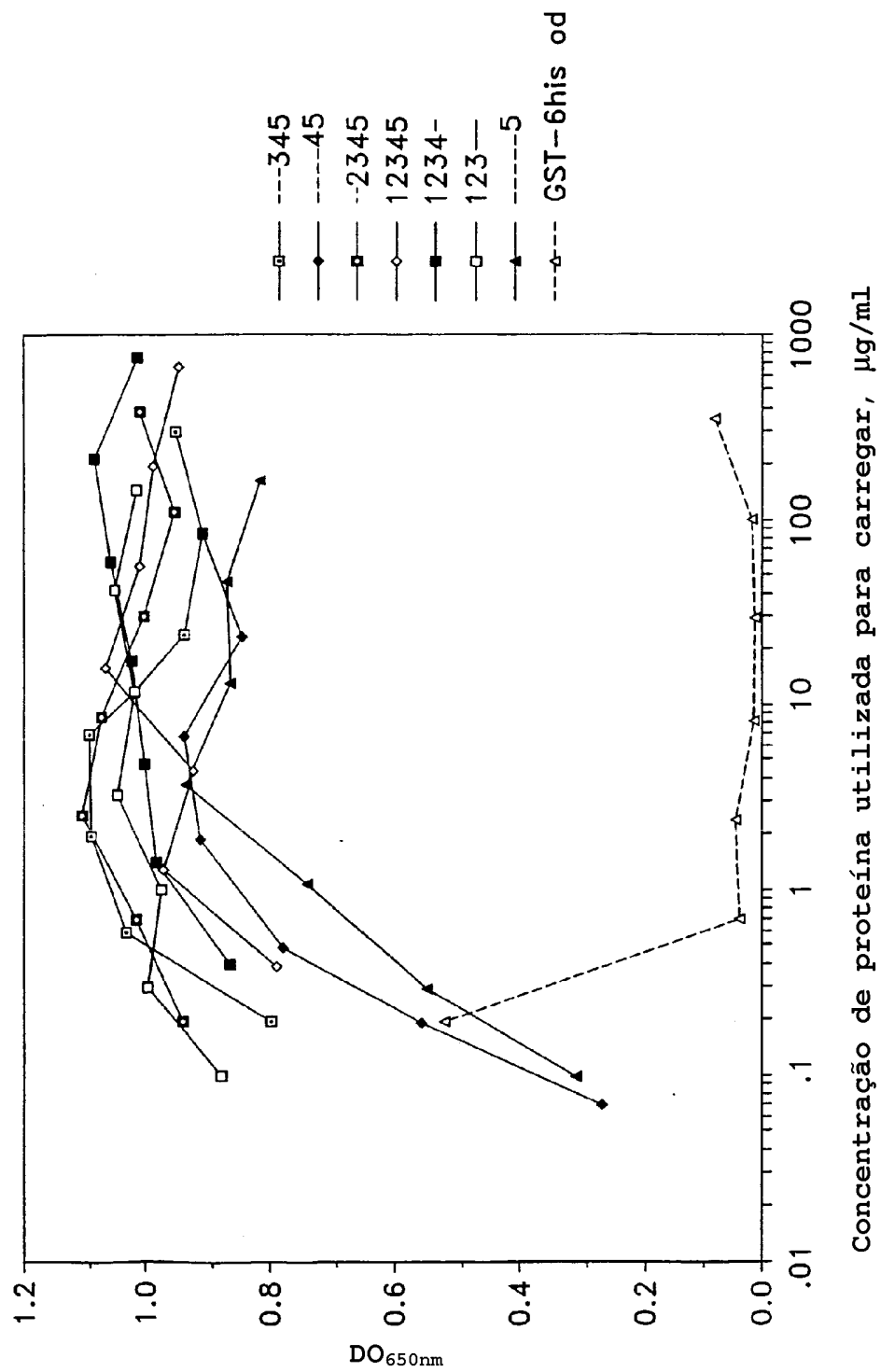


FIGURA 6

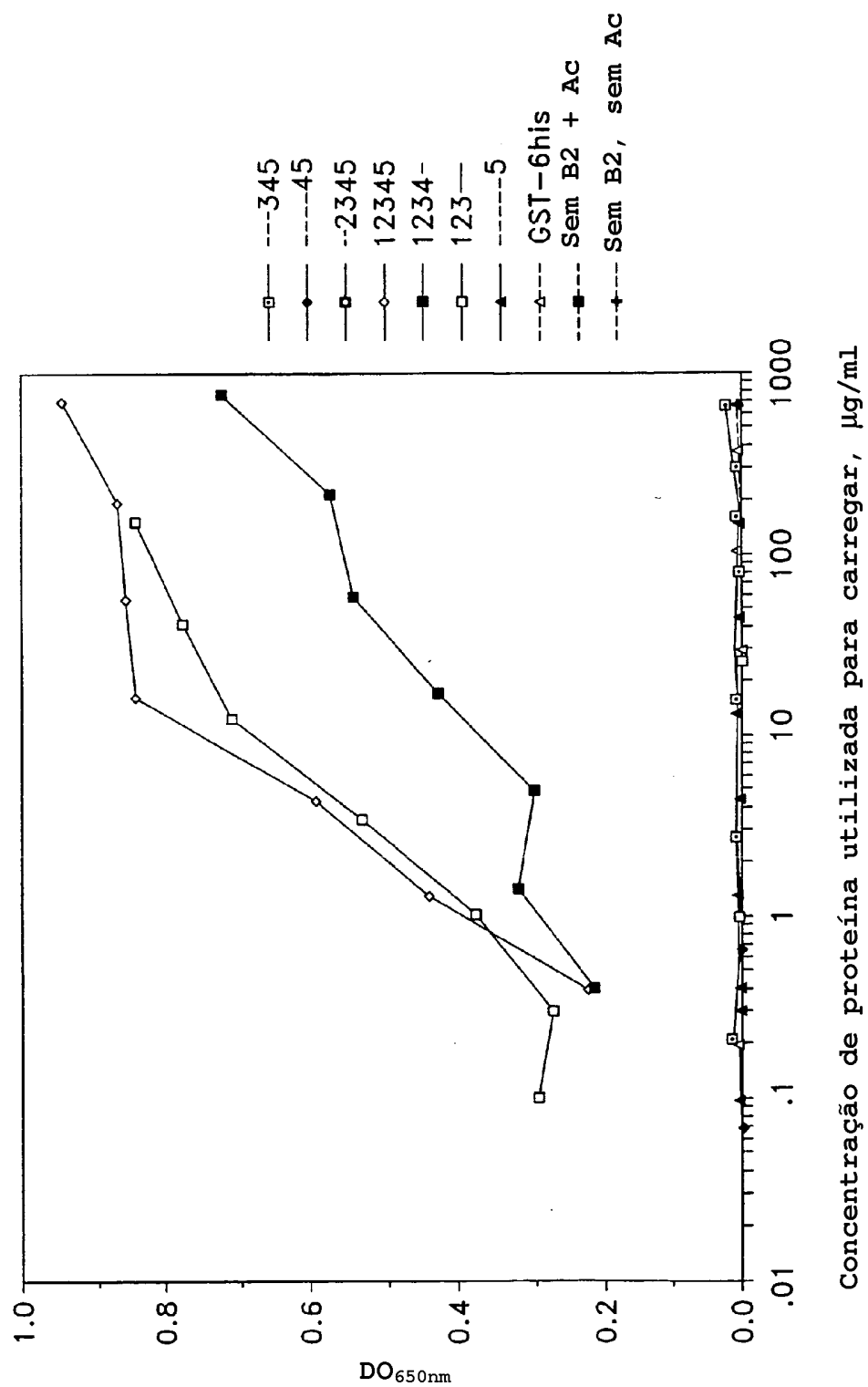


FIGURA 7

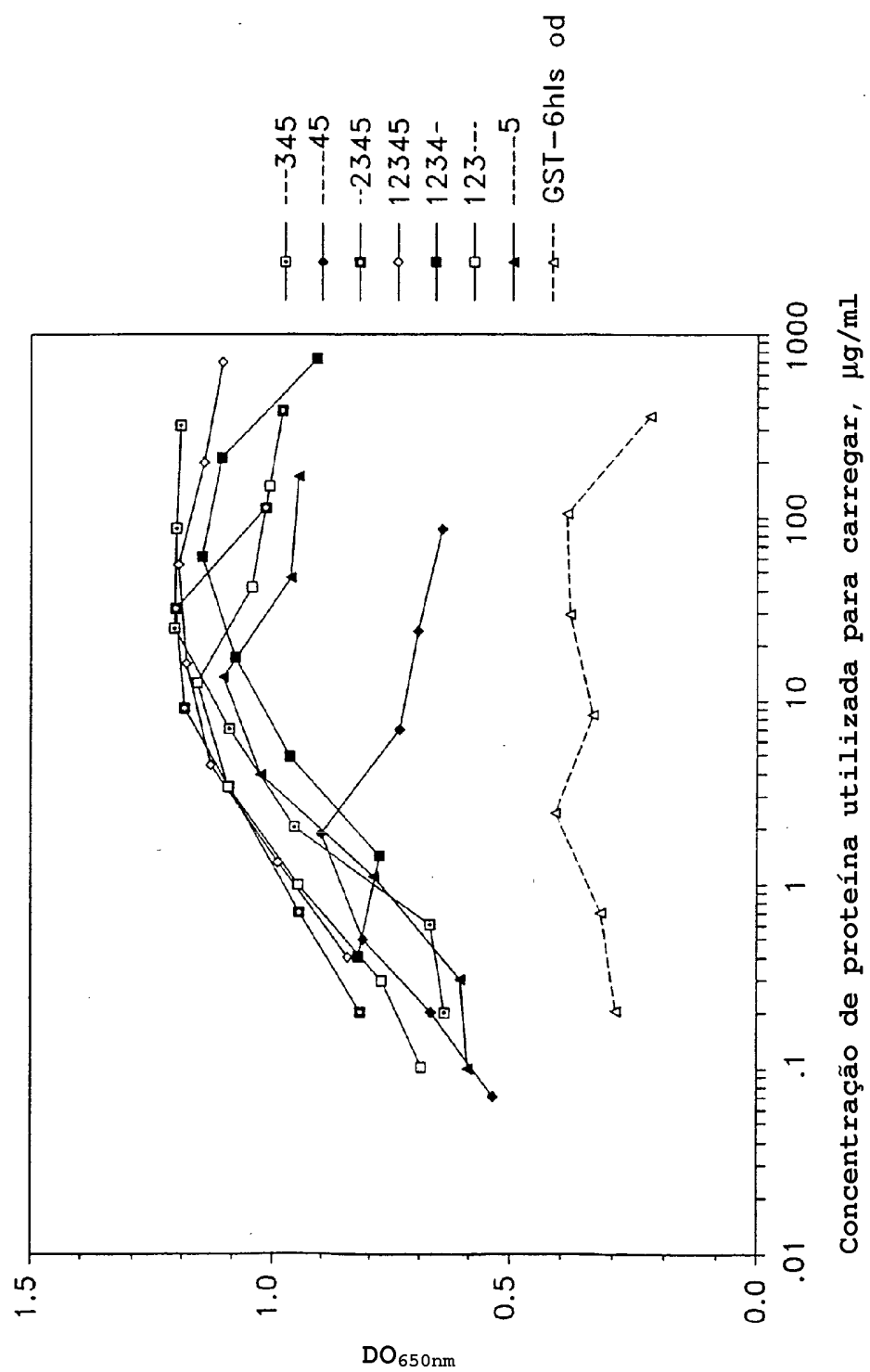


FIGURA 8

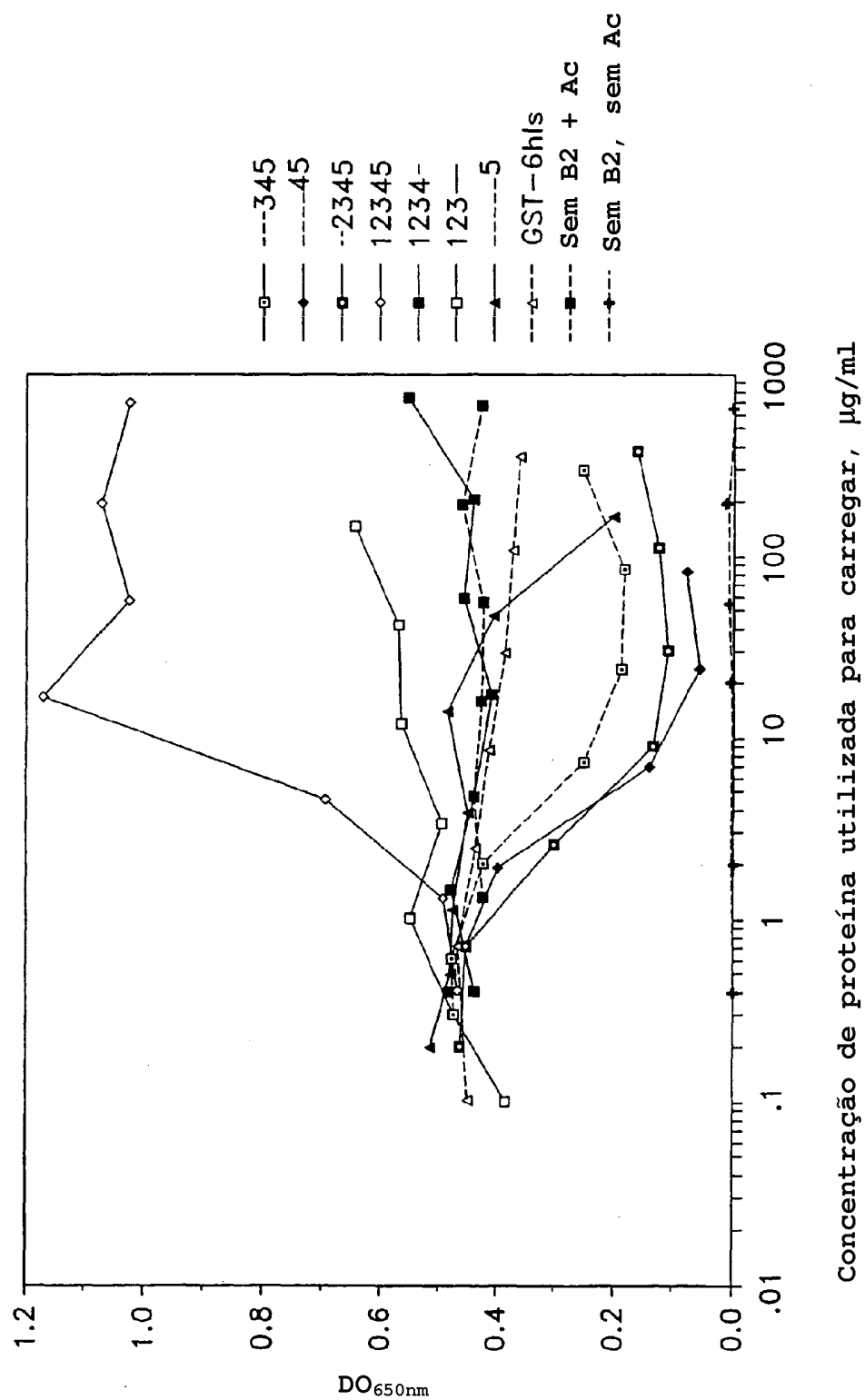
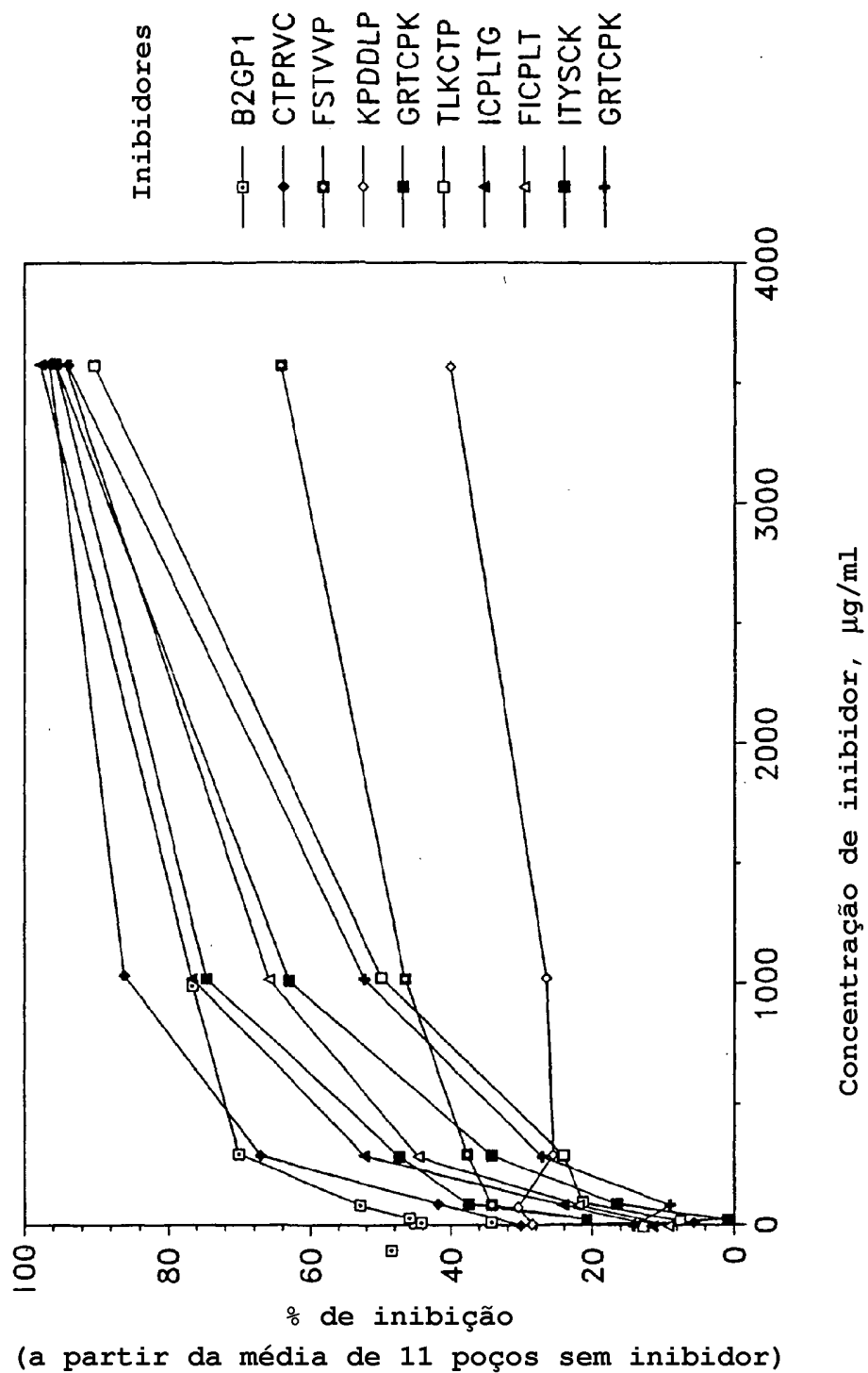


FIGURA 9



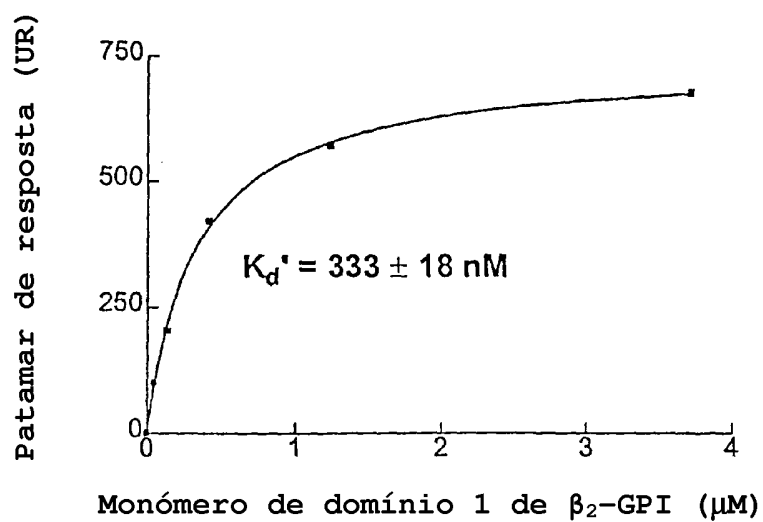


FIGURA 10A

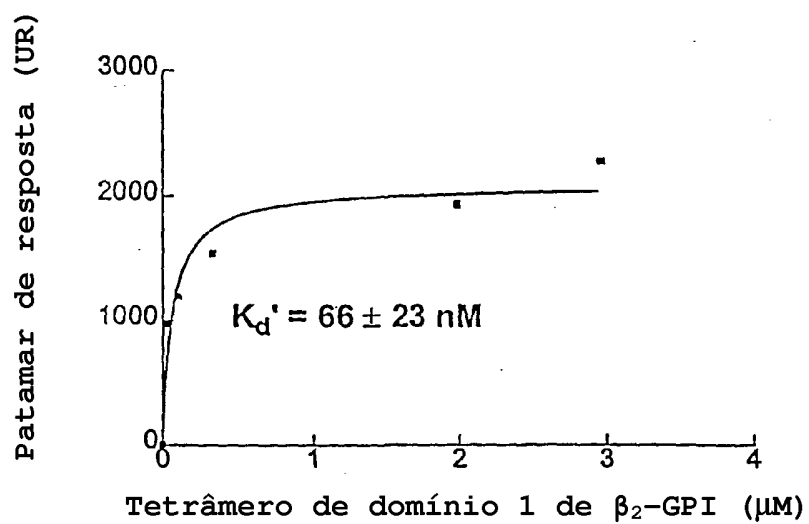
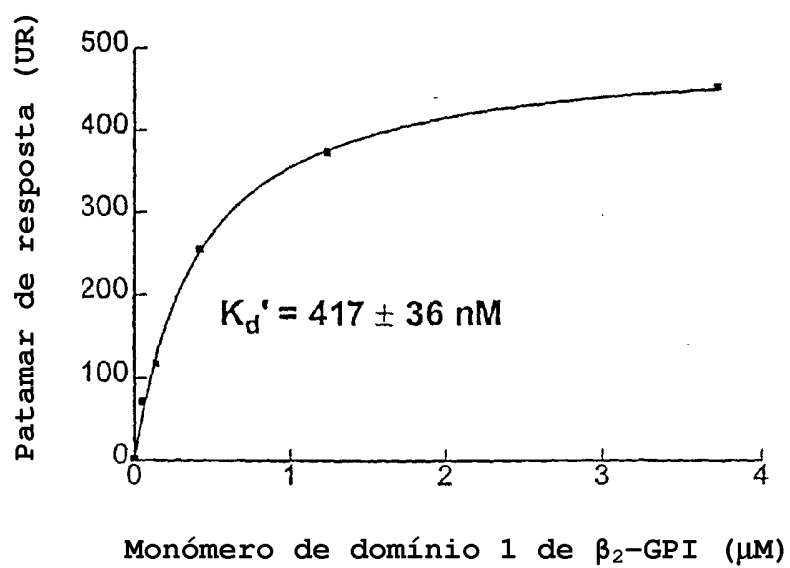
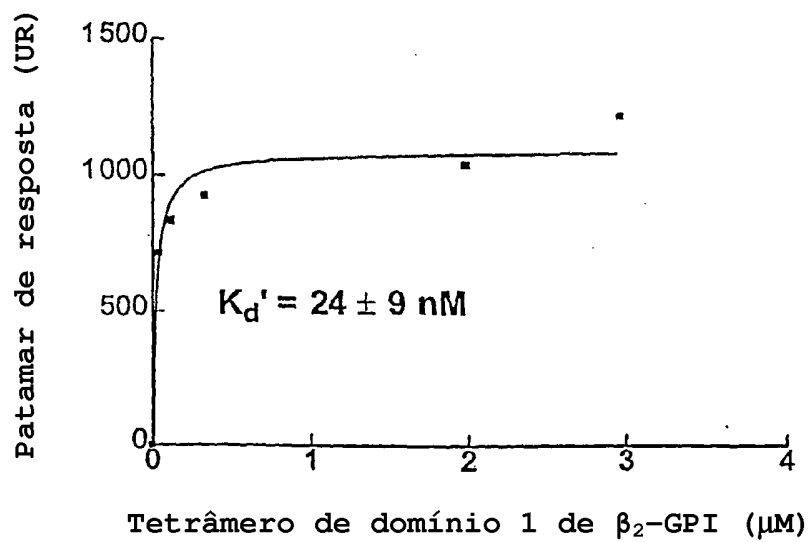
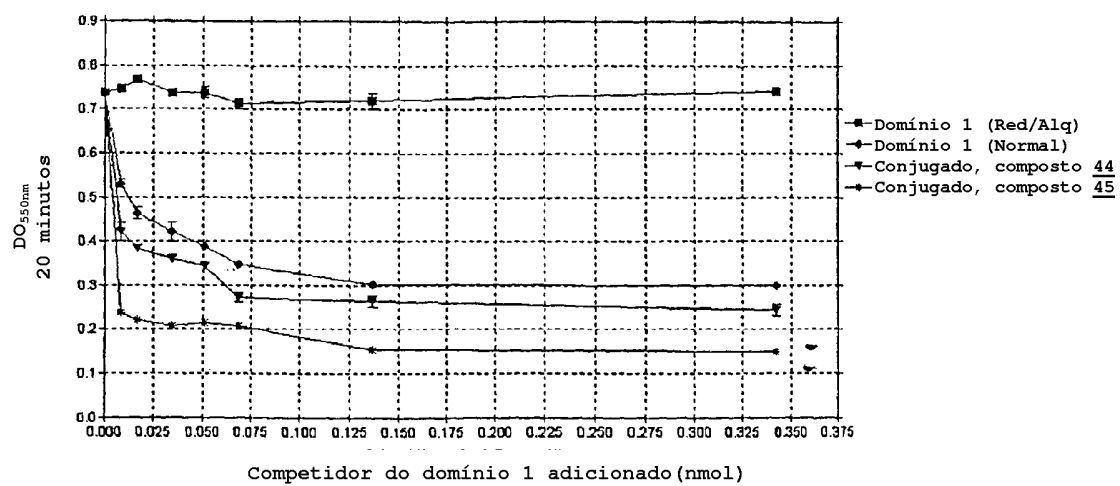
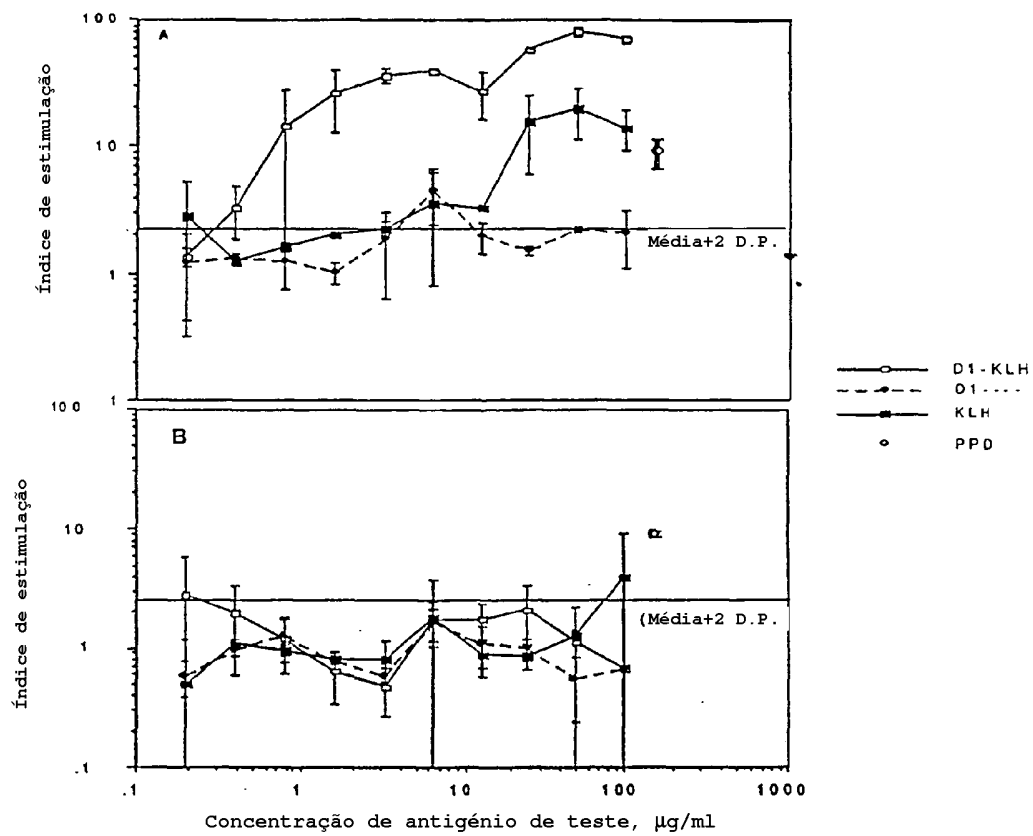
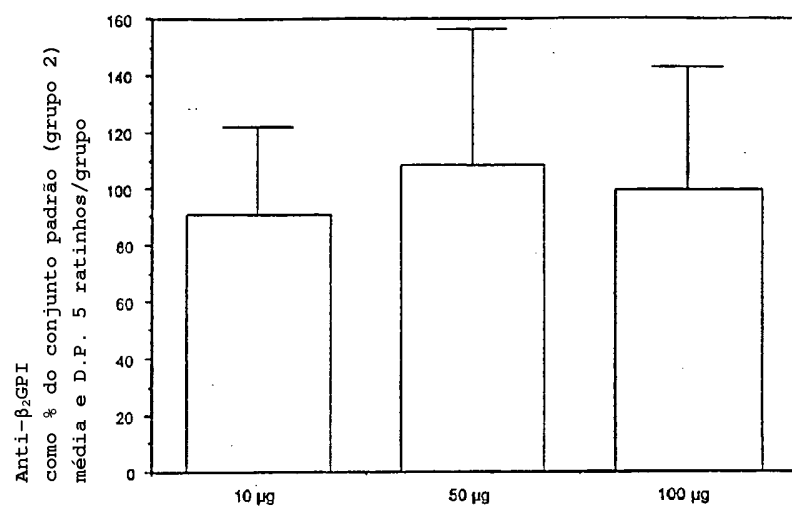


FIGURA 10B

**FIGURA 10A****FIGURA 10B**

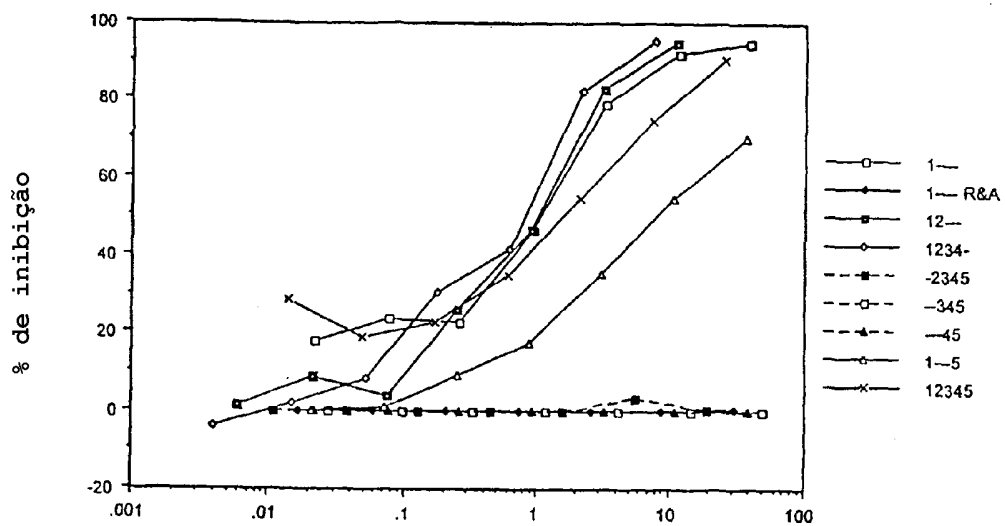
**FIGURA 12**

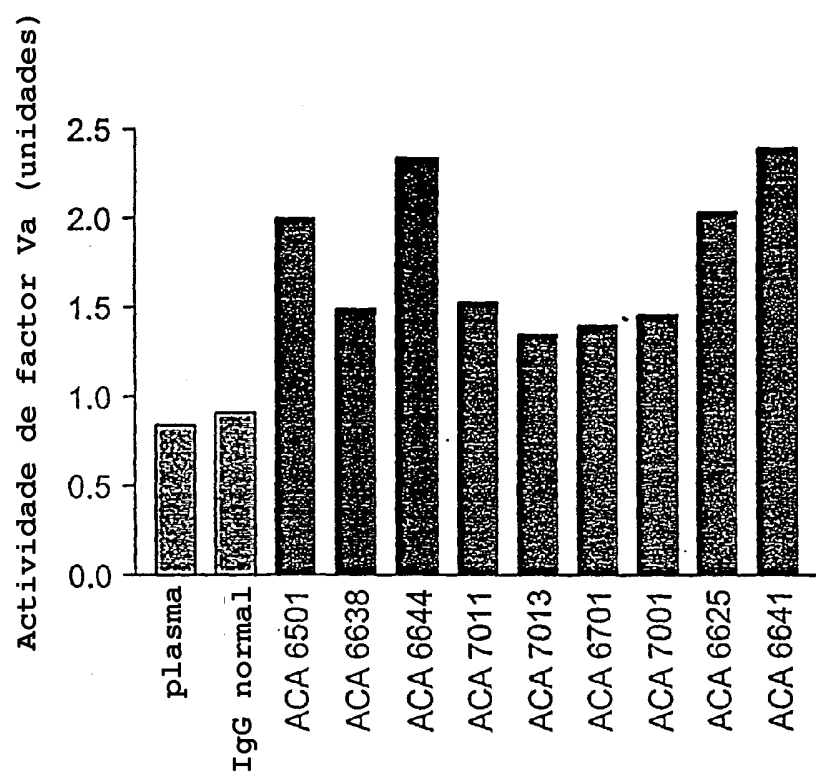
**FIGURA 13**



Dose de conjugado de KLH-Domínio 1 utilizada para efectuar a sensibilização activa

FIGURA 14

**FIGURA 15**

**FIGURA 16**