



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(11) Número de Publicação: **PT 972781 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/745 (2006.01) **C07K 16/36** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)

(22) Data de pedido: **1992.07.02**

(30) Prioridade(s): **1991.07.02 US 0724746**
1992.07.01 US 0907190

(43) Data de publicação do pedido: **2000.01.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.03**
003/2007

(73) Titular(es):

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
10666 NORTH TORREY PINES ROAD LA JOLLA,
CALIFORNIA 92037 **US**

(72) Inventor(es):

JOHN H. GRIFFIN **US**
JOSE A. FERNANDEZ **US**

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **POLIPÉPTIDOS DE PROTEÍNAS E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO

"POLIPÉPTIDOS DE PROTEÍNA S E SUAS UTILIZAÇÕES"

A invenção divulga polipéptidos de proteína S e anticorpos anti-PS capazes de inibir a ligação de proteínas C4BP. Os péptidos e anticorpos são úteis em métodos de diagnóstico e sistemas para purificar ou detectar proteína S livre. Adicionalmente, os polipéptidos são úteis em métodos terapêuticos como um anticoagulante.

DESCRIÇÃO

"POLIPÉPTIDOS DE PROTEÍNA S E SUAS UTILIZAÇÕES"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se a polipéptidos e anticorpos antipéptidos úteis para métodos e composições terapêuticas para inibição da ligação da proteína S à proteína de ligação C4b. Adicionalmente, os polipéptidos e anticorpos são úteis em métodos de diagnóstico para a detecção da proteína S livre em amostras de fluidos.

Antecedentes

A proteína S dependente da vitamina K S (PS) é uma glicoproteína de cadeia simples com uma massa molecular de 75000 daltons. Serve como cofactor da proteína C activada na inactivação dos factores Va e VIIIa. A concentração de PS em plasma humano é aproximadamente 25 mg/L. A proteína S encontra-se no plasma citratado em pelo menos duas formas, PS livre (PS_F), compreendendo cerca de 40% de PS total, e ligada à proteína de ligação C4b (C4BP), compreendendo cerca de 60% de PS total. A C4BP é uma proteína de regulação da via clássica do sistema do complemento. Apenas a forma livre de PS apoia a actividade de cofactor para a proteína C activada. A proteína S forma complexos com C4BP na presença de Ca⁺⁺ e EDTA, e a constante de dissociação (Kd) para a interacção é muito mais

baixa na presença de Ca^{++} (6×10^{-10} M) do que na presença de EDTA (10^{-9} M). Esta constante de ligação baixa sugere que a proteína S circulante no sangue está completamente ligada a C4BP ou que pode estar envolvido outro componente que altera o equilíbrio entre a proteína S e C4BP. Este terceiro componente denominado proteína de ligação da proteína S (PSBP) foi descrito no plasma bovino mas não foi encontrado no plasma humano.

A relevância fisiológica da proteína S é demonstrada pelo observado aumento do risco de tromboembolismo venoso entre os indivíduos com deficiência congénita em proteína S. Adicionalmente, 30% dos doentes exibindo trombose arterial, exibem diminuição nos níveis plasmáticos sanguíneo. Assim, ensaios para a medida dos níveis plasmáticos de PS, e em particular os níveis de PS livre são um instrumento importante para o clínico. A complexação de PS com C4BP remove a forma anticoagulante activa de PS (PS_F) da circulação.

Ensaaios prévios para medida dos níveis plasmáticos de PS incluíram a utilização de uma mistura de plasmas normais como padrão de referência que continha PS total, compreendendo PS livre (PS_F) e complexada (PS:C4BP). Assim, o ensaio deve separar a PS livre da PS complexada, de modo a identificar a quantidade de PS_F disponível no sangue. Edson *et al.*, *Am. J. Clin. Path.* 94: 176-186 (1990) revê os métodos laboratoriais de diagnóstico para a detecção de proteína S livre, incluindo o processo de imuno-electroforese cruzada de duas dimensões (CIEP) de Laurel *et al.*, *Anal. Biochem.*, 10:358-361 (1985), e o processo de precipitação em dois passos de Comp *et al.*, *Blood* 67:504-508 (1986), utilizando polietilenoglicol para remover selectivamente o complexo PS:C4BP de PS livre antes da medição de PS.

Não foram descritos anticorpos imuno-específicos para PS livre. Tentativas para desenvolver anticorpos que se ligam à região de PS envolvida na ligação a C4BP, e que desse modo inibiria a ligação de PS a C4BP, também não tiveram sucesso. Dahlback *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 8127-8135 (1990). Assim, presentemente não existem meios para distinguir imunologicamente PS livre do complexo PS:C4BP. Por não existir presentemente um ensaio para PS livre directo, os ensaios para PS livre requerem um passo de separação para distinguir as espécies imunologicamente indistinguíveis de PS livre do complexo PS:C4BP.

Malm *et al.*, descreveram um anticorpo monoclonal que reage imunologicamente com a proteína S (*Eur. J. Biochem.* 165:39-45, 1987). O anticorpo descrito liga a proteína S livre e liga a proteína S complexada com a proteína de ligação C4b (C4BP), mas não liga a proteína S clivada por trombina, e é deste modo proposto que se liga a um epitopo localizado próximo do domínio gla da proteína S.

Walker (*J. Biol. Chem.* 1989, 264(30):17645-17648) divulga a caracterização de um péptido sintético que é capaz de inibir a interacção entre a proteína S e a proteína de ligação C4b. Este péptido foi utilizado para aumentar a actividade de cofactor anticoagulante da proteína S de coelho *in vivo* por modulação da actividade da proteína S (Weinstein & Walker. *J. Clin. Invest.* 1990, 86(6): 1928-1935).

O documento EP0271810 divulga um método de determinar imunologicamente a presença de proteína S livre ou complexo proteína de ligação C4-proteína S humana num ensaio de amostra, enquanto o documento EP 0315447 divulga um método para testar

imunologicamente a presença de proteína S livre humana utilizando um anticorpo monoclonal que pode detectar proteína S livre, mas não em ligação.

Tombesi *et al.* (*Curr. Studies in Hematology and Blood Transfusion*, 1991, 58:205-210) divulga a avaliação de um método para detecção de proteína S utilizando anticorpos monoclonais.

Suzuki *et al.* (*Chemical Abstracts*, 1990, 112(17), 156574g, p. 574, coluna 1) revela a preparação de anticorpos monoclonais contra a proteína S e a sua utilização para purificar a proteína S e preparar soro livre de proteína S.

Recentemente, foi descrito o péptido sintético GVQLDLDEAI (SEQ ID N° 6: 3-17), que é derivado da região do terminal carboxilo da proteína S (resíduos 605 a 614 de PS madura) e que inibe a interacção da proteína S com C4BP *in vitro*. Walker *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 17645-17648 (1989); e Weinstein *et al.*, *J. Clin. Invest.* 86: 1928-1935 (1990). Estes relatórios sugerem que esta região da proteína S é importante para a ligação a C4BP. Outros polipéptidos da proteína S, correspondentes aos resíduos 608-616 e 616-624, mostraram possuir um efeito mensurável na ligação de PS a C4BP.

Foram descritos na literatura fragmentos adicionais da proteína S que são produzidos por clivagem proteolítica. Dahlback *et al.*, *Biochem. J.* 209: 837-846 (1983); Dahlback *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 5111-5115 (1986); e Stenflo *et al.*, *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 368-372 (1987). No entanto, nenhum destes fragmentos foi identificado como possuindo a capacidade de inibir a ligação da proteína S a C4BP.

Breve Sumário da Invenção

Foram agora identificadas regiões da proteína S que definem o sítio de ligação entre a proteína S (PS) e a proteína de ligação C4b (C4BP), e são úteis para produzir polipéptidos de PS e anticorpos antipéptido que inibem a interacção da ligação entre PS e C4BP. Adicionalmente, os polipéptidos de PS e anticorpos proporcionam reagentes de diagnóstico úteis para medir a PS livre em amostras corporais.

Assim, a presente invenção divulga um polipéptido de PS possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos que corresponde à sequência de uma porção da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína S madura, e que inibe a ligação da proteína S a C4BP.

Estão também contempladas moléculas de anticorpos e anticorpos monoclonais que imunorreagem com um polipéptido de PS da presente invenção e com a proteína PS nativa. Os anticorpos preferidos inibem a ligação da proteína S a C4BP.

A invenção divulga também sistemas e métodos de diagnóstico numa variedade de formatos de imunoensaios directos ou competitivos, para a detecção da presença da proteína S livre num fluido vascular pela utilização dos polipéptidos de PS e moléculas de anticorpo desta invenção. Os ensaios baseiam-se na interacção de ligação específica aqui descrita entre um polipéptido de PS ou um anticorpo com a proteína S livre.

Também contempladas estão composições terapêuticas e métodos para inibir a ligação da proteína S a C4BP utilizando os polipéptidos de PS e anticorpos da invenção.

Outra forma de realização divulga a utilização dos anticorpos para purificar a proteína S livre de amostras de fluidos, particularmente a utilização de moléculas de anticorpo imobilizado.

Outras formas de realização serão evidentes para os especialistas da técnica.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 ilustra os resultados do Ensaio de Inibição de Péptido descrito no Exemplo 5Aii. Várias concentrações dos péptidos listados foram incubadas com a proteína C4BP, que revestia os poços das placas de microtitulação de 96 poços. Subsequentemente, foi adicionada aos poços proteína S biotinilada (b-PS), e a quantidade de b-PS que se ligou a C4BP foi detectada como descrito no Exemplo 2C. Outros péptidos apresentados nas Figuras 1-3 mas não listados na Tabela 1, incluem:

PSP-287 (1:287-301); PSP-314 (1:314-328); PSP-393 (1:393-407); PSP-48 (1:48-62); PSP-57 (1:57-71), PSP-172 (1:172-186); PSP-19 (1:621-635); e PSP-425A (1:425-433). A SEQ ID N° e as correspondentes posições de resíduos de aminoácidos estão indicadas entre parêntesis.

As Figuras 2, 3 e 4 ilustram também os resultados do Ensaio de Inibição de Péptido descrito no Exemplo 5Aii e na legenda da Figura 1.

A Figura 5 ilustra os resultados do Ensaio de Inibição de Anticorpo descrito no Exemplo 5Aiii. Variando as concentrações de anti-PSP-12 (também referido como anti-PS (420-434)) e anti-PSP-13 (também referido como anti-PS (603-616)), os anticorpos foram incubados com a proteína C4BP previamente revestida nos poços da microplaca. Subsequentemente, a proteína S biotinilada (b-PS) foi adicionada aos poços, e a quantidade de b-PS que se ligou a C4BP foi detectada como descrito no Exemplo 2C.

A Figura 6, em duas figuras A e B ilustra, os resultados da electroforese 2-D descrita no ensaio para a proteína S livre por adsorção utilizando MAb 56 como descrito no Exemplo 6B. A Figura 6A apresenta os resultados da amostra de plasma normal de controlo, em que o pico de laurell grande representa o complexo C4BP:PS e o pico de laurell pequeno representa a proteína S livre. A Figura 6B apresenta os resultados de uma amostra de plasma adsorvido com MAb 56 em que o pico de laurell único representa o complexo C4BP:PS.

A Figura 7 ilustra os resultados da SDS-PAGE descrita no ensaio para proteína S livre por adsorção utilizando anticorpos policlonais anti-PS(420-434), como descrito no Exemplo 6B. A pista 1 corresponde ao material de partida, contendo tanto PS como o complexo PS:C4BP. A pista 2 corresponde ao fluxo de passagem da material de partida, após passagem através de uma coluna contendo anticorpo

policlonal anti-PS(420-434) em fase sólida. A pista 3 corresponde à fracção de material de partida eluída da coluna com tiocianato a 3 M. A seta indica a localização da banda correspondente à proteína S livre.

Descrição Detalhada da Invenção

A. Definições

Resíduo de Aminoácido: Um aminoácido formado após digestão química (hidrólise) de um polipéptido nas suas ligações peptídicas. Os resíduos de aminoácidos aqui identificados estão de um modo preferido na forma isomérica natural "L". Contudo, os resíduos na forma isomérica "D" podem ser substituídos por qualquer resíduo de aminoácido L, desde que seja mantida no polipéptido a propriedade funcional desejada. O NH₂ refere-se ao grupo amina livre presente no terminal amino de um polipéptido. O COOH refere-se ao grupo carboxilo livre presente no terminal carboxilo de um polipéptido. Estando de acordo com a nomenclatura padrão de polipéptidos, *J. Biol. Chem.* 243: 3552-59 (1969) e adoptada em 37 CFR §1.822(b)(2), as abreviaturas para resíduos de aminoácidos são apresentadas na seguinte Tabela de Correspondência:

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

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

Deve ser referido que todas as sequências de resíduos de aminoácidos são aqui representadas por fórmulas cuja orientação esquerda e direita está na direcção convencional de terminal amino para terminal carboxilo. Adicionalmente, a frase "resíduo

de aminoácido” está largamente definida para incluir aminoácidos modificados e pouco comuns, tais como os listados em 37 CFR §1.822(b)(4). Além disso, deve ser referido que um traço no início ou no fim de uma sequência de resíduos de aminoácidos indica ou uma ligação peptídica com outra sequência de um ou mais resíduos de aminoácidos ou uma ligação covalente com um grupo terminal carboxilo ou hidroxilo.

Proteína C Activada: A Proteína C Activada refere-se a Proteína C que é clivada proteoliticamente por trombina, para produzir uma proteína C activada (APC) que inactiva Factores de coagulação Va e VIIa, inibindo assim a coagulação.

Anticorpo: O termo anticorpo nas suas várias formas gramaticais é aqui utilizado para se referir a moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, i. e., moléculas que contêm um sítio de combinação do anticorpo ou paratopo. Moléculas de anticorpo exemplificativos são moléculas de imunoglobulinas intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e porções de uma molécula de imunoglobulina, incluindo as porções conhecidas na técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v).

Sítio de Combinação do Anticorpo: Um sítio de combinação do anticorpo é a porção estrutural de uma molécula de anticorpo compreendida de regiões variáveis e hipervariáveis de uma cadeia pesada e uma leve, que se ligam especificamente a (imunorreagem com) um antigénio. O termo imunorreage, nas suas várias formas, significa ligação específica entre uma molécula contendo um determinante antigénico e uma molécula contendo um sítio de combinação de anticorpo, tal como uma molécula de anticorpo como um todo ou uma porção desta.

Factor V: Factor V é uma proteína de elevado peso molecular que, quando activada pela trombina, pode acelerar a conversão de pró-trombina em trombina pelo Factor Xa, que promove a coagulação. O factor Va activado é inactivado pela Proteína C activada, para inibir o processo de coagulação.

Factor VIII: O factor VIII é denominado o factor anti-hemofílico na coagulação do sangue, é uma proteína de elevado peso molecular envolvida na activação do Factor X, em concertação com o Factor Xa. O Factor VIIa activado é inactivado pela Proteína C activada para inibir o processo de coagulação.

Factor X: O factor X é um zimogénio de uma protease serínica que possui um peso molecular de 55000. Quando activado, o factor Xa, em concertação com o Factor Xa causa a conversão de pró-trombina em trombina que promove a coagulação.

Anticorpo Monoclonal: A frase anticorpo monoclonal, nas suas várias formas gramaticais, refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contêm apenas uma espécie de sítio de combinação de anticorpo capaz de imunorreagir com um antigénio particular. Assim, um anticorpo monoclonal apresenta, tipicamente, uma afinidade de ligação única para qualquer antigénio com o qual imunorreage. Um anticorpo monoclonal pode, por isso, conter uma molécula de anticorpo possuindo uma pluralidade de sítios de combinação de anticorpo, cada um imuno específico para um antigénio diferente, e. g., um anticorpo monoclonal biespecífico.

Polipéptido e Péptido: Polipéptido e péptido são termos aqui utilizados indistintamente para designar uma série linear de resíduos de aminoácidos ligados um ao outro por ligações peptídicas entre os grupos alfa-amino e carboxilo de resíduos adjacentes.

Proteína C: Proteína C (PC) é um zimogénio de protease serínica dependente da vitamina K e partilha uma homologia de sequência com outras proteases serínicas dependentes da vitamina K conhecidas. Na presença de trombomodulina e trombina da célula endotelial, a Proteína C é activada numa protease serínica, APC, e torna-se num inibidor potente da coagulação do sangue, por inactivação do Factor Va e do Factor VIIa.

Proteína S: A Proteína S (PS) é uma proteína do plasma dependente da vitamina K, que serve como co-factor para a Proteína C activada, na inactivação dos Factores Va e VIIa,

Proteases Serínicas: As proteases serínicas são uma família de enzimas que clivam proteínas (proteolíticas) das quais a Proteína C activada é um membro.

Péptido Sintético: Péptido sintético refere-se a uma cadeia, produzida quimicamente, de resíduos de aminoácidos ligados em conjunto por ligações peptídicas, que é livre de proteínas que ocorram naturalmente e fragmentos destas.

B. Polipéptidos

Como aqui utilizado a frase "polipéptido de PS" refere-se a um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de

aminoácidos que compreende uma sequência de resíduos de aminoácidos que corresponde, e é, de um modo preferido, idêntica, a uma porção de uma molécula da proteína S. A sequência de resíduos de aminoácidos da proteína de proteína S madura está listada como SEQ ID N° 1 na listagem de sequências. Um polipéptido de PS da presente invenção possui a capacidade de inibir a ligação da proteína S (PS) à proteína de ligação C4b (C4BP).

Deste modo, a invenção proporciona um polipéptido da proteína S, possuindo um comprimento não superior a 100 resíduos de aminoácidos, e incluindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, a SEQ ID N°, e os resíduos correspondentes que são apresentados em parêntesis, representados por uma fórmula seleccionada a partir de:

-QEKQNKH- e (1:427-433)

-SGIKKIIQEK-, (12:1-10)

e em que o referido polipéptido inibe a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b.

A SEQ ID N° e resíduos correspondentes de uma sequência de resíduos de aminoácidos descrita estão aqui convenientemente descritos entre parêntesis, em que o primeiro número representa a SEQ ID N° e o intervalo a seguir aos dois pontos representa os números dos resíduos dos resíduos de aminoácidos indicados na Listagem de Sequências. Por exemplo, "(1:423-427)" refere-se à sequência KEIIQ apresentada na SEQ ID N° 1, do resíduo 423 ao resíduo 427.

Numa forma de realização relacionada, a invenção proporciona um polipéptido de PS possuindo um comprimento não superior a cerca de 100 resíduos de aminoácidos, que inclui uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula:

-SGIKKIIQEKQNKC- (12:1-14). Nesta forma de realização, um polipéptido exemplificativo e preferido possui uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula SGIKKIIQEKQNKC (12:1-14). Este péptido de PS foi sintetizado sem os resíduos de histidina (H) normalmente presente na proteína S nativa no resíduo de aminoácido na posição 433 que corresponde ao resíduo de aminoácido na posição entre 13 e 14 na SEQ ID N° 12.

Numa outra forma de realização, a invenção proporciona um polipéptido de PS possuindo um comprimento não superior a cerca de 100 resíduos de aminoácido, que inclui uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula: -QEKQNKHX- (1:427-434) em que X é C ou S. Nesta forma de realização, um polipéptido exemplificativo e preferido possui uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula QEKQNKHS (2:8-15).

Para informação, são apresentados na Tabela 1 outros polipéptidos de PS, e as respectivas posições de resíduos de aminoácidos de PS.

Tabela 1

Designação do Polipéptido	Sequência de Resíduo Aminoácido ¹	SEQ ID N°
Amino		
PSP-12	SGIKEIIQEKKQNKHC	(1:420-434)
PSP-12*	SGTKEIIQEKKQNKHS	(2:1-15/420-434)
PSP-12b*	SGVKEIIQEKKQNKHS	(3:1-15/420-434)
PSP-428*	KEIIQEKKQNKHS	(2:4-15/423-434)
PSP-430*	QEKKQNKHS	(2:8-15/427-434)
PSP-425	GASGIKEIIQEKKQNK	(1:418-432)
PSP-420	NLMKQGASGIKEIIQ	(1:413-427)
PSP-424	GIKEIIQ	(1:421-427)
PSP-417A	QGASGIKE	(1:417-424)
PSP-417 PSP-	NLMKQGASGI	(1:413-422)
417B	NLMKQGASGIKE	(1:413-424)
PSP-11	CIRSWNLMKQGASGI	(1:408-422)
PSP-418*	DIRSWNLMKQGASGI	(4:1-15/408-422)
PSP-415*	DIRSWNLMKQG	(4:408-418)
PSP-347	VEELEHSISIKIAKE	(1:347-361)
PSP-32	ENDPETDYFYPKYLV	(1:32-46)
PSP-7	CPEGYRYNLKSKSC	(1:187-200)
PSP-16*	SPEGYRYNLKSKSSE	(5:1-15/187-201)
PSP-13*	INGVQLDLDEAISK	(6:1-15/603-616)
PSP-14*	RAHSCPSVWKKTKNC	(7:1-15/621-635)
PSP-621	RAHSCPS	(1:621-627)
PSP-20*REV	SNKTKKWVSPSSHAR	(8:1-15/635-621)
PSP-54	GLFTAARQSTNAYP	(1:54-67)
PSP-561	RQLAVLDKAHKAKV	(1:561-574)
PSP-605	GVQLDLDEAI	(1:605-614)
PSP-ansa	CIRSWNLMKQGASIKEIIQEKKQNKHC	(11:1-26/408-420,
PSP-424K*	SQIKKIIQEKKQNK	(12:1-14/420-432,
PSP-428K*	SGIKEIIQKKQNK	(13:1-14/420-432,

¹ Um resíduo de aminoácido sublinhado e o asterisco junto à designação do polipéptido indicam ambos uma substituição

relativa à sequência de resíduos de aminoácidos da PS nativa. A sequência de resíduos de aminoácidos do polipéptido é apresentada juntamente com parêntesis indicando o SEQ ID N° e designação do número de resíduos de aminoácidos. Para as sequências de aminoácidos designadas como SEQ ID N° 1, a coluna de número de resíduos indica os números da posição da sequência peptídica. Para péptidos com SEQ ID N^{os} 2-8, 11-13, o primeiro intervalo após os dois pontos indica a designação do número do resíduo de aminoácido tal como aparece na Listagem de Sequências. O segundo intervalo a seguir à barra com inclinação para a direita indica a posição de resíduo amino correspondente às posições relativas na sequência da PS nativa em SEQ ID N° 1.

Devido à estrutura tridimensional de uma molécula de proteína S nativa enrolada, foi determinado na presente invenção que regiões múltiplas da proteína S estão envolvidas no contacto com C4BP quando se forma um complexo PS:C4BP, cujas várias e múltiplas regiões estão definidas pelos vários polipéptidos de PS acima descritos. A capacidade dos polipéptidos PS acima descritos para inibir a ligação de PS a C4BP é apresentada nos Exemplos que se incluem.

Assim, noutra forma de realização, a invenção contempla composições de polipéptidos de PS que compreendem um ou mais dos diferentes polipéptidos de PS acima descritos, misturados em combinações para proporcionar inibição simultânea de sítios de contacto múltiplos formados num complexo PS:C4BP.

De um modo preferido, um polipéptido de PS desta invenção é ainda caracterizado pela sua capacidade de mimetizar imunologicamente um epitopo (determinante antigénico) expresso

por PS. Tal polipéptido é aqui útil como um componente num inóculo para produzir anticorpos que imunorreagem com a proteína PS nativa, e de um modo preferido, imunorreagem com PS livre.

Como aqui utilizada, a frase "mimetizar imunologicamente", nas suas várias formas gramaticais, refere-se à capacidade de um polipéptido de PS desta invenção imunorreagir com um anticorpo da presente invenção, que reconhece um epitopo nativo conservado de PS, como aqui definido.

Deve ser compreendido que um determinado polipéptido não tem que ser idêntico à sequência de resíduos de aminoácidos de PS, desde que inclua a sequência requerida e seja capaz de inibir a ligação de PS a C4BP, como aqui descrito.

Um determinado polipéptido inclui qualquer análogo, fragmento ou derivado químico de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácidos é aqui apresentada, desde que o polipéptido seja capaz de inibir a ligação da proteína S a C4BP. Deste modo, um destes polipéptidos pode ser sujeito a várias alterações, substituições, inserções e deleções, em que tais alterações proporcionam certas vantagens para a sua utilização. Nesse sentido, um polipéptido de PS desta invenção corresponde à, em vez de é idêntico a, sequência da proteína S em que uma ou mais alterações foram feitas e retém a capacidade de inibir a ligação da proteína S a C4BP, em um ou mais dos ensaios como aqui definidos, para a determinação da inibição da formação do complexo PS:C4BP.

O termo "análogo" inclui qualquer polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos substancialmente idêntica a uma sequência especificamente aqui apresentada, em que um ou

mais resíduos foram conservadoramente substituídos por um resíduo de funcionalidade semelhante e que apresenta a capacidade para formação de complexo PS:C4BP como aqui descrito. Exemplos de substituições conservadas incluem a substituição de um resíduo não-polar (hidrofóbico) tal como a isoleucina, valina, leucina ou metionina, por outro, a substituição de um resíduo polar (hidrofílico), por outro, tal como entre arginina e lisina, entre glutamina e asparagina, entre glicina e serina, a substituição de um resíduo básico como a lisina, arginina ou histidina por outro, ou a substituição de um resíduo ácido, tal como o ácido aspártico ou o ácido glutâmico por outro. Substituições exemplificativas podem ser observadas em vários dos polipéptidos de PS inibidores aqui descritos, possuindo sequências que não são idênticas à sequência de PS nativa.

A frase "substituição conservadora" inclui também a utilização de um resíduo derivado quimicamente em vez de um resíduo não derivado, desde que tal polipéptido apresente a actividade de ligação requerida.

"Derivado químico" refere-se a um determinado polipéptido possuindo um ou mais resíduos derivados quimicamente por reacção de um grupo lateral funcional. Tais moléculas derivadas incluem por exemplo, as moléculas nas quais foram derivados grupos amino livres para formar cloridratos de amina, grupos p-toluenossulfonilo, grupos carbobenzoxilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo ou grupos formilo. Grupos carboxilo livres podem ser derivados para formar sais, ésteres de metilo ou etilo, ou outros tipos de ésteres ou hidrazidas. Grupos hidroxilo livres podem ser derivados para formar derivados O-acilo ou O-alquilo. O azoto do imidazol da histidina pode ser derivado para formar N-im-benzil-histidina.

Também estão incluídos como derivados químicos os péptidos que contêm um ou mais aminoácidos derivados que ocorrem naturalmente dos vinte aminoácidos padrão. Por exemplo: 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; 3-metil-histidina pode ser substituída por histidina; homo-serina pode ser substituída por serina; e ornitina pode ser substituída por lisina. Os polipéptidos da presente invenção incluem também qualquer polipéptido possuindo uma ou mais adições e/ou deleções ou resíduos relacionados com a sequência de um polipéptido cuja sequência é aqui apresentada, desde que a actividade requisitada seja mantida.

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

Quando um polipéptido da presente invenção possui uma sequência que não é idêntica à sequência de PS, é tipicamente porque foram feitas uma ou mais substituições conservadoras ou não conservadoras, normalmente foram substituídos não mais do que 30 por cento em número, mais habitualmente não mais do que 20 por cento em número, e de um modo preferido não mais do que 10 por cento em número dos resíduos de aminoácidos. Os resíduos adicionais podem também ser adicionados em qualquer das extremidades com o propósito de proporcionar um "ligante" através do qual os polipéptidos desta invenção podem ser convenientemente fixados a um marcador ou matriz sólida, ou veículo. De um modo preferido, os resíduos do ligante não formam epítopos de PS, *i. e.* não são semelhantes à estrutura de PS.

Marcadores, matrizes sólidas e veículos que podem ser utilizados com os polipéptidos desta invenção são descritos abaixo.

Os resíduos de aminoácidos dos ligantes são habitualmente pelo menos um resíduo e podem ser 40 ou mais resíduos, mais frequentemente 1 a 10 resíduos, mas não formam epitopos de PS. Resíduos de aminoácido típicos utilizados para a ligação são a tirosina, cisteína, lisina, ácidos glutâmico e aspártico, ou semelhantes. Adicionalmente, um determinado polipéptido pode diferir, a menos que especificado em contrário, da sequência natural de PS pela sequência que foi modificada por acilação da extremidade NH₂ e. g., acetilação, ou amidação com ácido tioglicólico, por carboxilamidação da extremidade, e. g., com amónia, metilamina e semelhantes.

Quando acoplados a um veículo para formar o que é conhecido na técnica como um conjugado veículo-hapteno, um polipéptido de PS da presente invenção, é capaz de induzir anticorpos que imunorreagem com PS. Com vista ao princípio bem estabelecido da reactividade imunológica cruzada, a presente invenção contempla deste modo variantes antigenicamente relacionadas dos polipéptidos apresentados na Tabela 1. Uma "variante antigenicamente relacionada" é um determinado polipéptido que é capaz de induzir moléculas de anticorpo que imunorreagem com um polipéptido da Tabela 1 e com PS.

Qualquer péptido da presente invenção pode ser utilizado na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Ácidos adequados capazes de formar sais com os péptidos da presente invenção incluem ácidos inorgânicos, tais como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociânico,

ácido sulfúrico, ácido acético fosfórico, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinâmico, ácido naftalenossulfónico, ácido sulfanílico, ou semelhantes.

Bases adequadas capazes de formar sais com os péptidos da presente invenção incluem bases inorgânicas tais como hidróxido de sódio, hidróxido de amónio, hidróxido de potássio e semelhantes; e bases orgânicas tais como mono-, di- e tri-alquilo e arilaminas (e. g., trietilamina, diisopropilamina, metilamina, dimetilamina e semelhantes) e etanolaminas opcionalmente substituídas (e. g. etanolamina, dietanolamina e semelhantes).

Um polipéptido de PS da presente invenção, também aqui referido como um determinado polipéptido, pode ser sintetizado por qualquer das técnicas que são conhecidas dos técnicos da especialidade dos polipéptidos, incluindo técnicas de ADN recombinante. Técnicas de química sintética, tais como uma síntese de fase-sólida do tipo Merrifield, são preferidas por razões de pureza, especificidade antigénica, ausência de produtos colaterais indesejáveis, facilidade de produção e semelhantes. Um sumário excelente das muitas técnicas disponíveis pode ser encontrado em J.M. Steward e J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., São Francisco, 1969; M. Bodanszky, *et al.*, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Segunda Edição, 1976 e J. Melenhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol 2, p. 46, Academic Press (Nova Iorque), 1983 para síntese de péptidos em fase sólida, e E. Schroder e K. Kubke, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965 para síntese clássica em solução. Os grupos

protectores apropriados utilizáveis neste tipo de síntese são descritos nos textos acima e em J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry" Plenum Press, Nova Iorque, 1973.

Geralmente, os métodos de síntese em fase sólida contemplados compreendem a adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácidos ou resíduos de aminoácidos adequadamente protegidos, a uma cadeia peptídica crescente. Normalmente, tanto o grupo amino como o carboxílico do primeiro resíduo de aminoácido estão protegidos por um grupo protector adequado, removível selectivamente. É utilizado um grupo protector selectivamente removível diferente para aminoácidos contendo um grupo lateral reactivo tal como a lisina.

Utilizando uma síntese de fase sólida como exemplo, o aminoácido protegido ou derivado é ligado a um suporte sólido inerte através do seu grupo carboxilo ou amino desprotegido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é então removido selectivamente e o aminoácido seguinte na sequência possuindo o grupo (amino ou carboxilo) complementar adequadamente protegido é administrado e feito reagir em condições adequadas para formar uma ligação amida com o resíduo já ligado ao suporte sólido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é então removido deste resíduo de aminoácido recentemente adicionado, e o aminoácido seguinte (adequadamente protegido) é então adicionado, e assim por diante. Após todos os aminoácidos terem sido ligados na sequência correcta, qualquer terminal residual e grupos protectores dos grupos laterais (e o suporte sólido) são removidos sequencialmente ou simultaneamente, para obter o polipéptido final.

Pode ser utilizado um polipéptido de PS, *inter alia* nos métodos de diagnóstico e sistemas da presente invenção, para detectar PS presente numa amostra corporal, ou pode ser utilizado para preparar um inóculo como aqui descrito para a preparação de anticorpos que imunorreagem com epitopos conservados em PS.

Pode ser utilizado um polipéptido de PS, *inter alia*, nos métodos e sistemas de diagnóstico da presente invenção para detectar PS presente numa amostra corporal, ou pode ser utilizado para preparar um inoculo como aqui descrito para a preparação de anticorpos que imunorreagem com epitopos conservados na PS.

Adicionalmente, um polipéptido de PS desta invenção pode ser utilizado na preparação de um medicamento para o tratamento de trombose.

C. Anticorpos e Anticorpos Monoclonais

O termo "anticorpo" nas suas várias formas gramaticais, é aqui utilizado como um substantivo colectivo que se refere a uma população de moléculas de imunoglobulina e/ou porções imunologicamente activas, *i. e.*, moléculas que contêm um sítio de combinação de anticorpo ou paratopo.

Um "sítio de combinação de anticorpo" é aquela porção estrutural de uma molécula de anticorpo que compreende regiões variável e hipervariável de cadeia leve e pesada, que se ligam especificamente ao antigénio.

A frase "molécula de anticorpo" nas suas próprias formas gramaticais, como aqui utilizada, contempla tanto uma molécula de imunoglobulina intacta como uma porção imunologicamente activa de uma molécula de imunoglobulina.

Moléculas de anticorpo exemplificativas para utilização nos métodos de diagnóstico e sistemas da presente invenção são moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e aquelas porções de uma molécula de imunoglobulina que contêm o paratopo, incluindo aquelas porções conhecidas na técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v).

As porções de anticorpos Fab e F(ab')₂ são preparadas por reacção proteolítica da papaína e pepsina, respectivamente, em anticorpos substancialmente intactos, por métodos que são bem conhecidos. Ver por exemplo Patente U.S. N° 4 342 566 de Theofilopolous e Dixon. As porções Fab' dos anticorpos são também bem conhecidas e são produzidas a partir das porções F(ab')₂ seguidas de redução das pontes persulfureto que ligam as porções das duas cadeias pesadas com mercaptoetanol, e seguidas de alquilação da proteína mercaptano resultante com um reagente tal como iodoacetamida. Um anticorpo, contendo moléculas de anticorpo intactas são, preferidas, e são aqui utilizados como ilustrativos. Deste modo, a invenção proporciona um anticorpo que inibe a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b e que imunorreage com:

a) proteína S, e

b) um polipéptido de PS possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, a SEQ ID N° e os resíduos correspondentes que são apresentados em parêntesis, representado pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

mas não imunorreage com o polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula:

CTCKPGWQGEKCEFDINECKDPSNINGGCS (1:103-131).

Por "substancialmente livre" entende-se que as moléculas de anticorpo não imunorreagem com o antigénio referido a níveis de uma ordem de grandeza, e de um modo preferido com duas ordens de grandeza, do nível de imunorreacção com uma espécie de antigénios que se sabe imunorreagir com a molécula do anticorpo, quando a imunorreacção é expressa como uma constante de equilíbrio entre antigénio ligado (imunorreagido) e não ligado.

Baseado nos ensinamentos aqui citados, foi verificado que as moléculas de anticorpo que imunorreagem com um polipéptido de PS da presente invenção possuem a capacidade de imunorreagir com um sítio de PS que não está acessível para imunorreacção quando PS está complexado com C4BP. Assim, as moléculas de anticorpo desta invenção não imunorreagem com PS:C4BP mas ligam-se a PS_F.

Um anticorpo anti-PS que imunorreage com PS mas não imunorreage com PS num complexo PS:C4BP é aqui referido como imunorreagindo com "PS livre", também aqui referido como PS_F. Tal anticorpo é também aqui referido como um anticorpo anti-PS_F, um

anticorpo que imunorreage com PS_F, e como um anticorpo que é imuno específico para PS_F, i. e., não se liga ao complexo PS: C4BP. Tal anticorpo é particularmente útil, como se divulga a seguir, para utilização em ensaios de diagnóstico para medir PS_F numa amostra de fluido.

Adicionalmente, um anticorpo anti-PS preferido imuno específico para PS_F possui a capacidade de inibir a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b.

A imunorreatividade de anticorpo com antigénios contidos em PS pode ser medida através de uma variedade de ensaios imunológicos conhecidos na técnica. A imunorreacção exemplificativa de um anticorpo anti-PS com um polipéptido de PS é descrita no Exemplo 2. A ligação directa com PS isolado (preparado como descrito no Exemplo 2c), e com polipéptidos de PS pode ser ensaiada, pelo menos, pelos métodos descritos no Exemplo 2.

Um anticorpo da presente invenção é, tipicamente, produzido por imunização de um mamífero com um inóculo contendo um polipéptido de PS desta invenção e assim induzindo no mamífero moléculas de anticorpo possuindo imuno especificidade para polipéptido de PS imunizado. As moléculas de anticorpo são então recolhidas do mamífero e isoladas até ao ponto desejado por técnicas bem conhecidas, tais como, por exemplo, utilizando DEAE Sephadex para obter a fracção IgG. Métodos de preparação de anticorpos exemplificativos utilizando polipéptidos PS no imunogénio são aqui descritos no Exemplo 2.

A preparação de anticorpos contra polipéptidos é bem conhecida na técnica. [Ver Staudt et al., *J. Exp. Med.*, **157**:

687-704 (1983)]. Resumidamente, para produzir uma composição de anticorpo péptido desta invenção, um mamífero de laboratório é inoculado com uma quantidade imunologicamente eficaz de um polipéptido de PS, tipicamente como presente numa vacina da presente invenção. As moléculas de anticorpo anti-polipéptido de PS assim induzidas são então recolhidas do mamífero e aquelas que são imuno-específicas tanto para o polipéptido de PS como para PS isolada, são isoladas até ao ponto desejado por técnicas bem conhecidas tais como, por exemplo, por cromatografia de imunoafinidade.

Para aumentar a especificidade do anticorpo, os anticorpos são de um modo preferido purificados por cromatografia de imunoafinidade utilizando polipéptidos imunizadores pré-fixos em fase sólida. O anticorpo é colocado em contacto com o polipéptido imunizador pré-fixo em fase sólida durante um período de tempo suficiente para o polipéptido imunorreagir com as moléculas de anticorpo para formar um imunocomplexo fixo em fase sólida. Os anticorpos ligados são separados do complexo por técnicas padrão. Métodos de purificação por imunoafinidade exemplificativos para produzir um anticorpo anti-PS desta invenção purificado por imunoafinidade são descritos no Exemplo 3.

A palavra "inóculo" nas suas várias formas gramaticais é aqui utilizada para descrever uma composição contendo um polipéptido de PS desta invenção como um ingrediente activo utilizado para a preparação de anticorpos contra um polipéptido de PS. Quando um polipéptido é utilizado num inóculo para induzir anticorpos, deve ser entendido que o polipéptido pode ser utilizado em várias formas de realização, e. g., isoladamente ou ligado a um veículo como um conjugado ou como um

polímero polipeptídico. Contudo, para facilidade de expressão e no contexto de um inoculo de polipéptido, as várias formas de realização dos polipéptidos desta invenção são aqui colectivamente referidas pelo termo "polipéptido" e pelas suas várias formas gramaticais.

Para um polipéptido que contém menos do que cerca de 35 resíduos de aminoácidos, é preferível utilizar o péptido ligado a um veículo com o objectivo de induzir a produção de anticorpos.

Podem ser adicionados um ou mais resíduos de aminoácidos adicionais às extremidades amino- ou carboxi- do polipéptido para auxiliar na ligação do polipéptido ao veículo. Verificou-se que resíduos de cisteína adicionados às extremidades amino- ou carboxi- do polipéptido são particularmente úteis para formar conjugados por meio de ligações persulfureto. Contudo, podem também ser utilizados outros métodos bem conhecidos na técnica de preparação de conjugados.

São particularmente aplicáveis as técnicas de conjugação de polipéptidos ou acoplamento através de grupos funcionais activados presentemente conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Aurameas, *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, Vol. **8**, Supl. 7:7-23 (1978) e Patente U.S. N°. 4493795, N°. 3791932 e N°. 3839153. Adicionalmente, pode ser realizada uma reacção de acoplamento dirigida ao local, de modo a que possa ser minimizada qualquer perda de actividade devido à orientação do polipéptido após acoplamento. Ver, por exemplo, Rodwell *et al.*, *Biotech.*, 3: 889-894 (1985), e Patente U.S. N° 4671958.

Processos de ligação adicionais exemplificativos incluem a utilização de produtos de reacção de adição de Michael, dialdeídos tais como glutaraldeído, Klipstein *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 147:318-326 (1983) e semelhantes, ou a utilização de tecnologia de carbodiimida como na utilização de uma carbodiimida solúvel em água para formar ligações de amida ao veículo. Alternativamente, o ligante cruzado heterobifuncional SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato pode ser utilizado para conjugar péptidos, nos quais tenha sido introduzida uma cisteína na extremidade carboxilo.

Veículos úteis são bem conhecidos na técnica e são geralmente eles próprios proteínas. Exemplos de tais veículos são hemocianina de lapa (KLH), edestina, tiroglobulina, albuminas, tais como albumina de soro bovino (BSA) ou albumina de soro humano (HSA), células vermelhas do sangue tais como eritrócitos de carneiro (SRBC), toxóide do tétano, toxóide da cólera bem como ácidos poliaminados tais como ácido poli D-lisina:D-glutâmico, e semelhantes.

A escolha do veículo é mais dependente da utilização final do inóculo e é baseada em critérios não particularmente envolvidos na presente invenção. Por exemplo, deve ser seleccionado um veículo que não provoque uma reacção inconveniente no animal a ser inoculado em particular.

O presente inóculo contém uma quantidade imunogénica eficaz de um polipéptido desta invenção, tipicamente como um conjugado ligado a um veículo. A quantidade eficaz de polipéptido por unidade de dose, que é suficiente para induzir uma resposta imune ao polipéptido imunizador depende, entre outras coisas, da espécie do animal inoculado, do peso corporal do animal e do

regime de inoculação escolhido, é bem conhecida na técnica. Os inóculos contêm tipicamente concentrações de polipéptido de cerca de 10 microgramas (μg) até cerca de 500 miligramas (mg) por inoculação (dose), de um modo preferido cerca de 50 microgramas até cerca de 50 miligramas por dose.

O termo "unidade de dose", no que respeita aos inóculos, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para animais, cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de material activo calculado para produzir o efeito imunogénico desejado, em associação com o diluente requerido; *i. e.*, veículo ou veículo. As especificações para a nova unidade de dose de um inóculo desta invenção são ditadas por, e são directamente dependentes de, (a) as características únicas do material activo e o efeito imunológico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica da composição de tal material activo para utilização imunológica em animais, como revelado aqui em pormenor, sendo estas características da presente invenção.

Os inóculos são tipicamente preparados a partir do polipéptido-conjugado sólido seco por dispersão do polipéptido conjugado num diluente fisiologicamente tolerável (aceitável) tal como a água, salino ou soro fisiológico tamponado com fosfato, para formar uma composição aquosa.

Os inóculos podem também incluir um adjuvante como parte do diluente. Adjuvantes tais como adjuvante de Freund completo (CFA), adjuvante de Freund incompleto (IFA) e alúmen, são materiais bem conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis a partir de várias fontes.

O anticorpo assim produzido pode ser utilizado, *inter alia* nos métodos e sistemas de diagnóstico da presente invenção para detectar PS livre (PS não ligada a C4BP) presente numa amostra tal como uma amostra de fluido corporal. Ver, por exemplo, os métodos descritos, pelo menos, no Exemplo 6. Os anticorpos Anti-PS que inibem a ligação da proteína S a C4BP podem também ser utilizados *in vivo* em métodos terapêuticos como um anticoagulante e antitrombótico. Ensaios para medir a capacidade para inibir a ligação de PS a C4BP são descritos no Exemplo 5.

Um anticorpo anti-PS preferido é um anticorpo monoclonal e é aqui utilizado como exemplo de um anticorpo anti-PS.

A frase "anticorpo monoclonal" nas suas várias formas gramaticais refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie de sítio de combinação do anticorpo capaz de imunorreagir com um epitopo particular. Um anticorpo monoclonal apresenta assim, tipicamente, uma única afinidade de ligação para qualquer epitopo com o qual ele imunorreage. Um anticorpo monoclonal pode, por isso, conter uma molécula de anticorpo possuindo uma pluralidade de sítios de combinação do anticorpo, cada um imuno específico para um diferente epitopo, *e. g.*, um anticorpo monoclonal biespecífico.

Um anticorpo monoclonal desta invenção compreende moléculas de anticorpo que inibem a ligação da proteína S à proteína de ligação C4B, como aqui descrito. Um anticorpo monoclonal desta invenção é ainda caracterizado como sendo capaz de imunorreagir com 1) proteína S isolada, e 2) um polipéptido de PS da presente invenção como descrito para os anticorpos anti-PS desta invenção.

Um anticorpo monoclonal é, tipicamente, composto por anticorpos produzidos por clones de uma única célula designada hibridoma que segrega (produz) apenas um tipo de molécula de anticorpo. A célula de hibridoma é formada pela fusão de uma célula produtora de anticorpo e um mieloma ou outra linha celular de auto-perpetuação. A preparação de tais anticorpos foi primeiro descrita por Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495-497 (1975). Os sobrenadantes de hibridomas assim preparados podem ser pesquisados quanto à presença de moléculas de anticorpo que imunorreagem com um polipéptido de PS, ou quanto à inibição de ligação de PS a C4BP como aqui descrito adiante.

Resumidamente, para formar o hibridoma a partir do qual a composição de anticorpo monoclonal é produzida, um mieloma ou outra linha celular de auto-perpetuação é fundida com linfócitos obtidos a partir de baço de um mamífero hiperimunizado com um antigénio de PS, tal como está presente num polipéptido de PS desta invenção. A tecnologia de hibridoma induzido por polipéptido é descrita por Niman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 80:4949-4953 (1983).

É preferido que a linha celular de mieloma utilizada para preparar o hibridoma seja da mesma espécie dos linfócitos. Tipicamente, o mamífero preferido é o murganho da estirpe 129 GlX⁺. Mielomas de murganho adequados para utilização na presente invenção incluem as linhas celulares PSX63-Ag8.653, e Sp2/0-Ag14 sensíveis a hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), que estão disponíveis a partir da American Type Culture Collection, Rockville, MD, sob as designações CRL 1580 e CRL 1581, respectivamente.

Os esplenócitos são, tipicamente, fundidos com células de mieloma utilizando polietilenoglicol (PEG) 1500. Os híbridos fundidos são seleccionados através da sua sensibilidade ao HAT. Os hibridomas que produzem um anticorpo monoclonal desta invenção são identificados utilizando o ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) descrito no Exemplo 4.

Um anticorpo monoclonal da presente invenção também pode ser produzido iniciando uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio nutriente contendo um hibridoma que produz e segrega moléculas de anticorpo da especificidade ao polipéptido apropriado. A cultura é mantida em condições e durante um período de tempo suficientes para o hibridoma segregar as moléculas de anticorpo para o meio. O meio contendo anticorpo é então recolhido. As moléculas de anticorpo podem então ser posteriormente isoladas por técnicas bem conhecidas.

Os meios úteis para a preparação destas composições são ambos bem conhecidos na técnica e comercialmente disponíveis e incluem meios de cultura sintéticos, murganhos de autocruzamento e semelhantes. Um meio sintético exemplificativo é o Meio Mínimo Essencial de Dulbecco (DMEM; Dulbecco *et al.*, *Virology* 8:396 (1959)), suplementado com 4,5 g/L de glucose, glutamina a 20 mM e 20% de soro de feto de vitela. Uma estirpe exemplificativa de murganhos de autocruzamento é a Balb/c.

Outros métodos de produção de um anticorpo monoclonal, uma célula de hibridoma, ou uma cultura de células de hibridoma, são também bem conhecidos. Ver, por exemplo, o método de isolamento de anticorpos monoclonais a partir de um repertório imunológico como descrito por Sastry, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

86:5728-5732 (1989); e Huse et al., *Science*, 246:1275-1281 (1989).

Os anticorpos monoclonais desta invenção podem ser utilizados do mesmo modo que o aqui revelado para anticorpos da presente invenção.

Por exemplo, o anticorpo monoclonal pode ser utilizado nos métodos terapêuticos, de diagnóstico ou *in vitro* aqui revelados, nos quais é desejada a inibição da ligação da proteína S à proteína de ligação C4b.

É também contemplada por esta invenção a célula de hibridoma e culturas contendo uma célula de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal desta invenção.

Um destes anticorpos monoclonais é o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma LJS 56 (Mab 56), que imunorreage com PS_F e com o polipéptido de PS PSP-12 possuindo a sequência de resíduos de aminoácidos SGIKEIIQEKQNKHC (1:420-434). O hibridoma também imunorreage com o polipéptido de PS referido como PSP-ansa possuindo a sequência de resíduos de aminoácidos CIRSWNLMQGASIKEIIQEKQNKHC (11:1-26). O MAb 56 foi produzido como descrito no Exemplo 4 utilizando o polipéptido de PS PSP-12 como o imunogénio. Um segundo anticorpo monoclonal, funcionalmente equivalente ao MAb 56, foi isolado pelos mesmos métodos e é designado por MAb 418.

O hibridoma LJS 56 foi depositado de acordo com os requisitos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, em 26 de Junho de 1991, e foi-lhe atribuído o número de acesso HB 10818.

Outro anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma LJS S-7 (MAb S-7) imunorreage com PS quando presente num complexo PS:C4BP e é aqui utilizado como um anticorpo de captura que imunorreage com "PS" total, também referido como PS_T. Mas que foi produzido como descrito no Exemplo 6 utilizando PS como o imunogénio.

O hibridoma LJS S-7 foi depositado de acordo com os requisitos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, em 26 de Junho, 1991, e foi-lhe atribuído o número de acesso HB 10819.

Os hibridomas LJS 56 e LJS S-7 foram depositados num depositário que assegura a permanência do depósito e sua pronta acessibilidade ao público sob registo de uma patente, em condições que asseguram que o acesso aos hibridomas estará disponível durante o período em que o pedido de patente esteja pendente aos responsáveis do Comissário que esteja autorizado a tal acesso, e que todas as restrições em relação à disponibilidade ao público dos hibridomas depositados serão irrevogavelmente removidas após a consecção da patente. Os hibridomas depositados serão mantidos pela ATCC até ao termo da patente ou 30 anos após a data de depósito, aquele que durar mais tempo, e em qualquer dos casos durante, pelo menos, cinco anos após a data do último pedido de acesso.

D. Sistemas de Diagnóstico

A presente invenção também divulga um sistema de diagnóstico, de um modo preferido sob a forma de kit, para

ensaiar a presença de proteína S livre (PS_F) numa amostra de fluido, tal como sangue, plasma ou soro, em que é desejável detectar a presença, e de um modo preferido a quantidade, de PS_F numa amostra de acordo com os métodos de diagnóstico aqui descritos. O sistema de diagnóstico inclui, numa quantidade suficiente para realizar, pelo menos, um ensaio, um dado polipéptido de PS e/ou um dado anticorpo ou anticorpo monoclonal da presente invenção, como um reagente embalado separadamente. Sistemas de diagnóstico exemplificativos para detectar PS_F numa amostra corporal e utilizando um polipéptido de PS ou anticorpo desta invenção, são descritos no Exemplo 6.

Noutra forma de realização, um sistema de diagnóstico, de um modo preferido, na forma de kit, está contemplado para ensaiar a presença de um polipéptido de PS ou anticorpo anti-PS numa amostra de fluido corporal, tal como para monitorizar o destino de polipéptido de PS ou anticorpo anti-PS terapeuticamente administrados. O sistema inclui numa quantidade suficiente para, pelo menos, um ensaio, um dado polipéptido de PC e/ou um dado anticorpo como um reagente imunoquímico embalado separadamente.

Noutra forma de realização, está contemplado um sistema de diagnóstico, de um modo preferido, sob a forma de kit para ensaiar, de acordo com os métodos aqui apresentados, a presença de proteína de ligação C4b (C4BP) que é capaz de se ligar (competente para a ligação) a PS numa amostra de fluido corporal tal como sangue, plasma ou soro. Tal espécie de C4BP é aqui referida como C4BP competente. Tendo em consideração a presença de várias formas de C4BP em fluidos vasculares, algumas das quais não são capazes de se ligar a PS_F porque estão já complexadas com a PS ou porque representam espécies de C4BP incapazes de se ligar a PS, detectando a presença, e de um modo

preferido a quantidade, de C4BP competente num fluido vascular é desejável. O sistema inclui, numa quantidade suficiente para, pelo menos, um ensaio, um dado polipéptido de PC e/ou um dado anticorpo como um reagente imunoquímico embalado separadamente. Sistemas exemplificativos são descritos no Exemplo 7.

Instruções para utilização do(s) reagente(s) embalado(s) são também tipicamente incluídas.

Como aqui utilizado, o termo "embalagem" refere-se a uma matriz sólida ou material tal como vidro, plástico (e. g., polietileno, polipropileno ou policarbonato), papel, folha de alumínio e semelhantes, capazes de sustentar, dentro de limites fixos, um polipéptido, anticorpo policlonal ou anticorpo monoclonal da presente invenção. Assim, por exemplo, uma embalagem pode ser um frasco de vidro utilizado para conter quantidades de miligrama de um polipéptido ou anticorpo contemplado ou pode ser um poço de uma placa de microtitulação ao qual quantidades de micrograma de um polipéptido ou anticorpo contemplado foram fixadas operacionalmente, *i. e.*, ligadas de modo a serem capazes de serem imunologicamente ligadas por um anticorpo ou antigénio, respectivamente.

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

Um sistema de diagnóstico da presente invenção de um modo preferido também inclui um marcador ou meio de indicação capazes

de sinalizar a formação de um imunocomplexo contendo um polipéptido ou molécula de anticorpo da presente invenção.

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

Como aqui utilizado, os termos "marcador" e "meio de indicação", nas suas várias formas gramaticais, referem-se a átomos isolados e moléculas que estão directa ou indirectamente envolvidos na produção de um sinal detectável para indicar a presença de um complexo. Qualquer marcador ou meio de indicação pode ser ligado a, ou incorporado, numa proteína expressa, polipéptido, ou molécula de anticorpo que seja parte de um anticorpo ou composição de anticorpo monoclonal da presente invenção, ou utilizado separadamente, e esses átomos ou moléculas podem ser utilizados isoladamente ou em conjunção com reagentes adicionais. Tais marcadores são eles próprios bem conhecidos na química de diagnóstico clínico e constituem uma parte desta invenção apenas no que se refere ao facto de serem utilizados com métodos e/ou sistemas de novas proteínas.

O meio de marcação pode ser um agente de marcação fluorescente que se liga quimicamente a anticorpos ou antigénios sem os desnaturar, para formar um fluorocromo (corante) que é um pesquisador imunofluorescente útil. Agentes de marcação fluorescentes adequados são fluorocromos tais como isocianato de fluoresceína (FIC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonilo (DANSC) isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), lissamina, cloreto sulfonilo de rodamina 8200 (RB 200 SC) e semelhantes. Uma

descrição de técnicas de análise por imunofluorescência pode ser encontrada em DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", em Antibody As a Tool Marchalonis, et al., eds., John Wiley & Sons, Ltd., pp. 189-231 (1982).

Em formas de realização preferidas, o grupo indicador é uma enzima, como a peroxidase de rabanetes (HRP), glucose oxidase, ou semelhantes. Nesses casos em que o grupo indicador principal é uma enzima tal como a HRP ou a glucose oxidase, são necessários reagentes adicionais para visualizar o facto de que se formou um complexo receptor-ligando (imunorreagido). Tais reagentes adicionais para HRP incluem peróxido de hidrogénio e um precursor de corante de oxidação tal como diaminobenzidina. Um reagente adicional útil com a glucose oxidase é ácido 2,2'-amino-di-(3-etil-benzotiazolina-G-sulfónico) (ABTS).

Os elementos radioactivos são também agentes de marcação úteis e são aqui utilizados a título ilustrativo. Um agente de marcação radioactiva exemplificativo é um elemento radioactivo que produz emissões de raios gama. Elementos que emitem eles próprios raios gama, tais como ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{132}I e ^{51}Cr representam uma classe de grupos indicadores de elementos radioactivos que produzem emissão de raios gama. Particularmente preferido é ^{125}I . Outro grupo de meios de indicação úteis são aqueles elementos, tais como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N que emitem eles próprios positrões. Os positrões assim emitidos produzem raios gama ao encontrar electrões presentes no corpo dos animais. Também útil é um emissor beta, tal como ^{111}In ou ^3H .

A ligação de marcadores, i. e., marcação de polipéptidos e proteínas é bem conhecida na técnica. Por exemplo, as moléculas de anticorpo produzidas por um hibridoma podem ser marcadas por

incorporação metabólica de aminoácidos contendo radioisótopos fornecidos como um componente no meio de cultura. Ver, por exemplo, Galfre *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 73:3-46 (1981). As técnicas de conjugação de proteínas ou acoplamento através de grupos funcionais activados são particularmente aplicáveis. Ver, por exemplo, Aurameas, *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, Vol. 8 Supl. 7:7-23 (1978), Rodwell *et al.*, *Biotech.*, 3: 889-894 (1984) e Pat. U.S. N°. 4493795.

Os sistemas de diagnóstico podem também incluir, de um modo preferido, como uma embalagem separada, um agente de ligação específico. Um "agente de ligação específico" é uma entidade molecular capaz de ligar selectivamente uma espécie de reagente da presente invenção ou um complexo contendo tal espécie, mas não é ele próprio uma composição de molécula de polipéptido ou anticorpo da presente invenção. Os agentes de ligação específica exemplificativos são moléculas de segundo anticorpo, proteínas do complemento ou seus fragmentos, proteína A de *S. aureus*, e semelhantes. De um modo preferido, o agente de ligação específico liga a espécie de reagente quando essa espécie está presente como parte de um complexo.

Em formas de realização preferidas, o agente de ligação específico está marcado. Contudo, quando o sistema de diagnóstico inclui um agente de ligação específico que não está marcado, o agente é tipicamente utilizado como um meio de amplificação ou reagente. Nestas formas de realização, o agente de ligação específico marcado é capaz de ligar especificamente o meio de amplificação quando o meio de amplificação está ligado a um complexo contendo a espécie reagente.

Os kits de diagnóstico da presente invenção podem ser utilizados num formato de "ELISA" para detectar a quantidade de PS_F ou C4BP competente numa amostra de fluido vascular, tal como, sangue, soro ou plasma. "ELISA" refere-se a um ensaio de imunoadsorção ligado a enzima que emprega um anticorpo ou antigénio ligado a uma fase sólida e um conjugado de enzima-antigénio ou enzima-anticorpo para detectar e quantificar a quantidade de um antigénio presente numa amostra. Uma descrição da técnica de ELISA é encontrada no Capítulo 22 da 4^a Edição de *Basic and Clinical Immunology* de D.P. sites et al., publicado por Lange Medical Publications of Los Altos, CA em 1982 e nas Patentes U.S. N° 3654090; N° 3850752; e No° 4016043.

Deste modo, em algumas formas de realização, um polipéptido de PS, um anticorpo ou um anticorpo monoclonal da presente invenção podem ser fixos a uma matriz sólida para formar um suporte sólido que compreende uma embalagem nos sistemas de diagnóstico determinados.

Um reagente é, tipicamente, fixo a uma matriz sólida por adsorção a partir de um meio aquoso, embora possam ser utilizados outros métodos de fixação aplicáveis a proteínas e a polipéptidos, que são bem conhecidos dos técnicos da especialidade. Métodos de adsorção exemplificativos são aqui descritos.

Matrizes sólidas úteis são também bem conhecidas na técnica. Tais materiais são insolúveis em água e incluem o dextrano de ligação cruzada disponível sob a marca registada SEPHADEX da Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ); agarose, esferas de poliestireno, esferas de cerca de 1 micron (μ) até cerca de 5 milímetros (mm) de diâmetro, disponível em Abbott Laboratories

of North Chicago, IL; poli-(cloreto de vinilo), poliestireno, poliacrilamida de ligação cruzada, redes à base de nitrocelulose ou nylon tais como folhas, tiras ou espátulas, ou tubos, placas ou os poços de uma placa de microtitulação tais como as feitas de poliestireno ou poli-(cloreto de vinilo).

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

Os materiais de embalagem aqui discutidos em relação a sistemas de diagnóstico são aqueles normalmente utilizados em sistemas de diagnóstico.

E. Métodos de Ensaio

A presente invenção contempla vários métodos de ensaio para determinar a presença, e, de um modo preferido, a quantidade, de proteína S livre (PS_F) numa composição aquosa, tal como uma amostra de fluido biológico, utilizando um polipéptido, anticorpo policlonal ou anticorpo monoclonal desta invenção como um reagente imunoquímico para formar um produto de imunorreacção cuja quantidade se refere, directa ou indirectamente, à quantidade de PS_F na amostra.

Os especialistas na técnica entenderão que existem numerosos processos de química de diagnóstico clínico bem conhecidos, nos quais um reagente imunoquímico desta invenção pode ser utilizado para formar um produto de imunorreacção cuja quantidade se refere à quantidade de PS_F presente numa amostra corporal. Assim, embora sejam aqui descritos métodos de ensaio exemplificativos, a invenção não se limita a eles.

Vários protocolos heterogéneos e homogéneos, quer competitivos ou não competitivos, podem ser empregues na realização de um método de ensaio desta invenção.

1. Formatos de Imunoensaio de Captura

Por exemplo, uma forma de realização contempla um método para ensaiar a quantidade de PS_F em amostra de fluido corporal que utiliza um primeiro anticorpo de captura para capturar e imobilizar a PS na fase sólida e um segundo anticorpo indicador para indicar a presença do antígeno de PS capturado. Nesta forma de realização, um anticorpo imunorreage com PS_F para formar um complexo de imunorreacção PS_F -anticorpo, e o outro anticorpo é capaz de imunorreagir com PS enquanto que a PS está presente no complexo de imunorreacção PS_F -anticorpo. Esta forma de realização pode ser praticada em dois formatos com o anticorpo de captura imobilizado sendo qualquer dos anticorpos acima identificados, e o anticorpo indicador sendo o outro dos dois anticorpos.

a. Imunoensaio de Captura Utilizando Anticorpo Anti-PS_F
Imobilizado

Um imunoensaio de captura utilizando uma molécula de anticorpo anti-PS_F imobilizado para ensaiar a quantidade de PS livre numa amostra de fluido vascular compreende os passos de:

(a) Formar uma mistura de imunorreacção misturando uma amostra de fluido com um anticorpo anti-PS da presente invenção, de um modo preferido um anticorpo monoclonal. O anticorpo está presente como parte de um suporte sólido, *i.e.*, ligado operacionalmente a uma matriz sólida de modo a que a mistura de imunorreacção tenha tanto uma fase líquida como uma fase sólida, e o anticorpo funciona como um reagente de captura.

De um modo preferido, a amostra de fluido é uma amostra de fluido vascular tal como sangue, ou um produto derivado do sangue tal como soro ou plasma.

(b) A mistura de imunoreacção é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo pré-determinado tal como cerca de 10 minutos a cerca de 16-20 horas, a uma temperatura de cerca de 4 °C a cerca de 45 °C de modo que, este tempo seja suficiente para a PS presente na amostra imunorreagir com (ligar imunologicamente) o anticorpo na fase sólida para formar um produto de imunorreacção contendo PS_F (imunocomplexo).

As condições de ensaio biológico são as que mantêm a actividade biológica dos reagentes imunoquímicos desta invenção e da PS a ser ensaiada. Estas condições incluem uma

gama de temperatura de cerca de 4°C até cerca de 45°C, um valor de pH que varia entre cerca de 5 até cerca de 9 e uma força iónica variando desde a da água destilada até à de cloreto de sódio a cerca de um molar. Os métodos para otimizar tais condições são bem conhecidas na técnica.

(c) A quantidade de produto de imunorreacção contendo PS_F que se formou no passo (b) é determinada, determinando assim a quantidade de PS livre presente na amostra.

A determinação da quantidade de produto de imunorreacção, quer directa ou indirectamente, pode ser conseguida através de técnicas de ensaio bem conhecidas na técnica, e dependem tipicamente do tipo de meio de indicação utilizado.

De um modo preferido, a determinação do passo (c) compreende os passos de:

(i) misturar o produto de imunorreacção contendo a proteína S na fase sólida com um segundo anticorpo para formar uma segunda mistura de imunorreacção possuindo uma fase líquida e uma fase sólida, possuindo a referida segunda molécula de anticorpo a capacidade de imunorreagir com o produto de imunorreacção contendo PS_F .

Anticorpos úteis como o segundo anticorpo incluem preparações de anticorpo policlinal produzido contra a PS purificada que imunorreage com uma variedade de epitopos na molécula de PS, ou anticorpos monoclonais pesquisados em função da sua capacidade para ligar PS após imunorreacção com um anticorpo que é específico para PS_F , como aqui descrito. Tal anticorpo reage com PS quer esteja livre ou complexado com C4BP, e por isso é imuno específico para PS

total (PS_T). Moléculas de anticorpo anti- PS_T não inibem a ligação da proteína S a C4BP. Um anticorpo monoclonal exemplificativo e preferido que imunorreage com moléculas de PS quando imunocomplexadas com um anticorpo específico para PS_F é o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma LJS S-7 (MAb S-7).

(ii) manter a referida segunda mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para o referido segundo anticorpo formar um complexo com o produto de imunorreacção e formar um segundo produto de imunorreacção na fase sólida, e

(iii) determinar a quantidade de segundo anticorpo presente no segundo produto de imunorreacção e assim, a quantidade de produto de imunorreacção formado no passo (c).

Numa forma de realização, o segundo anticorpo é um anticorpo marcado de modo a que a marcação proporcione um meio de indicação para detectar a presença do segundo produto de imunorreacção formado. O marcador é medido no segundo produto de imunorreacção, indicando assim a presença, e de um modo preferido a quantidade, do segundo anticorpo na fase sólida.

Alternativamente, a quantidade de segundo anticorpo pode ser determinada pela preparação de uma mistura de reacção adicional possuindo um meio de indicação que reage especificamente (liga-se a) com o segundo anticorpo, como é bem conhecido. Exemplificativas são terceiras misturas de reacção com uma molécula de anticorpo anti-imunoglobulina marcada, específica para o segundo anticorpo. Após a terceira imunorreacção, o

terceiro produto de imunorreacção formado é detectado através da presença do marcador.

b. Imunoensaio de Captura Utilizando Anticorpo Anti-PS_T Imobilizado

Está também contemplado um método de imunoensaio de captura utilizando moléculas de anticorpo imobilizado anti-PS_T que está relacionado com o ensaio de captura anteriormente descrito. O ensaio para detectar PS_F compreende os passos de:

(a) Formar uma primeira mistura de imunorreacção misturando uma amostra de fluido vascular com um primeiro anticorpo anti-proteína S contendo moléculas de anticorpo que imunorreage com PS_T. O anticorpo anti-PS_T ligado operacionalmente a uma matriz sólida de modo a que a mistura da primeira imunorreacção possua tanto uma fase líquida como uma fase sólida. Um primeiro anticorpo preferido é o anticorpo monoclonal (MAb S-7) produzido pelo hibridoma LJS S-7.

(b) A mistura de imunorreacção é mantida durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo proteína S na fase sólida nas condições previamente descritas.

(c) Uma segunda mistura de imunorreacção é então formada misturando o produto de imunorreacção contendo a proteína S na fase sólida do passo (b) com moléculas de anticorpo contendo anticorpo anti-proteína S, imuno específicas para PS_F, i. e., anticorpos da presente invenção. Um segundo

anticorpo preferido exemplificativo é o anticorpo monoclonal (MAb 56) produzido pelo hibridoma LJS 56.

(d) A segunda mistura de imunorreacção é mantida durante um período de tempo suficiente para as moléculas de anticorpo específico para PS_F imunorreagirem com a proteína S na fase sólida e formarem um segundo produto de imunorreacção contendo proteína S na fase sólida.

(e) A presença, e, de um modo preferido, a quantidade de produto formado no passo (d) é então determinada, determinando assim a quantidade de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

A determinação da presença do segundo produto de imunorreacção pode estar de acordo com os métodos descritos acima para o imunoensaio de captura prévio.

Os imunoensaios de captura exemplificativos para detectar PS_F são descritos no Exemplo 6.

2. Formatos de Imunoensaio de Competição

Outra forma de realização para ensaiar a quantidade de PS_F numa amostra de fluido corporal utiliza a reacção de competição, na qual um polipéptido de PS ou uma molécula de anticorpo anti- PS_F desta invenção está presente na fase sólida como um reagente imunoquímico imobilizado, e o outro dos dois reagentes está presente em solução na fase líquida, na forma de um reagente marcado. Uma amostra de fluido é aí misturada para formar uma mistura de imunorreacção de competição, e a

quantidade de marcador resultante na fase sólida é proporcional, quer directa ou indirectamente, à quantidade de PS_F na amostra do fluido.

Assim, uma versão desta forma de realização compreende os passos de:

(a) Formar uma mistura de imunorreacção de competição misturando uma amostra de fluido vascular com:

(1) um anticorpo anti-proteína S de acordo com esta invenção contendo moléculas de anticorpo que imunorreagem com PS_F , estando o referido anticorpo operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo a que a mistura de imunorreacção de competição tenha uma fase líquida e uma fase sólida, e

(2) um polipéptido da presente invenção que é imunorreactivo com o anticorpo adicionado. O polipéptido misturado é operacionalmente ligado a um meio de indicação como aqui descrito.

(b) A mistura de imunorreacção de competição é então mantida durante um período de tempo suficiente para o polipéptido e a PS_F presente na fase líquida competirem para a imunorreacção com o anticorpo de fase sólida. Estas condições de imunorreacção estão previamente descritas e resultam na formação de um produto de imunorreacção contendo meio de indicação compreendendo o polipéptido marcado na fase sólida.

(c) A quantidade de meio de indicação presente no produto formado no passo (b) é então determinada, determinando assim a presença, e de um modo preferido, a quantidade, de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

A determinação dos meios de indicação na fase sólida é então conduzida pelos métodos convencionais aqui descritos.

As moléculas de anticorpo anti-PS_F exemplificativas para utilização na reacção de competição são as moléculas de anticorpo MAb 56. Também preferida e exemplificativa é a utilização de polipéptidos biotinilados como a seguir aqui descrito.

Outra versão desta forma de realização compreende os passos de:

(a) Formar uma mistura de imunorreacção de competição misturando uma amostra de fluido vascular com:

(1) um anticorpo anti-proteína S de acordo com a presente invenção contendo moléculas de anticorpo que imunorreagem com PS_F, e

(2) um polipéptido da presente invenção que é imunorreactivo com o anticorpo e está operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de imunorreacção de competição possui uma fase líquida e uma fase sólida. Um anticorpo exemplificativo é o anticorpo monoclonal MAb 56.

(b) A mistura de imunorreacção de competição é então mantida durante um período de tempo suficiente para qualquer PS livre no fluido vascular competir com as moléculas de anticorpo misturadas para a imunorreacção com os polipéptidos da fase sólida e formar um produto de imunorreacção contendo anticorpo na fase sólida.

(c) A quantidade de anticorpo presente no produto formado no passo (b) é então determinada, determinando assim a presença e/ou a quantidade de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

Em formas de realização preferidas, o anticorpo está operacionalmente ligado a um meio de indicação de modo que a determinação no passo (c) compreende a determinação da quantidade de meio presente no produto formado no passo (b). Um meio de indicação preferido é a biotinilação como aqui descrito.

De um modo preferido, a amostra de fluido vascular é fornecida à mistura de imunorreacção por competição como uma quantidade conhecida de sangue ou um produto derivado de sangue tal como soro ou plasma. São ainda preferidas as formas de realização em que a quantidade de reagente imunoquímico na fase líquida da mistura de imunorreacção é uma quantidade excessiva em relação à quantidade de reagente na fase sólida. Tipicamente, é estabelecido um conjunto paralelo de imunorreacções de competição utilizando uma quantidade conhecida de PS purificada numa diluição seriada de modo a que a curva padrão possa ser desenvolvida, como é bem conhecido. Deste modo, a quantidade de produto formado no passo (c), quando se utiliza uma amostra de fluido vascular é comparada com a curva padrão, determinando deste modo a quantidade de PS_F presente no fluido vascular.

Numa outra forma de realização, a presente invenção contempla um ensaio de reacção de competição que utiliza a interacção de ligação entre C4BP e um polipéptido de PS da presente invenção como a base para um ensaio de diagnóstico de PS_F numa amostra de fluido vascular. Esta forma de realização compreende os passos de:

(a) Formar uma mistura de reacção de competição por mistura de uma amostra de fluido vascular com:

(1) um suporte sólido tendo nele fixado C4BP de modo que a mistura de reacção de competição possua uma fase líquida e uma fase sólida; e

(2) um polipéptido de PS da presente invenção que possui a capacidade de ligar C4BP e de inibir a ligação da proteína S a C4BP. O polipéptido misturado está operacionalmente ligado a um meio de indicação como aqui descrito. Um meio de indicação preferido é o polipéptido biotinilado. Os polipéptidos particularmente preferidos para utilização são os polipéptidos PSP-12 e PSP-ansa devido à sua demonstrada ligação a C4BP como apresentado nos Exemplos. O C4BP pode ser purificado como aqui descrito, e depois fixo numa matriz sólida por adsorção a partir de uma solução como aqui descrito.

(b) A mistura de reacção de competição é depois mantida durante um período de tempo suficiente para que o polipéptido e a PS_F presentes na fase líquida possam competir com a ligação a C4BP da fase sólida. Estas condições de reacção compatíveis com a ligação da proteína

S a C4BP na fase sólida estão aqui descritas noutra secção, e resultam na formação de um produto de reacção contendo meios de indicação compreendendo o polipéptido marcado complexado com C4BP na fase sólida.

(c) a quantidade de meios de indicação presente no produto formado no passo (b) é então determinado como previamente descrito, determinando assim a presença, e de um modo preferido, a quantidade, de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

As reacções de competição são, de um modo preferido, conduzidas com curvas padrão como descrito acima de modo a determinar de forma mais rigorosa a quantidade de PS_F na amostra de fluido vascular.

Numa forma de realização relacionada, a reacção de competição acima, para detectar PS_F , que utiliza C4BP imobilizada pode ser praticada com um anticorpo anti- PS_F da presente invenção em vez de um polipéptido de PS na fase líquida porque ambos os citados polipéptido de PS e o anticorpo anti- PS_F ligam C4BP e competem deste modo com PS_F na amostra de fluido vascular para ligação à C4BP imobilizada. Nesta forma de realização, o anticorpo está, de um modo preferido, operacionalmente ligado a um meio de indicação como descrito anteriormente para facilitar a detecção de produto de reacção de competição.

3. Imunoensaios de Competição Específicos para Proteína de ligação C4b Competente

A presente invenção também contempla imunorreacções de competição semelhantes àsquelas previamente descritas que são adaptadas para a determinação da presença, e de um modo preferido, da quantidade, da proteína de ligação C4b competente (C4BP) numa amostra de fluido.

A "C4BP competente" é C4BP numa forma que tem a capacidade de se ligar a proteína S livre (PS_F) em solução. As formas de C4BP que não são capazes de se ligar a PS_F incluem C4Bp já complexada com PS_F , C4BP defeituosa devido a montagem imprópria das suas subunidades ou da presença de subunidades da proteína geneticamente deficientes, e semelhantes. Os níveis de C4BP competente no sangue são importantes porque é a forma de C4BP que contribui para a inactivação de PS_F através da formação do complexo, e deste modo, a determinação dos níveis no plasma de C4BP competente proporciona uma informação com relevância clínica.

O ensaio de competição tem por base a interacção de ligação, aqui revelada, entre um polipéptido de PS da presente invenção e C4BP.

Assim, numa forma de realização da presente invenção contempla-se um método para determinar a quantidade de C4BP numa amostra de fluido, de um modo preferido uma amostra de fluido vascular, tal como plasma, compreendendo os passo de:

- (a) formar uma mistura de reacção de ligação por mistura de uma amostra de fluido vascular com um polipéptido da

proteína S desta invenção, estando o referido polipéptido operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de reacção de ligação possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida mistura de reacção de ligação durante um período de tempo suficiente para que qualquer proteína de ligação C4 competente presente na amostra de fluido vascular se ligue ao polipéptido e forme um produto de reacção contendo proteína de ligação C4b na fase sólida; e

(c) determinar a quantidade de proteína de ligação C4b presente no produto de reacção de fase sólida. As condições típicas de reacção de ligação adequadas para utilização estão descritas nos Exemplos.

Em formas de realização preferidas, o passo determinante para detectar C4BP na fase sólida compreende os passos de:

(i) misturar o produto de reacção formado no passo (b) com um anticorpo anti-proteína de ligação C4b contendo moléculas de anticorpo que imunorreagem com a proteína de ligação C4b para formar uma mistura de imunorreacção; e

(ii) manter a referida mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para imunorreagir com qualquer proteína de ligação C4b presente na fase sólida e formar um produto de imunorreacção na fase sólida;

(iii) determinar a quantidade de anticorpo presente no produto de imunorreacção da fase sólida formado no passo (ii), e assim a quantidade da proteína de ligação C4b

competente na amostra de fluido vascular. A mistura, manutenção e passos determinantes podem ser efectuados essencialmente como aqui descrito noutra local.

Um anticorpo anti-proteína de ligação C4BP adequado para utilização no passo (i) pode ser qualquer anticorpo que imunorreage com C4BP quando está complexado com PS. Um anticorpo anti-C4BP preferido é um anti-soro policlonal preparado por imunização de coelhos com uma preparação de C4BP purificada. Particularmente preferidos são os anticorpos que imunorreagem com a subunidade alfa de C4BP, que podem ser preparados por imunização com a subunidade alfa purificada como é bem conhecido, ou podem ser obtidos a partir de várias fontes comerciais. Os métodos para seleccionar uma molécula de anticorpo anti-C4BP que se liga a C4BP quando está presente num complexo PS:C4BP incluem os ensaios de ligação aqui descritos, seguidos da rotina de preparação de um anticorpo monoclonal utilizando C4BP como o imunogénio.

Em formas de realização preferidas, o anticorpo na fase sólida é detectado pela presença de um meio de indicação no produto de imunorreacção, tal como quando o anticorpo é um anticorpo marcado.

Noutra forma de realização, a presente invenção contempla um método para a determinação da quantidade de C4BP numa amostra de fluido, de um modo preferido, uma amostra de fluido vascular, tal como, o plasma, compreendendo os passos de:

(a) formar uma mistura de reacção de ligação misturando uma amostra de fluido vascular com:

(i) um polipéptido da proteína S da presente invenção,
e

(ii) um anticorpo contra a proteína de ligação C4b contendo moléculas de anticorpo que imunorreagem com a proteína de ligação C4b estando o referido anticorpo operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo a que a mistura de imunorreacção possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para que qualquer proteína de ligação C4b competente presente na amostra de fluido vascular se ligue ao anticorpo e forme um produto de imunorreacção na fase sólida, e para o polipéptido se ligar ao referido produto de imunorreacção; e

(c) determinar a quantidade de polipéptido presente na fase sólida do produto de reacção e assim a quantidade de proteína de ligação C4b competente.

De um modo preferido, o anticorpo contém moléculas de anticorpo que imunorreagem com a subunidade alfa da proteína de ligação C4b como descrito anteriormente.

Um meio preferido para determinar a quantidade de produto de reacção na fase sólida é pela utilização de um polipéptido de PS marcado, seguido pelos meios de detecção aqui descritos para outros produtos marcados na fase sólida. Particularmente preferida é a utilização de polipéptidos de PS biotinilados.

Métodos de ensaio exemplificativos aos presentes métodos para detecção de CABP competente são descritos.

Estão também contemplados os ensaios imunológicos capazes de detectar a presença de formação de produto de imunorreacção sem a utilização de um marcador. Tais métodos empregam um "meio de detecção", cujos meios são eles próprios bem conhecidos na química de diagnóstico clínico e constituem uma parte desta invenção apenas no que diz respeito à sua utilização com novos polipéptidos, métodos e sistemas. Meios de detecção exemplificativos incluem métodos conhecidos como biossensores e incluem métodos de biossensibilidade baseados na detecção de alterações na reflectividade de uma superfície, alterações na absorção de uma onda evanescente por fibras ópticas ou alterações na propagação de ondas acústicas de superfície.

G. Composições Terapêuticas

A presente invenção contempla composições terapêuticas úteis para realizar os métodos terapêuticos aqui descritos. As composições terapêuticas da presente invenção contêm um veículo fisiologicamente tolerável em conjunto com um reagente terapêutico desta invenção, nomeadamente um polipéptido de PS, um anticorpo anti-PS ou anticorpo monoclonal como aqui descrito, dissolvido ou disperso neste, como um ingrediente activo. Numa forma de realização preferida, a composição terapêutica não é imunogénica quando administrada a um doente mamífero ou humano para fins terapêuticos.

Como aqui utilizados, os termos "farmaceuticamente aceitável", "fisiologicamente tolerável" e suas variações

gramaticais, no que diz respeito a composições, veículos, diluentes e reagentes, são utilizados indistintamente e significam que os materiais são susceptíveis de serem administrados a, ou num, mamífero sem a produção de efeitos fisiológicos indesejáveis tais como náusea, tonturas, distúrbios gástricos e semelhantes.

A preparação de uma composição farmacológica que contém ingredientes activos nela dissolvidos ou dispersos é bem conhecida na técnica. Tipicamente, tais composições são preparadas como injectáveis, quer como soluções líquidas ou suspensões, no entanto podem também ser preparadas formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão em líquido previamente à utilização. A preparação pode também ser emulsificada.

O ingrediente activo pode ser misturado com excipientes que sejam farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo e em quantidades adequadas para utilização nos métodos terapêuticos aqui descritos. Excipientes adequados são, por exemplo, água, soro fisiológico, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e combinações destes. Adicionalmente, se desejável, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes de humedecimento ou de emulsão, agentes tamponantes de pH e semelhantes, que aumentam a eficiência do ingrediente activo.

A composição terapêutica da presente invenção pode incluir sais farmacologicamente aceitáveis dos seus componentes. Sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida (formados com os grupos amina livres do polipéptido) que são formados com ácidos inorgânicos, tais como, por exemplo, ácidos

clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tais como o acético, tartárico, mandélico e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxilo livres também podem ser derivados de bases inorgânicas, tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amônio, cálcio ou ferro, e bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaina e semelhantes.

Os veículos fisiologicamente toleráveis são bem conhecidos na técnica. Exemplos de veículos líquidos são soluções aquosas estéreis que não contêm materiais para além dos ingredientes activos e água, ou contêm um tampão como fosfato de sódio a valor de pH fisiológico, soro fisiológico ou ambos, tais como soro fisiológico tamponado com fosfato. Além disso, os veículos aquosos podem conter mais do que um sal tampão, assim como sais como cloretos de sódio ou potássio, dextrose, polietilenoglicol e outros solutos.

As composições líquidas podem também conter fases líquidas em adição à, e para a exclusão de, água. Exemplos dessas fases líquidas adicionais são glicerina, óleos vegetais, tais como, óleo de semente de algodão, e emulsões água-óleo.

Uma composição terapêutica contém uma quantidade de um polipéptido de PS ou uma molécula de anticorpo anti-PS_F da presente invenção suficiente para inibir a ligação da proteína S a C4BP. Tipicamente, esta é uma quantidade de, pelo menos, 0,1 por cento em peso e, de um modo mais preferido, é de pelo menos 1 por cento em peso, de péptido ou anticorpo por peso total da composição terapêutica. Uma percentagem em peso é uma proporção em peso entre o péptido ou anticorpo e o total da composição.

Assim, por exemplo, 0,1 por cento em peso é 0,1 grama de polipéptido de PS por 100 gramas de composição total.

H. Métodos Terapêuticos

Foi verificado que os polipéptidos de PS, anticorpos, e anticorpos monoclonais da presente invenção (*i. e.*, inibidores da formação de complexo PS:C4BP) possuem a capacidade para inibir a ligação de PS a C4BP. Com vista ao papel fisiológico de C4BP na complexação com PS e inactivando dessa forma os seus efeitos anticoagulantes, os presentes inibidores da formação do complexo PS:C4B, são úteis para inibir a ligação da proteína S a C4BP *in vivo*.

Assim, numa forma de realização, a presente invenção proporciona a utilização de um polipéptido de um anticorpo da invenção na preparação de um medicamento para o tratamento de trombose.

O polipéptido ou anticorpo estará presente no medicamento numa quantidade terapeuticamente eficaz.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de PS é uma quantidade pré-determinada calculada para atingir o efeito desejado, *i. e.*, para inibir a ligação da proteína PS a C4BP *in vivo* num doente, e assim aumentar a concentração vascular eficaz de PS_F no doente.

A inibição *in vivo* da ligação de PS a C4BP utilizando um medicamento desta invenção é uma forma de realização particularmente preferida e é desejável numa variedade de

estados clínicos, como quando o doente exibe sintomas de coagulação ou está em risco de trombose. Tipicamente, será indicada uma terapêutica para a inibição da ligação da proteína PS a C4BP utilizando polipéptidos de PS quando um doente exibe níveis elevados de C4BP no plasma, coagulação intravascular disseminada (DIC), choque séptico, trombose arterial ou venosa e condições semelhantes que requerem uma intervenção anticoagulante.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de PS desta invenção é tipicamente uma quantidade de polipéptido de PS tal que, quando administrado numa composição fisiologicamente tolerável é suficiente para atingir uma concentração no plasma desde cerca de 0,1 micromolar (μM) até cerca de 100 μM e, de um modo preferido desde cerca de 0,5 μM a cerca de 10 μM .

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo desta invenção é, tipicamente, uma quantidade de anticorpo tal que quando administrada numa composição fisiologicamente tolerável é suficiente para atingir uma concentração no plasma desde cerca de 0,1 micrograma (μg) por mililitro (mL) até cerca de 100 $\mu\text{g/mL}$, de um modo preferido, desde cerca de 1 $\mu\text{g/mL}$ até cerca de 5 $\mu\text{g/mL}$, e habitualmente cerca de 5 $\mu\text{g/mL}$.

O nível de inibição da ligação da proteína S a C4BP presente num doente indicativo da eficácia da presente terapia pode ser rapidamente determinado por análise clínica de rotina, que detecta os níveis de proteína S livre no plasma. Exemplos de ensaios para monitorizar o nível de PS_F são aqui descritos. Alternativamente, a eficácia da terapia pode ser determinada por observação dos efeitos anticoagulantes da terapêutica.

As composições terapêuticas contendo polipéptido de PS ou anticorpo desta invenção, são convencionalmente administradas intravenosamente, como por injeção de uma dose unitária, por exemplo. O termo "dose unitária" quando utilizado em referência a uma composição terapêutica da presente invenção refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como doses unitárias para o indivíduo, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada de material activo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente requerido, *i. e.*, veículo ou veículo.

As composições são administradas de modo compatível com a formulação de dosagem, e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada depende do indivíduo a ser tratado, capacidade do sistema do indivíduo para utilizar o ingrediente activo, e grau de efeito terapêutico desejado. As quantidades precisas de ingrediente activo requerido para ser administrado dependem do julgamento do médico e são particulares para cada indivíduo. No entanto, intervalos de dose adequados para administração sistémica são aqui revelados e dependem da via de administração. Regimes adequados para administração inicial e por impulsos são também variáveis, mas são tipificadas por uma administração inicial seguida de doses repetidas em intervalos de uma hora ou mais por uma injeção subsequente ou outra administração. Alternativamente, é contemplada a infusão intravenosa contínua suficiente para manter no sangue concentrações no intervalo especificado para terapias *in vivo*

Como um auxílio à administração de quantidades terapêuticas eficazes de um polipéptido de PS, anticorpo, ou anticorpo monoclonal, é útil um método de diagnóstico desta invenção para detectar um polipéptido de PS, anticorpo ou anticorpo

monoclonal, respectivamente, no sangue do indivíduo, para caracterizar o destino da composição terapêutica administrada.

I. Purificação por Afinidade da Proteína S Livre

A especificidade de um anticorpo anti-PS_F da presente invenção para imunorreacção com PS livre e não com o complexo PS:C4BP proporciona um reagente útil para purificar PS livre de uma solução aquosa como um fluido biológico complexo incluindo sangue, plasma, fluidos derivados do plasma e fontes de PS livre semelhantes. Fontes adicionais de PS livre a partir das quais se pode purificar PS livre com os métodos apresentados incluem tecidos homogeneizados, células em cultura e sistema de expressão para produzir PS utilizando métodos de ADN recombinante para expressão de genes clonados que codifiquem PS.

Pode ser preparada PS_F extremamente pura utilizando os métodos aqui apresentados, e tal preparação é útil para administração terapêutica de PS "anticoagulante activo", nomeadamente, PS_F, em casos de deficiência em proteína S e como um anticoagulante e um antitrombótico. Como até agora, os reagentes aqui descritos não se ligam a PS:C4BP, os presentes métodos permitem a preparação de PS_F que não está contaminado com nenhuma forma de C4BP, que poderia contrariar os efeitos benéficos anticoagulantes de PS_F por ligação e inactivação de PS_F.

Assim, a presente invenção também contempla um método para purificar proteína S livre (PS_F) a partir de uma solução aquosa compreendendo os passos de:

(a) misturar uma solução aquosa que contém PS_F com um anticorpo da presente invenção que imunorreage com PS_F para formar uma mistura de imunorreacção;

(b) manter a mistura de imunorreacção em condições de imunorreacção durante um período de tempo e com PS_F em solução suficiente para imunorreagir com o anticorpo e formar um produto de imunorreacção; e

(c) isolar o produto de imunorreacção da restante mistura de imunorreacção, recuperando assim a PS_F que imunorreagiu dos contaminantes presentes na solução aquosa inicial, formando assim PS_F purificada.

Em formas de realização preferidas, as moléculas de anticorpo misturadas no passo (a) são moléculas de anticorpo imobilizadas, ou seja estão operacionalmente ligadas a um suporte sólido como será aqui descrito. Quando é utilizado um anticorpo imobilizado, a mistura de imunorreacção possui uma fase sólida e uma fase líquida, e o produto da imunorreacção resultante é formado na fase sólida. Isto proporciona uma vantagem particularmente preferida na purificação, porque o suporte sólido pode ser convenientemente lavado ou enxaguado com tampões formulados para eluir/remover especificamente macromoléculas da matriz do suporte sólido e do seu ambiente, que não imunorreagiram especificamente (se ligaram às) moléculas de anticorpo imobilizado. Após a lavagem para eluir macromoléculas imunorreagidas não especificamente, as moléculas de anticorpo imobilizado são colocadas em contacto com um tampão formulado para remover especificamente (eluir) a PS_F imunorreagida, as moléculas de PS livre eluídas que são recolhidas (recuperadas) numa forma substancialmente purificada.

Numa forma de realização, o tampão de eluição pode conter um polipéptido na fase líquida que imunorreage com o anticorpo na fase sólida e actua como um competidor da imunorreacção com PS_F . Noutra forma de realização, o tampão de libertação pode conter sais incompatíveis com a formação do complexo de imunorreacção PS_F anticorpo. Condições de reagente compatíveis com a formação do produto de imunorreacção, com tampão de lavagem, ou com o tampão de eluição podem ser prontamente desenvolvidas por um especialista na técnica utilizando ensaios e reagentes aqui descritos.

Colocado de outra maneira, o presente método para produzir PS_F purificada envolve dois passos.

O primeiro passo envolve imunoadsorção (adsorção) de PS_F de uma solução aquosa. O adsorvente compreende uma composição de anticorpo imobilizado, nomeadamente um anticorpo desta invenção ligado a um substrato adequado, tal como esferas de agarose ou suporte sólido afim. Após a PS_F ser adsorvida aos anticorpos imobilizados por imunorreacção específica, o material adsorvido é lavado exaustivamente com um tampão para remover materiais não imunorreagidos, macromoléculas, proteínas e semelhantes.

O segundo passo envolve um passo de tratamento (eluição) para remover especificamente (eluir) o material imunorreagido (adsorvido) com um tampão formulado para perturbar o produto da imunorreacção na fase sólida e efectuar a libertação do antigénio imunorreagido para a fase líquida do tampão de eluição. Tampões úteis para eluir proteínas imunorreagidas especificamente de colunas de anticorpo imobilizado são

geralmente bem conhecidos. Estão descritos exemplos de tampões no Exemplo 6.

Métodos para preparar uma composição de molécula de anticorpo imobilizado, para imunorreagir com proteínas específicas, e para a respectiva eluição para produzir proteínas purificadas são geralmente bem conhecidos na técnica e estão também a seguir descritos. Por exemplo, ver os estudos de Zimmerman *et al.* na Patente dos Estados Unidos N°. 4361509, que descrevem a purificação por imunoafinidade do Factor VIII de fontes de plasma utilizando uma molécula de anticorpo monoclonal imobilizado. Moléculas de anticorpo monoclonal imobilizado exemplificativas, a sua utilização e a sua preparação estão descritos no Exemplo 6.

Numa forma de realização relacionada, a presente invenção também contempla uma composição para purificar PS_F de soluções aquosas de acordo com os métodos aqui descritos. A composição compreende moléculas de anticorpo da presente invenção imuno específicas para PS_F na forma de moléculas de anticorpo imobilizadas, *i. e.*, ligadas operacionalmente a um suporte sólido. Composições exemplificativas são descritas no Exemplo 6, utilizando esferas de agarose possuindo a elas afixados (ligados operacionalmente) anticorpos quer policlonais quer monoclonais da presente invenção. Exemplos incluem moléculas de anticorpo que imunorreagem com os polipéptidos preferidos, PSP-12 e PSP-ansa, por exemplo o anticorpo monoclonal MAb 56.

Exemplos

A descrição seguinte fornece detalhes sobre a maneira pela qual formas de realização particulares da presente invenção podem ser realizadas e utilizadas. Esta descrição, embora exemplificativa da presente invenção, não deve ser entendida como especificamente limitante da invenção. Devem ser consideradas dentro desta descrição variações e equivalentes que podem estar dentro do entendimento e da competência técnica dos especialistas na técnica.

1. Polipéptidos

Os péptidos sobreponíveis da proteína S sintética listados na Tabela 1 acima, foram produzidos pelo método da síntese simultânea de péptidos múltiplos, utilizando a técnica de fase sólida descrita por Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135 (1985). Os péptidos serão de aqui em diante referidos pelas suas designações peptídicas como listadas na Tabela 1. A sequência de resíduos de aminoácidos e a SEQ ID N° correspondente para cada péptido estão também listados na Tabela 1. Todos os péptidos foram sintetizados na forma amida terminal carboxilo. Os péptidos sintetizados foram então analisados por cromatografia líquida de elevado desempenho de fase reversa (HPLC) numa coluna Vydac C-18 (Alltech Associates, Inc., IL) com um gradiente linear de acetonitrilo de 0-60% em ácido trifluoroacético a 0,1%. Os péptidos foram então purificados até à homogeneidade por HPLC preparativa utilizando condições ótimas sugeridas pela cromatografia analítica. De modo a prevenir a formação de dissulfitos entre os péptidos, em alguns péptidos a cisteína que ocorre naturalmente foi

substituída por um resíduo de aminoácido de uma serina ou de uma glicina, como indicado na Tabela 1. As composições de aminoácidos e as concentrações dos péptidos isolados foram determinadas sujeitando-os a hidrólise durante 24 horas em HCl a 6 N em tubos evacuados a 110 graus Celsius (110 °C) e subsequente análise num Analisador de Elevado Desempenho, Beckman, Modelo 6300. Os péptidos, PSP-ansa, PSP-424K e PSP-428K não foram submetidos a purificação em HPLC e assim, eram apenas 30% puros.

Para verificar a massa de peso molecular correcta, análises espectroscópicas dos péptidos PSP-12 (1:420-434) e PSP-605 (1:605-614) utilizando o espectro de massa iónica positiva FIB obtido num espectrómetro de massa de focagem dupla VG-ZAB-VSE equipado com um disparador de iões cézio produziu um pico único e o peso molecular esperado exacto de 1755 para a forma protonada simples de PSP-12 e 1072 para a forma protonada simples de PSP-605.

Os péptidos purificados foram separadamente ressuspensos em água destilada para formar uma solução de péptido dissolvido a uma concentração final de 2,5 mM. Subsequentemente, um décimo do volume de um tampão 10 vezes concentrado referido como TBS-Az contendo Tris-hidroximetilaminometano-cloridrato (Tris-HCl) a 0,05 M a pH 7,4, cloreto de sódio (NaCl) a 0,1 M, e azida de sódio (NaN₃) a 0,02%. O pH da solução foi verificado, e se necessário, ajustado a pH 7,4 com quantidades tituladas de Tris base a 1 M. Para péptidos que pareciam não ser completamente solúveis em TBS-Az a 2,5 mM, suspensões do péptido parcialmente dissolvido foram separadamente centrifugadas a 13000 x g para precipitar o material insolúvel. As concentrações molares nos sobrenadantes individuais resultantes foram estimadas a partir

da absorvência a 280 nm e 257 nm, respectivamente, para soluções de péptidos contendo aminoácidos aromáticos utilizando um coeficiente de extinção molar de $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para triptofano e $1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para tirosina a 280 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar de $200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a fenilalanina a 257 nm.

2. Preparação de Anti-soros Policlonais contra Polipéptidos Sintéticos

A. Preparação do Imunogénio

Para a preparação de um péptido imunogénico, o polipéptido sintético PSP-12 foi preparado como descrito no Exemplo 1. O péptido PSP-12 sintetizado foi acoplado a hemocianina de lapa (KLH) (Sigma, St. Louis, MO) utilizando o agente de ligação cruzada heterobifuncional, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP) (Pierce Biochemicais, Rockford, IL) . Para o processo de acoplamento, 80 microlitros (μL) de SPDP a 10 miligramas/mililitro (mg/mL) dissolvido em dimetilformamida foram misturados gota a gota com 400 μL de KLH a 15 mg/mL em fosfato a 0,1 M, NaCl a 0,1 M a pH 8,5, em condições de agitação contínua durante 30 minutos a 22 °C, de modo a formar KLH activada com SPDP. A KLR activada com SPDP resultante foi então extensivamente dialisada a 4 °C contra uma solução tampão de fosfato a 0,1 M e NaCl a 0,1 M a pH 7,4, de modo a remover SPDP não ligado. Foram primeiro dissolvidos seis mg de péptido PSP-12 preparado possuindo uma cisteína C-terminal em 2 mL de fosfato a 0,1 M e NaCl a 0,1 M a pH 7,4 e então misturados com KLH activada com SPDP preparada acima, em condições de agitação contínua. O grau de acoplamento de PSP-12 com KLH foi monitorizado diluindo uma alíquota da mistura 1:100 no tempo 0,

e em cada hora a partir daí, e medindo a libertação de piridina-2-tiona a 343 nm num espectrofotómetro. O ponto final de acoplamento foi determinado ser um aumento de 0,2 na absorvência, ou após visualização de precipitado, ponto em que conjugados de péptido e KLH se formam, e designado por imunogénio PSP-12-KLH.

B. Imunização e Recolha de Anti-Soros Policlonais

Para formar anticorpos antipéptido, o imunogénio PSP-12-KLH preparado no Exemplo 2a foi emulsificado utilizando Adjuvante Completo de Freund (DIFCO Laboratories, Detroit, MI) para a primeira injeção e com Adjuvante Incompleto de Freund (DIFCO) para todas as injeções subsequentes de acordo com as instruções do fabricante, e o imunogénio PSP-12-KLFI foi incorporado na emulsão a uma concentração de 2 mg/mL. Foi injectado subcutaneamente meio mL de uma emulsão preparada em cada um de dois coelhos brancos Nova Zelândia, após terem sido recolhidas amostras de soro pré-imune. Os coelhos foram injectados 3 vezes em intervalos semanais seguindo o protocolo de injeção como detalhado. Duas semanas após a última injeção, foram recolhidas amostras de sangue para verificar o título de anticorpo contra o péptido de PSP-12 específico, utilizado como imunogénio, pelo ensaio de ELISA descrito abaixo no Exemplo 2C. As amostras de sangue recolhidas foram armazenadas a 4 °C durante 12 horas, após as quais as amostras foram centrifugadas a 3 000 x g durante 20 minutos. O sobrenadante resultante contendo anticorpos antipéptido foi recolhido, designado anticorpo antipéptido (anti-PS) policlonal e armazenado a -20 °C.

Os péptidos: PSP-54, PSP-561, PSP-418*, PSP-13* e PSP-14* foram também preparados separadamente como imunogénios por conjugação com KLH como descrito no Exemplo 2A. A imunização de coelhos separados para a produção de anti-soros contra cada um dos péptidos listados acima foi realizada como aqui descrito. Os anti-soros resultantes foram então pesquisados por ELISA como descrito para o anti-soro anti-PSP-12 (também referido como anti-PS (420-434)) no Exemplo 2C.

C. ELISA para Pesquisar Imunorreatividade dos Anti-Soros

Os títulos dos anticorpos dos péptidos e a imuno-especificidade nos soros colhidos de coelhos no Exemplo 2B foram determinados num ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA) como descrito abaixo. Os antigénios utilizados na ELISA incluíram o péptido imunizante PSP-12 e a proteína S (PS) humana purificada. A proteína S humana purificada foi preparada como descrito em Schwarz et al., *Blood* 64:1297-1300 (1984).

Para determinar a imuno-especificidade dos anti-soros de coelho obtidos no Exemplo 2B, foram realizados ensaios de ELISA. Resumidamente, 50 µL de concentrações de 50 µM dos péptidos PSP-12, PSP-ansa e PSP-428K preparados no Exemplo 1 e listados na Tabela 1 ou PS a 10 µg/mL preparado no Exemplo 2C num tampão consistindo em carbonato de sódio a 0,05 M (Na₂CO₃) e NaN₃ a 0,02% a pH 9,0 foram misturados separadamente nos poços de placas de microtitulação. As placas foram mantidas a 37 °C durante uma hora para permitir que os antigénios ficassem operacionalmente afixados às paredes do poço. Após lavagem dos poços revestidos por antigénio com TBS, os poços foram bloqueados com 250 µL/poço de albumina de soro bovino (BSA)

(Sigma) em TBS a 10% durante uma hora a 22 °C. A solução bloqueadora foi então removida e os poços foram subsequentemente lavados cinco vezes com 250 µL/poço de tampão de manutenção (Tris-HCl a 0,05 M, NaCl a 0,1 M, NaN₃ a 0,02%, BSA a 1 mg/mL, CaCl₂ a 5 mM, Tween 20 a 0,01% a pH 7,4).

Foi então adicionado cinquenta µL de anti-soro específico não imune de coelho com diluição seriada em tampão de manutenção aos poços lavados para formar uma mistura de imunorreacção, que foram mantidos durante uma hora a 37 °C para permitir a formação de produtos de imunorreacção de fase sólida-líquida. Os poços foram então lavados três vezes com tampão de manutenção seguido por mistura de 50 µL de anticorpo secundário a 1,0 µg/mL (IgG de coelho, anti-cabra policlonal biotinilado) (Pierce Biochemicals) diluído em tampão de manutenção para cada poço para a detecção de produtos de imunorreacção. As placas foram mantidas durante o período de 1 hora a 37 °C após o qual a solução de anticorpo secundário foi removida.

Após lavagem dos poços como descrito acima, 50 µL de estreptavidina-fosfatase alcalina e, 1,0 µg/mL (Pierce Biochemicals) em tampão de manutenção foi adicionado a cada poço e mantido durante 30 minutos a 37 °C. A detecção de produtos de imunorreacção específica foi obtida misturando 150 µL/poço de p-nitrofenilfosfato (PNPP) (Pierce Biochemicals) a 5 mg/mL em dietanolamina a 0,1 M e NaN₃ a 0,02% a pH 9,0 seguido por medição da alteração da absorvência a 405 nm ao longo do tempo utilizando o leitor de microplacas Bio-Kinetics EL312 e o Programa Informático KinetiCalc (Biotek Instrumentes, Inc., VT). A ligação não específica foi considerada como sendo a absorvência medida nos poços bloqueados com BSA a 10%, que serviram como controlos negativos sem o revestimento precedente

de uma proteína ou péptido específico. Nas condições descritas, a ligação não específica nunca excedeu mais do que 5% da ligação específica. Os anti-soros antipéptido de coelho que exibiram imunorreactividade que produziu uma alteração na densidade óptica a 405 nm superior a 20 delta por minuto utilizando o programa cinético, quando comparada com a imunorreactividade de soro pré-imune em relação aos péptidos PSP-12, PSP-ansa, PSP 424K e PSP-428K e que imunorreagiram de forma semelhante com PS, foram seleccionados para utilização como um anticorpo antipéptido, e também seleccionados para posterior purificação como descrito no Exemplo 3.

Anti-soros de coelho, que foram obtidos no Exemplo 2b contra os péptidos: PSP-54, PSP-561, PSP-418*, PSP-13* e PSP-14*, foram pesquisados para imunorreactividade em relação aos respectivos imunogénios do péptido de PS como descrito acima. Os anti-soros de coelho que exibiam imunorreactividade significativa quando comparada com a dos soros pré-ímenes em relação a cada um dos imunogénios do péptido e de PS foram posteriormente purificados e analisados como descrito no Exemplo 3.

3. Purificação de Anticorpo Anti-PS, Anti-PS(420-434) (Anti-PSP-12)

A purificação da fracção IgG de anti-soro de coelho, que apresentou reactividade significativa contra o péptido-PSP-12 imunizador e contra os péptidos PSP-ansa e PSP-428K bem como contra a PS purificada, foi realizada por precipitação com sulfato de amónio (0-45%) seguida por purificação de IgG numa coluna de troca iónica Mono Q (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ) ligada a um sistema de cromatografia líquida rápida de proteína

(FPLC) (Pharmacia). A purificação de imunoafinidade da fracção de IgG imunorreactiva reunida numa amostra foi realizada fazendo passar aproximadamente 100 mg da IgG por uma coluna de 5 mL contendo 3 mg de proteína S preparada no Exemplo 2C ligada a Sepharose 4B (Pharmacia) como descrito no Exemplo 2A. Após uma lavagem exaustiva da coluna com 5 volumes da coluna de Tris-HCl a 0,05 M e NaCl a 1 M a pH 7,4 para remover anticorpos não ligados, a IgG ligada foi eluída com dois volumes de coluna de glicina-HCl a 0,1 M a pH 2,5. A proteína eluída foi monitorizada por absorvência a 280 nm e as concentrações de IgG determinadas a partir do coeficiente de extinção de 13,5. A IgG eluída foi imediatamente dialisada contra TBS-Az, concentrada contra sacarose a 50% durante aproximadamente 3-4 horas e uma vez mais extensivamente dialisada contra TBS-Az para uma concentração final de 3-4 mg/mL. A análise de amostras reduzidas e não reduzidas por electroforese em gel de poliacrilamida de 4-15% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) revelou IgG mais do que 95% pura. Este anticorpo antipéptido purificado por imunoafinidade é designado anti-PS(420-434).

A. Ligação Directa de PS a Anticorpo Anti-PS(420-434)

A afinidade do anticorpo anti-PS(420-434) purificado por imunoafinidade para PS, foi determinada por medição em ELISA da ligação directa, na fase sólida, de (b-PS) biotinilado ao anticorpo anti-PS(420-434) imobilizado. Para o ensaio de ELISA, foram aplicados aos poços de placas de microtitulação 50 μ L de anticorpo anti-PS(420-434) diluído para uma concentração de 10 μ g/mL em Na_2CO_3 a 0,05 M e NaN_3 a 0,02% a pH 9,0, e mantidos a 37 °C durante 1 hora para formar poços revestidos com anticorpo. Após a remoção da solução de anticorpo no final do período de

manutenção, foram aplicados a cada poço 250 µL de BSA a 10% em TBS-Az a pH 7,4 durante uma hora a 22 °C para bloquear os sítios dos poços não ocupados. Para poços que foram utilizados como controlos negativos, o passo de revestimento com o anticorpo foi omitido antes do passo de bloqueamento. Os poços revestidos com anticorpo e bloqueados foram então lavados três vezes com o tampão de manutenção preparado como descrito no Exemplo 2C. Foram aplicados cinquenta µL de b-PS, preparado por combinação de biotina (Clontech, Palo Alto, CA) com PS purificado (Exemplo 2C) de acordo com as instruções do fabricante, diluídos em tampão de manutenção para concentrações variando desde 0 a 10 µg/mL, nos poços lavados para formar uma mistura de imunorreacção que foi mantida durante uma hora a 37 °C para formar um produto de imunorreacção na fase sólida. Os poços foram subsequentemente lavados cinco vezes com tampão de manutenção. A detecção e medição dos produtos de imunorreacção específicos foi realizada pela mistura de fosfatase alcalina-estreptavidina seguida de PNPP como previamente descrito para a ELISA no Exemplo 2C.

Os resultados da análise de ELISA indicaram que os anticorpos anti-PS(420-434) se ligam a PS nativa com uma constante de dissociação (K_d) de 10 nanomoles (nM).

Um ensaio semelhante em que anti-PS(603-616) foi adsorvido na fase sólida e b-PS foi misturado em concentrações que variam entre 0-40 µg/mL produziram uma classe única de sítios de ligação com uma constante de dissociação (K_d) de 31 nM.

Assim, os anticorpos monoclonais produzidos contra o péptido inibidor mais potente PSP-12 (1:420-434), como descrito no Exemplo 5, que foram purificados por imunoafinidade numa coluna

PS-Sepharose, imunorreagiram com PS nativa. Assim, pelo menos partes da região representada por este péptido em PS estavam expostas e disponíveis para interacção com outras espécies moleculares na superfície de PS acessível ao solvente. Os anticorpos produzidos contra pequenos péptidos sintéticos têm-se apresentado capazes de reconhecer a proteína nativa.

4. Preparação de Anticorpos Monoclonais

A. Preparação do Hibridoma LJS-56

O polipéptido designado PSP-12 (1:420-434) foi preparado como um imunogénio de acordo com o Exemplo 2a. Murganhos Balb/c ByJ (Scripps Clinic and Research Foundation Vivarium, La Jolla, CA) foram imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 50 µg de imunogénio PSP-12-KLH preparado em adjuvante de Freund completo (CFA) seguido por uma segunda e uma terceira imunizações utilizando o mesmo imunogénio PSP-12-KLH, cada uma com cerca de três semanas de intervalo, em adjuvante de Freund incompleto (IFA). Os murganhos receberam um reforço de 50 µg do péptido preparado, intravenosamente (i.v.) em soro fisiológico normal 4 dias antes da fusão e um segundo reforço por perfusão um dia mais tarde.

Os animais assim tratados foram sacrificados e o baço de cada murganho foi retirado. Foi então preparada uma suspensão de células de baço. As células de baço foram então extraídas da suspensão de células de baço por centrifugação durante cerca de 10 minutos a 1000 rpm, a 23 °C. Após remoção do sobrenadante resultante o sedimento de células foi ressuspenso em 5 mL de

tampão de lise de cloreto de amônia (NH_4Cl) frio e foi mantido durante cerca de 10 minutos.

Foram adicionados dez mL de Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO) e tampão HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperidinaetanossulfônico] à suspensão de células lisadas para formar uma mistura, e essa mistura foi centrifugada durante cerca de 10 minutos a 1000 rpm a 23 °C.

Após o sobrenadante resultante ter sido decantado, o sedimento foi ressuspensão em 15 mL de DMEM e HEPES e foi centrifugado durante cerca de 10 minutos a 1000 rpm a 23 °C. O processo acima foi repetido.

O sedimento foi então ressuspensão em 5 mL de DMEM e HEPES. Uma alíquota da suspensão de células de baço foi então removida para contagem. As fusões foram efectuadas da seguinte maneira utilizando a linha celular de mieloma de murganho não secretora P3X63Ag 8.653.1, um subclone da linha P3x63Ag 8.653 (ATCC 1580). Com uma razão de células de mieloma para células de baço de cerca de 1 para 10 ou de cerca de 1 para 5, foram centrifugadas uma quantidade suficiente de células de mieloma para formar um sedimento, lavadas duas vezes em 15 mL de DMEM e HEPES, e então centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm a 23 °C.

As células de baço e células de mieloma foram combinadas em tubos de 15 mL de fundo redondo. A mistura de células foi centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm a 23 °C e o sobrenadante foi removido por aspiração. Posteriormente, 200 µL de polietilenoglicol aquoso de peso molecular de 4000 (PEG) a 50 por cento (peso por volume); (ATCC Baltimore, MD) a cerca de 37 °C foram misturados com o sedimento utilizando uma pipeta de

1 mL com agitação vigorosa para rebentar o sedimento. As células foram então misturadas suavemente durante entre 15 e 20 segundos. A mistura celular resultante foi centrifugada durante 4 minutos a 700 rpm.

A cerca de 8 minutos a partir do momento da adição do PEG foi adicionado suavemente ao sedimento 5 mL de tampão DMEM mais HEPES, sem perturbar as células. Após 1 minuto a mistura resultante foi rebentada com uma pipeta de 1 mL e foi mantida durante mais 4 minutos. Esta mistura foi centrifugada durante 7 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante resultante foi decantado, 5 mL de meio HT (hipoxantina/timidina) foi lentamente adicionado ao sedimento, e a mistura foi mantida sem perturbação durante 5 minutos. O sedimento foi então partido em pedaços grandes e a suspensão de células final foi colocada em frascos T75 (2,5 mL por frasco) nos quais tinha sido previamente adicionado 7,5 mL de meio HT. A suspensão de células resultante foi mantida a 37 °C para crescer as células de fusão. Após 24 horas foi misturado 10 mL de meio HT aos frascos seguido de mistura com 0,3 mL de aminopterina a 0,04 mM 6 horas mais tarde. Quarenta e oito horas após fusão foi adicionado aos frascos 10 mL de meio HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina).

Três dias após a fusão as células viáveis foram plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a cerca de 2×10^4 células viáveis por poço (total de 768 poços) em meio de tampão HAT como descrito em Kennett et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81:77 (1978). As células foram alimentadas sete dias após a fusão com meio HAT e a intervalos de aproximadamente 4-5 dias mais tarde com meio HT conforme necessário. O crescimento foi seguido por observação microscópica e os sobrenadantes da cultura foram recolhidos cerca de duas semanas mais tarde. Os

sobrenadantes da cultura de culturas resistentes em HAT foram subsequentemente ensaiados quanto à presença de anticorpos específicos para PSP-12 (1:420-434) por ELISA em fase sólida como descrito no Exemplo 2C e seleccionados como hibridomas que produzem um anticorpo desta invenção. As culturas de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais anti-PS(420-434) foram assim identificadas e um clone foi designado LJS 56 (ou MAb 56).

B. Imunopesquisa de Anticorpos Monoclonais por ELISA

O anticorpo monoclonal 56 (MAb 56) foi pesquisado para maior imunoespecificidade como no Exemplo 2C utilizando os péptidos PSP-12, PSP-ansa, PSP-424K e PSP-428K na fase sólida. Por estes métodos foi determinado que o MAb 56 se liga a todos os péptidos saturando de um modo dependente da dose. A ligação do MAb 56 ao péptido PSP-ansa saturou a uma concentração de anticorpo de aproximadamente 0,6 µg/mL. Isto estava em contraste com o observado com os péptidos PSP-12, PSP-424K e PSP-428K em que foi necessário 1,2 µg/mL de MAb 56 para a saturação dos sítios de ligação. O MAb 56 não se ligou a um péptido correspondente a PSP-12 sintetizado na ordem inversa. Adicionalmente, o MAb 56 não se conseguiu ligar a péptidos que possuíam uma substituição de aminoácido de ácido glutâmico carregado negativamente por uma lisina que normalmente ocorre com carga positiva, em qualquer das posições 423 ou 432 de resíduos de aminoácidos da sequência da proteína S nativa. Assim, o MAb 56 liga-se aos péptidos de um modo específico para o resíduo e a conformação. Adicionalmente, verificou-se que o MAb 56 também imunorreagia com a proteína S da fase sólida no ensaio descrito no Exemplo 2C.

A especificidade do MAb 56 purificado em relação quer à proteína S livre quer à proteína S total foi ainda avaliada como descrito no Exemplo 6. O MAb 56, específico para o péptido PSP-12, mostrou assim que também imunorreage com a proteína S livre e não imunorreage com o complexo PS:C4BP.

Um ensaio de ligação directa no qual o MAb 56 foi utilizado para revestir os poços das placas de microtitulação como descrito no Exemplo 3 e misturado com b-PS nativa confirmou que o MAb 56 imobilizado se liga a PS nativa.

Assim, porque o MAb 56 é específico para o péptido PSP-12 e se liga apenas à proteína S livre, não complexada, é um anticorpo monoclonal preferido para a presente invenção. Contudo, outros anticorpos monoclonais funcionalmente equivalentes ao MAb 56 foram produzidos utilizando o conjugado PSP-12-KLH como o imunogénio. Um tal MAb é LJS-418 (MAb 418) e apresenta uma afinidade de ligação para a proteína S semelhante à do MAb 56. Outros anticorpos monoclonais podem ser produzidos de modo semelhante utilizando outros polipéptidos de PS mencionados acima.

C. Purificação de Anticorpo Monoclonal

Hibridomas que secretam anticorpos anti-PS(420-434) como descritos no Exemplo 4A foram injectados em murganhos Balb/c de 10 semanas de idade como abaixo descrito para produzir líquido ascítico.

Com essa finalidade, conjuntos separados de murganhos Balb/c de 10 semanas de idade foram iniciados com 0,3 mL de óleo

mineral e então injectados intraperitonealmente com 5×10^6 células de hibridoma. O tempo médio para desenvolvimento de ascites foi de 9 dias. Após clarificação por centrifugação a $15000 \times g$ durante 15 minutos a 23°C , os líquidos ascíticos produzidos pelos hibridomas foram reunidos e armazenados congelados a -20°C para formar composições de anticorpo monoclonal.

Os anticorpos monoclonais produzidos pelas ascites foram ainda purificados por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC) utilizando uma coluna de troca aniônica Pharmacia Mono Q HR5/5 (Pharmacia) utilizando um gradiente de NaCl 0-0,5 M em Tris-HCl a 10 mM a pH 8,0 seguindo as instruções fornecidas com a coluna. Os MAb tratados por FPLC foram então concentrados utilizando uma célula de ultrafiltração com agitação da Amicon (Amicon, Danvers, MA; membrana PM 30) até uma concentração de 1 mg/mL, dialisados contra TBS e armazenados a -70°C para formar MAb purificado.

5. Inibição da Ligação de Proteína S a C4BP

A. Ensaio de Ligação de Competição Utilizando C4BP na Fase Sólida

i) Purificação de C4BP

C4BP humana purificada foi obtida a partir de 5 litros (1) de plasma citratado humano por precipitação com cloreto de bário a 80 mM na presença dos inibidores cloridrato de benzamidina (10 mM), diisopropilfosforofluoridato (1 mM), fluoreto de fenilmetanossulfonilo (1 mM) e inibidor de tripsina de soja

(50 mg/mL). Após agitação da mistura durante 1 hora o precipitado de cloreto de bário foi sedimentado por centrifugação a 5000 x g durante 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 700 mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pH 7,4 e exaustivamente dialisado contra TBS-Az com cloridrato de benzamidina a 10 mM e passada através de uma coluna (1,5 x 40 cm) contendo 3 mg de IgG/mL de gel de anticorpos policlonais de coelho anti-C4BP imunopurificados (Calbiochem, San Diego, CA) acoplados a Sepharose 4B activada com CNBr, com uma taxa de fluxo de 35 mL/h. As esferas foram lavadas com 100 mL de TBS contendo NaCl a 1 M seguido por 100 mL de EDTA a 20 mM em TBS. O antigénio C4BP foi eluído com 100 mL de cloridrato de guanidina a 3 M em TES e foram recolhidas fracções de 2 mL. As fracções foram analisadas quanto à presença de C4BP por SDS-PAGE como descrito abaixo, foram reunidas (52 mL), e a proteína foi concentrada utilizando ultrafiltros PM 30 Diaflo, (Amicon). A amostra concentrada (5 mL) foi passada por uma coluna de Sepharose CL-6B (3 x 100 cm) a uma taxa de fluxo de 10 mL/h, para separação de antigénio PS da C4BP num tampão de passagem de Tris-HCl a 0,05 M, guanidina a 3 M pH 6,0. O pico de proteína de C4BP (15 mL) foi dialisado contra TBS e a concentração de proteína foi determinada medindo a densidade óptica a 280 nm como descrito no Exemplo 1. A C4BP foi determinada como >95% pura sem a presença detectável de proteína S quando analisada por SDS-PAGE. O material purificado representa aproximadamente 10% da quantidade total de C4BP no material inicial.

ii) Ensaio de Inibição de Péptido

Cada um dos péptidos produzidos como descrito no Exemplo 1 e listados na Tabela 1 foi analisado quanto à sua capacidade de inibir a ligação de proteína 5 nativa em fase líquida a C4BP na fase sólida.

Os poços de microtitulação de uma placa de 96 poços foram revestidos com 50 μL de C4BP purificada em tampão carbonato (Na_2CO_3 a 0,02 M, pH 9,0, Na-Azida a 0,02%) a 10 $\mu\text{g/mL}$. Após bloqueamento com BSA a 10% em TBS, 50 μL de diferentes concentrações de péptidos diluídos em tampão de lavagem (TBS, BSA a 0,2%, CaCl_2 a 5 mM, Tween 20 a 0,02%) foram misturados separadamente a poços revestidos com C4BP. Após 2 horas à temperatura ambiente, 50 μL de uma solução de proteína S biotinilada, foram adicionados a cada poço para formar uma segunda mistura de ligação possuindo uma concentração final de 2 $\mu\text{g/mL}$. A placa foi agitada e as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram descartadas e os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem. A cada poço, foi adicionado 50 μL de estreptavidina-fosfatase alcalina (1 $\mu\text{g/mL}$ de tampão de lavagem) e deixado a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. A estreptavidina-fosfatase alcalina foi então descartada e os poços foram lavados 6 vezes com tampão de lavagem. As densidades ópticas resultantes das soluções de reacção foram lidas como anteriormente descrito no Exemplo 2C.

Os resultados do ensaio são apresentados como percentagem de inibição de ligação de C4BP. Percentagem de inibição de ligação de C4BP é definida como:

$$I = 100\% - 100 \times (\Delta_T/\Delta_C)$$

em que I é expresso como uma percentagem; e

em que 100% = Δ /min da quantidade de b-PS que se liga especificamente aos poços revestidos com C4BP na ausência de qualquer péptido de PS de competição; e

em que Δ_T = alteração da absorvência (405 nm) na presença de péptido de PS de competição; e

em que Δ_C = alteração da absorvência (405 nm) na ausência de péptido de PS de competição.

Os resultados dos ensaios de competição são apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 1, 2, 3 e 4. As designações dos péptidos correspondentes aos SEQ ID N° são apresentadas na Tabela 1. Os resultados na Tabela 2 indicam que o péptido PSP-12 foi o inibidor mais forte, inibindo a formação do complexo PS:C4BP em 80% a uma concentração de péptido de 800 μ M. Os péptidos PSP 415* (4:1-15) PSP-417A (1:417-424) e PSP-430* (2:8-15) também inibiram a formação do complexo PS:C4BP em quase 80% a concentrações de péptido de 800 μ M. Os péptidos PSP-415*, PSP-417 (1:413-422), PSP-417P (1:413-424), e PSP-428* (2:4-15) cada um inibiu a formação do complexo PS:C4BP em aproximadamente 60% a uma concentração de péptido de 800 μ M. O péptido PSP-424 (1:421-427) inibiu a formação do complexo PS:C4BP em 40% a uma concentração de 800 μ M.

Tabela 2

SEQ ID N°	SEQUÊNCIA DE RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS	%INIB
(2:1-15)	SGIKEIIQEKQNKHC	80
(2:4-15)	KEIIQEKQNKHS	55
(2:8-15)	QEKQNKFIS	75
(1:425-433) ¹	IIQEKQNKH	-
(1:421-427)	GIKEIIQ	40
(1:417-424)	QGASGIKE	75
(1:413-424)	NLMKQGASGIKE	65
(1:413-422)	NLMKQGASGI	60
(4:1-15)	DIRSWNLMKQGASGI	80
(4:1-11)	DIRSWNLMKQG	60
(4:1-8)	DIRSWNLM	-
(1:393-407) ¹	VESELIKPINPRLDG	-
(1:436-450) ¹	VIVVEKGSYYPGSGIA	-
(1:605-614) ¹	GVQLDLDEAI	25

¹ Os polipéptidos indicados foram sintetizados como descrito no Exemplo 1 e testados quanto à sua capacidade de inibir a ligação de PS a C4BP como descrito no Exemplo 5Ai.

Os péptidos PSP-347 (1:347-361), PSP-32 (1:32-46), PSP-7 (1:187-200), PSP-417A (1:417-424), PSP-12 (1:420-434) e PSP-418* (4:1-15) exibiram todos forte inibição da formação do complexo PS:C4BP relativamente a péptidos de PS de outras regiões da proteína S. Os péptidos de PS adicionais apresentados na Tabela 1 foram também testados e apresentaram inibição da ligação de PS a C4BP. Em experiências subsequentes o péptido PSP-ansa (11:1-26) mostrou inibir completamente a ligação de PS a C4BP a uma concentração de péptido de aproximadamente 250 μ M enquanto que PSP-12 não resultou em inibição completa à mesma

concentração. Os péptidos PSP-424K e PSP-428K exibiram perfis de inibição semelhantes aos de PSP-12.

Estes resultados indicam que os péptidos descritos acima possuem a capacidade de inibir a ligação de PS a C4BP no local ou perto do local da região de ligação de PS:C4BP. Com base nestes resultados várias regiões de PS foram identificadas como sítios significativos para contacto entre PS e C4BP, e por isso definem um polipéptido de PS desta invenção.

Uma abordagem alternativa foi utilizada para testar a capacidade dos péptidos PSP-ansa e PSP-428K, em comparação com a observada com o péptido PSP-12, de inibir a ligação de C4BP a PS. Para este ensaio, os poços de microtitulação foram revestidos com PS purificada diluída para uma concentração de 10 µg/mL em tampão de revestimento carbonato, como descrito acima. Os poços foram mantidos para permitir que PS se ligasse às paredes do poço. Após o período de manutenção, os poços foram bloqueados também como acima descrito. Os péptidos de PSP seleccionados foram misturados separadamente a várias concentrações variando de 0-500 µM com C4BP biotinilado (b-C4BP) a uma concentração de 1 µg/mL. As misturas foram mantidas numa placa de fase fluida durante 2 horas à temperatura ambiente para formar complexos péptido-C4BP.

Cinquenta µL das misturas de complexo foram adicionados separadamente aos poços preparados por revestimento com C4BP e mantidos durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi lavada e processada para revelação como descrito acima.

Neste ensaio, o péptido PSP-ansa inibiu a ligação de b-C4BP a poços revestidos com PS com uma concentração inibitória de metade do máximo de aproximadamente 15 μM ($\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M}$ e uma IC_{90} de 50 μM . Os outros péptidos, PSP-12, PSP-424K e PSP-428K, foram também inibidores mas com uma IC_{50} de aproximadamente 50 μM e uma IC_{90} de aproximadamente 250 μM . Assim, o péptido PSP-ansa (11:1-26) foi mais eficiente a inibir a ligação de C4BP a PS do que os outros três péptidos testados.

iii) Anticorpos que Inibem a Ligação

Os anticorpos preparados no Exemplo 2 imunorreactivos com os seus péptidos de imunização respectivos e que demonstraram imunorreactividade com a proteína S purificada, foram testados quanto à sua capacidade de inibir a ligação da proteína S a C4BP imobilizada, utilizando o sistema de ELISA descrito no Exemplo 5A com as seguintes excepções. O anticorpo policlonal antipéptido imunopurificado (concentração final de 0 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (ou 3,1 μM) foi pré-incubado com 50 μL de proteína S biotinilada (2 $\mu\text{g/mL}$), produzida como descrito no Exemplo 5Aii, durante 1 hora à temperatura ambiente antes da adição a poços revestidos com C4BP. Foram utilizados cinquenta μL de C4BP purificada (10 $\mu\text{g/mL}$) produzida como descrito no Exemplo 5Ai, para revestir e bloquear os poços como descrito no Exemplo 5Aii. A parte restante do ensaio foi realizada como descrito no Exemplo 5A. Os resultados do ensaio estão relatados como percentagem de inibição de ligação a C4BP. A percentagem de inibição de ligação a C4BP é definida como:

$$I = 100\% - 100 \times (\text{delta}_T/\text{delta}_C)$$

em que I é expresso como uma percentagem; e

em que $100\% = \Delta_{\text{min}}$ da quantidade de b-PS que se liga especificamente a poços revestidos com C4BP na ausência de qualquer anticorpo de competição; e

em que Δ_T = alteração na absorvência (405 nm) na presença de anticorpo de competição; e

em que Δ_C = alteração na absorvência (405 nm) na ausência de anticorpo de competição.

Os resultados dos ensaios de competição com anticorpo são apresentados na Tabela 3 e na Figura 5. Os resultados da Tabela 3 indicam que o anticorpo anti-PS(420-434) policlonal foi o único anticorpo que inibiu substancialmente a formação de complexo PS:C4BP. O anti-PS(420-434) inibiu a proteína S nativa a C4BP por mais do que 85% quando presente a uma concentração de 3,1 μM . Quando as concentrações de anti-PS(420-434) (anti-PSP-12) e anti-PS(603-616) (anti-PSP-13*) variaram desde 0 - 200 $\mu\text{g/mL}$, a inibição de formação do complexo PS:C4BP por anti-PS(420-434) superou a inibição por anti-PS(603-616) por aproximadamente 60%. O anti-PS(420-434) inibiu a formação do complexo PS:C4BP em 70% a uma concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, em que metade da inibição total ocorreu a uma concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Assim, o anticorpo anti PS(420-434) liga-se a PS nativa e inibe a ligação de PS a C4BP.

Tabela 3

Anticorpo Policlonal		% de Inibição
anti-PS (54-67)	(anti-PSP-54)	9
anti-PS (561-574)	(anti-PSP-561)	5
anti-PS (408-422)	(anti-PSP-418*)	12
anti-PS (420-434)	(anti-PSP-12)	85
anti-PS (603-616)	(anti-PSP-13*)	15
anti-PS (621-635)	(anti-PSP-14*)	10

Assim, um anticorpo antipeptídeo de PS preferido desta invenção possui a capacidade de imunorreagir com um peptídeo de PS e para inibir a ligação de PS a C4BP. A pesquisa para a inibição da ligação de PS a C4BP é convenientemente realizada através do ensaio de inibição acima.

Uma abordagem alternativa foi utilizada para testar a capacidade dos peptídeos PSP-ansa, PSP-424K e PSP-428K, em comparação com o observado com o peptídeo PSP-12, na inibição da ligação de PS a C4BP, cujo resultado foi detectado em placas revestidas com anticorpo policlonal. Para este ensaio, C4BP, PS biotinilado (b-PS) e peptídeos PSP foram misturados conjuntamente a concentrações respectivas de 3 µg/mL, 0,6 µg/mL e a um intervalo de 0 - 500 µM (V:V:V). As misturas foram mantidas durante 2 horas à temperatura ambiente numa placa de fase fluida para permitir a ligação e/ou inibição de PS a C4BP pelos peptídeos derivados de PS. Após o período de manutenção, 50 µL da mistura foram administrados separadamente aos poços previamente revestidos com 10 µg/mL de anticorpo policlonal IgG anti-C4BP. As misturas foram mantidas durante 1 hora à temperatura ambiente para permitir a ligação de C4BP às placas revestidas com anticorpo anti-C4BP. A ligação de complexos biotinilados às

placas revestidas com anticorpo foi detectada como descrito no Exemplo 5Aii.

O péptido PSP-ansa inibiu a ligação de b-PS a C4BP (detectado pela ligação ou inibição da sua ligação às placas revestidas com anticorpo anti-C4BP) com um IC de aproximadamente 40 μM e uma IC_{90} de aproximadamente 400 μM . Os péptidos PSP-12 e PSP-424K, eram também inibidores mas com menor eficácia. Assim, o péptido PSP-ansa mostrou inibir eficientemente a ligação de PS a C4BP no ensaio de anticorpo acima descrito com resultados comparáveis aos apresentados no Exemplo 5Aii no ensaio de inibição de péptido.

B. Mapeamento de Epitopos de Anti-PS(420-434) Imunopurificado

De modo a identificar os epitopos do anticorpo anti-PS(420-434) foi efectuado um ensaio de ELISA utilizando os péptidos apresentados na Tabela 4. Os péptidos revestiram e bloquearam as placas de microtitulação e foram incubados com anti-PS(420-434) num intervalo de 0 - 5 $\mu\text{g/mL}$ de IgG de acordo com os protocolos de ELISA previamente descritos. O resto do ensaio e o registo dos dados foi efectuado como descrito no Exemplo 2C.

Tabela 4

Sequência de Resíduos de Aminoácidos		Afinidade de Ligação
(1:420-434)	SGIKEIIQEKQNKHC	+++
(2:1-15)	SGIKEIIQEKQNKHS	++
(1:434-420)	SHKNQKEIIQEKIGS	-
(3:1-15)	SGVKEIIQEKQNKHS	++
(2:4-15)	KEIIQEKQNKHC	++
(1:425-433)	IIQEKQNKH	-
(1:418-432)	GASGIKEIIQEKQNK	++
(1:413-427)	NLMKQGASGIKEIIQ	++
(1:421-427)	GIKEIIQ	-
(1:417-424)	QGASGIKE	++
(1:413-422)	NLMKQGASGI	-
(4:1-15)	DIRSWNLMKQGASGIKEIIQ	-
(4:1-11)	DIRSWNLMKQG	-
(4:1-8)	DIRSWNLM	-

Os resultados do ensaio estão apresentados na Tabela 4. Os dados indicam que o anti-PS(420-434) se liga com a maior afinidade a péptidos que contêm a sequência -KEIIQ- (1:423-427) e possui um comprimento de mais de 7 resíduos de aminoácidos, ou a sequência -QEKQNKHS- (1:427-434).

C. Ensaio de Ligação por Competição Utilizando PS na Fase Sólida

Os anticorpos monoclonais preparados no exemplo 4, imuno-reativos com os seus respectivos péptidos de imunização e que demonstraram imuno-reatividade com a proteína S purificada, foram testados quanto à capacidade de inibir a ligação de C4BP a

PS imobilizada, no sistema descrito no Exemplo 2C com as seguintes excepções. O anticorpo monoclonal imunopurificado anti-PS(420-434), designado MAb 56, em intervalos variando entre 0-150 µg/mL foram pré-incubados com proteína S durante 2 horas à temperatura ambiente. O C4BP biotinilado (b-C4BP), produzido por combinação de biotina (Clontech) com C4BP e seguindo as instruções do fabricante, foi aplicado nos poços numa concentração final de 1 µg/mL e mantida durante 1 hora à temperatura ambiente. O resto do ensaio e o registo dos dados foi como descrito em 2C.

Os resultados apresentam um decréscimo substancial na formação do complexo b-C4BP:PS com o aumento da concentração de MAb 56, comparada com o controlo IgG não imune. Assim, o MAb 56 inibe a ligação de C4BP a PS.

Uma abordagem alternativa foi utilizada para testar a capacidade dos péptidos, PSP-ansa, PSP-424K e PSP-428K, em comparação com o observado no péptido PSP-12, em inibir a ligação de PS a C4BP, resultado que foi detectado em placas revestidas com anticorpo monoclonal. Para este ensaio, C4BP biotinilado (b-C4BP), os péptidos PS e PSP foram misturados em conjunto nas concentrações respectivas de 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL e num intervalo de 0 - 500 µM (V:V:V). As misturas foram mantidas durante 2 horas à temperatura ambiente numa placa de fase fluida para permitir a ligação e/ou inibição de PS a C4BP pelos péptidos derivados de PS. Após o período de manutenção, 50 µL da mistura foram administrados separadamente a poços previamente revestidos com 10 µg/mL de MAb S-7 (ATCC N°. HE 80819). As misturas foram mantidas durante 1 hora à temperatura ambiente para permitir a ligação de C4BP às placas revestidas com o anticorpo MAb S-7. A ligação de complexos biotinilados às placas

revestidas com anticorpo foi detectada como descrito no Exemplo 5Aii.

O péptido PSP-ansa inibiu a ligação de b-PS a C4BP (detectada pela ligação ou inibição de ligação a placas revestidas com anticorpo MAb S-7) com uma IC_{50} de aproximadamente 35 μ M e uma IC_{90} de aproximadamente 100 μ M. Os péptidos, PSP-12 e PSP-424K foram também inibidores, mas com uma eficiência mais baixa possuindo uma IC_{50} de aproximadamente 50 μ M e uma IC_{90} de aproximadamente 250 μ M. Assim, o péptido PSP-ansa apresentou inibição eficiente de ligação de PS a C4BP no ensaio de anticorpo acima descrito com resultados comparáveis ao apresentado no Exemplo 5Aii com o ensaio utilizando anticorpo policlonal anti-C4BP e o Exemplo 5Aii no ensaio de inibição de péptido.

6. Imunoensaios para Detectar Proteína S Livre (PS_f)

A. ELISA com Anti- PS_T em Fase Sólida

Para os ensaios descritos abaixo, PS_T é definido como proteína S "total" quer se encontre em fase líquida ou sólida. PS_T inclui proteína S complexada com qualquer outra proteína incluindo C4BP, ou proteína S livre de qualquer outra proteína. A PS_f é definida como a proteína S livre de complexação com C4BP, e que seja capaz de, e esteja disponível para, complexação com C4BP.

Um anticorpo monoclonal foi preparado como descrito no Exemplo 4, mas utilizando proteína S purificada como o imunogénio. O MAb foi pesquisado utilizando os métodos do

Exemplo 4 para a sua capacidade de se ligar a proteína 5 complexada com C4BP. O MAb resultante com as características desejadas foi designado LJS S-7 (ou MAb S-7) (ATCC #HB 10819). O MAb S-7 purificado é utilizado para revestir poços de placas de microtitulação e como bloqueador como descrito no Exemplo 3. É adicionado 50 µL/poço de uma diluição em série (1:500 a 1:64000) de proteína S purificada aos poços contendo MAb S-7 para produzir uma curva de concentração padrão. Adicionalmente, diluições em série 1:2000 a 1:4000 de sangue de dador em tampão de lavagem é misturado para separar poços que são revestidos de forma semelhante. Após uma incubação de 2 horas à temperatura ambiente, os padrões e as amostras diluídas são removidas. Seguidamente, MAb S-7 biotinilado, formado pelos métodos descritos em 5A, são adicionados a cada poço, e o resto do ensaio é realizado como descrito no Exemplo 2C para detectar produtos de imunorreacção contendo PS livre. As concentrações de plasma humano normal de C4BP e PST foram medidas a 155 µg/mL (270 nM) e 26 µg/mL (350 nM), respectivamente.

Os resultados indicam que o MAb S-7 imobilizado captura PS total e posteriormente o anticorpo específico para PS_F, MAb 56. Assim, esta abordagem permite a detecção de PS_F em amostras de fluido.

B. Ensaio Para PS_F utilizando Anti-PS_F em Fase Sólida

Para demonstrar que o MAb 56 reconhece apenas proteína S livre e é útil para captura selectiva de proteína S livre, foi preparado MAb 56 em fase sólida e a proteína S livre foi imunoadsorvida de plasma humano normal. Com esse fim, o anticorpo monoclonal MAb 56 preparado no Exemplo 4 foi acoplado

a Sepharose 4B activada com CNBr (Pharmacia) seguindo as instruções do fabricante (3 mg de IgG/mL de gel). De seguida, 400 µL de plasma humano normal (George King Inc., Overland KS) foi mantido com 100 µL de esferas molhadas contendo o anticorpo monoclonal imobilizado MAb 56 em tampão TES durante 90 minutos a 8 °C em agitação contínua. A mistura plasma/anticorpo MAb 56 foi centrifugada a 3000 rpm a 8 °C. O sobrenadante foi então dividido em fracções e congelado a -70 °C para análise subsequente. Duas outras amostras de plasma foram utilizadas como controlos no método de adsorção acima para analisar a especificidade do tratamento com MAb 56. Para uma amostra, uma fracção idêntica de 400 µL de plasma normal foi mantida nas mesmas condições sem sepharose. Para outra amostra, foi incubado 400 µL de plasma humano normal com 100 µL de MAb S-7 anti-PST acoplado a esferas de sepharose nas mesmas condições. O MAb S-7 reconhece ambos os complexos e proteína S livre, e previamente mostrou adsorver todo o antigénio de proteína S do plasma.

Para identificar visualmente proteína S livre e complexada nas várias fracções adsorvidas produzidas acima, foi realizada imunoelectroforese cruzada de duas dimensões (CIEP) como descrito por Laurell *et al.*, *Anal. Biochem.* 10:358-361 (1985). Primeiro, 30 µL de plasma tratado ou de um plasma controlo que não foi exposto a sepharose, foram aplicados num gel contendo agarose a 1%, EDTA a 0,3 mM/L em tampão Tris-glicina pH 8,7. O gel foi vertido numa película Gel-Bond parcialmente coberta com uma peça de um dispositivo de metal para preservar uma área para a agarose utilizada para a segunda dimensão de electroforese. A electroforese na primeira dimensão foi realizada a 4 °C a 1 mM/cm durante 45 mm. Após finalização da electroforese na primeira dimensão, foi aplicado o gel para a segunda dimensão contendo EDTA a 5 mmol/L, polietilenoglicol a 3% e anti-soro

anti-PS de cabra a uma diluição de 1/400. A electroforese na segunda dimensão foi realizada a 22 °C e 1,2 mA/cm durante 18 horas. As placas foram lavadas, secas e coradas como descrito por Laurell *et al.*, *supra*.

Os resultados da electroforese 2-D são apresentados na Figura 6, revelaram a ausência da banda de PS_F na localização esperada para plasma adsorvido a MAb 56 (comparado com a, localização da banda de PS_F para plasma não tratado). Adicionalmente, o complexo C4BP:PS produziu uma banda na localização esperada para o plasma adsorvido a MP 56. Além disso, o MAb 56 liga-se especificamente a espécie de proteína S que não está complexada com C4BP, *i. e.*, é PS livre.

Alternativamente, para identificar anticorpos anti-PS(420-434) policlonais de coelho que apenas reconhecem proteína S livre, 3 mg de anticorpo anti-PS(420-434) purificado por imunoafinidade, preparados no Exemplo 3, foram acoplados a 1 mL de sepharose 4B-CNBr ressuspensa (Pharmacia) de acordo com as instruções do fabricante. Após bloquear as esferas com etanolamina a 0,1 M pH 9,0, as esferas foram vertidas numa coluna de cromatografia (1 x 1 cm) que foi equilibrada com tampão TBS à temperatura ambiente.

Diferentes misturas de proteína S complexada e livre, preparadas como descrito nos Exemplos 2C e 5A foram passadas pela coluna contendo o anti-PS(420-434) a um fluxo de 1 mL/min. Após lavagem com 50 µL de tampão TBS, a coluna foi eluída com 10 mL de tiocianato a 3 M em tampão TBS. As fracções eluídas foram dialisadas em tampão TBS e as amostras resultantes foram sujeitas a SDS-PAGE utilizando géis de gradiente 4-15%. Os géis foram corados com prata de modo a analisar as diferentes bandas

de proteínas, ou transferidas para membrana de nitrocelulose e sujeitas a transferência imunológica com um anticorpo específico contra a proteína S ou C4BP. Como um controlo, outra coluna de afinidade com diferentes anticorpos policlonais anti-PS de cabra acoplados a sepharose foram utilizados para adsorver toda a proteína S.

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que apenas proteína S livre foi eluída da coluna. Isto indica que, o policlonal anti-PS(420-434) apenas se liga a proteína S livre e não se liga ao complexo PS:C4BP.

Estes resultados também demonstram que os anticorpos anti-PS_F desta invenção são úteis para purificar PS livre de fluidos biológicos complexos, tais como sangue, plasma e produtos derivados do plasma.

7. Imunoensaio para Detectar C4BP Competente Utilizando Péptido PSP-12)

A. Ligação de C4BP a PSP-12 Imobilizada

Foram utilizados separadamente cinquenta µL de péptido PSP-12 sintético (20 µM) ou a proteína S nativa (10 µg/mL) diluída em tampão Na₂CO₃ a 0,02 M pH 9,0 para revestir poços de microtitulação durante 1 hora a 37 °C. A amostra de incubação foi descartada e os poços foram bloqueados com 200 µL de BSA a 10% em Tris-HCL a 0,05 M, NaCl a 0,1 M, pH 7,4 (TBS) e armazenado a 4 °C até utilização. Os poços foram então lavados 3 vezes com BSA a 0,2% em TBS, Ca⁺⁺ a 5 mM e Tween-20 a 0,02% (tampão de lavagem). Após a lavagem, 50 µL de diluições seriadas

de C4BP biotiniladas (b-C4BP) em concentrações variando de 0-20 µg/mL foram adicionadas a cada poço. A solução foi mantida durante 2 horas à temperatura ambiente para permitir que C4BP se complexasse com (ligasse a) a PS ou PSP-12 nos poços. O resto do ensaio foi realizado como descrito no Exemplo 2C. Os resultados indicaram que o péptido PSP-12 e a PS purificada se ligam a C4BP ao mesmo nível.

B. Ensaio de Imunocaptura com C4BP

De modo a detectar C4BP competente presente numa amostra de fluido vascular, poços de microtitulação foram revestidos com o péptido PSP-12 e bloqueados como descrito na secção 7A.

Aos poços revestidos com PSP-12 são adicionados 50 µL/poço de diluições em série de C4BP purificada (1:500 a 1:64000) preparada como no Exemplo 5A ou NHP (diluições 1:2000 - 1:4000 de amostras desconhecidas), em tampão de lavagem, são misturadas a cada um dos poços. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, os padrões e as amostras da diluição são removidos e os poços são lavados 3 vezes com tampão de lavagem. A seguir, anticorpos policlonais anti-C4BP de coelho purificados por imunoafinidade (10 µg/mL) são adicionados a cada poço. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente os anticorpos policlonais são removidos por lavagem com tampão de lavagem. Este passo é seguido por outra hora de incubação com 50 µL/poço de IgG anti-coelho de cabra biotinilado (1 µg/mL). A seguir, 1 µg/mL de fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (SAAP) (50 µL/poço) é adicionado a cada poço e mantido durante 30 minutos à temperatura ambiente. A SAAP é removida e os poços são lavados 6 vezes com tampão de lavagem. Cinco mg/mL de PNPP

(100 µL/poço) em dietilamina a 0,1 M/tampão HCl, pH 9,0, é então misturado a cada poço. A alteração da absorvência a 405 nm é medida utilizando um leitor de Microplacas EL 312 (BIO-TEK Instruments Inc., Winooski VT) e os resultados são analisados utilizando um pacote de programas informáticos de cinética (Kineticalc, Bio-tek). Os resultados mostram ligação apenas nos poços de controlo positivo e também nas diluições mais baixas de NHP indicando captura de C4BP.

C. Ensaio de Imunocaptura Monoclonal de C4BP

Anticorpos monoclonais purificados contra a cadeia α de C4BP (disponível de Biodesign International Kennebunkport, ME) (10 µg/mL) em 50 µL de tampão Na₂CO₃ a 0,02 M, pH 9,0 são utilizados para revestir os poços de placas de microtitulação durante 1 hora a 37 °C. Os poços são bloqueados com 200 µL de BSA a 10% em TBS e armazenados a 4 °C até utilização. Antes da utilização, os poços são lavados três vezes com BSA a 0,2% em TBS, Ca⁺⁺ a 5 mM, azida de sódio a 0,02% e Tween-20 a 0,02%. São adicionadas diluições seriadas de 1:500 a 1:64000 em 50 µL/poço de C4BP purificada ou NHP, para produzir uma curva de concentração padrão. Adicionalmente, diluições em série de 1:2000 - 1:4000 de amostras de plasma humano desconhecido em tampão de lavagem são adicionadas aos poços. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente os padrões e as diluições da amostra são removidos e os poços são lavados 3 vezes com tampão de lavagem.

De seguida, b-PSP sintético é diluído para concentrações (0-200 µM) em tampão de lavagem e é incubado nos poços contendo C4BP ligado aos anticorpos policlonais anti-C4BP durante 1 hora

à temperatura ambiente. O restante do ensaio é realizado como descrito no Exemplo 2C. Os resultados demonstram a ligação nos poços do controlo positivo apenas nas diluições mais baixas de NHP, indicando captura de b-PSP-12.

A presente especificação escrita é considerada ser suficiente para permitir a um especialista na técnica para praticar a invenção. A presente invenção não está limitada no seu âmbito pelas linhas celulares depositadas, uma vez que se pretende que a realização depositada seja um simples ilustração de um aspecto da invenção e quaisquer linhas celulares que são funcionalmente equivalentes estão dentro do âmbito desta invenção. O depósito de materiais aqui apresentado não constitui um reconhecimento de que a descrição escrita apresentada aqui contida seja inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto da invenção, incluindo o melhor modo desta, nem os depósitos devem ser entendidos como limitantes do âmbito das reivindicações para as ilustrações específicas que eles representam. De facto, várias modificações da invenção em adição aquelas aqui apresentadas e descritas tornar-se-ão evidentes aos especialistas da técnica a partir da presente descrição.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Griffin, John H.
Fernandez, Jose A.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: POLIPÉPTIDOS DE PROTEÍNA
S E ANTICORPOS ANTIPÉPTIDO QUE INIBEM A LIGAÇÃO DA

PROTEÍNA S À PROTEÍNA DE LIGAÇÃO C4b, SISTEMAS DE
DIAGNÓSTICO E MÉTODOS TERAPÊUTICOS

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 13

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) REMETENTE: The Scripps Research
Institute. Office of Patent Counsel

(B) RUA: 10666 North Torrey Pines Road, Mail
Drop TPC8

(C) CIDADE: La Jolla

(D) ESTADO: CA

(E) PAÍS: E.U.A.

(F) CÓDIGO POSTAL: 92037

(v) FORMA DE LEITURA EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: disquete

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

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

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

(vi) DATA DO PEDIDO CORRENTE:

(A) NÚMERO DE PEDIDO: US

(B) DATA DO PEDIDO: 01-JUL-1992

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DATA DO PEDIDO ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE PEDIDO: US 07/724746

(B) DATA DO PEDIDO: 02-JUL-1991

(viii) INFORMAÇÃO DE MANDATÁRIO /AGENTE:

(A) NOME: Fitting, Thomas

(B) NÚMERO DE REGISTO: 34 163

(C) REFERÊNCIA/ NÚMERO DE REGISTO: SCR1119P

(ix) INFORMAÇÃO DE TELECOMUNICAÇÕES:

(A) TELEFONE: 619-554-2937

(B) TELEFAX: 619-554-6312

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 635 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:1:

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

Arg Thr Tyr Asp Ser Glu Gly Val Ile Leu Tyr Ala Glu Ser Ile Asp
 290 295 300
 His Ser Ala Trp Leu Leu Ile Ala Leu Arg Gly Gly Lys Ile Glu Val
 305 310 315 320
 Gln Leu Lys Asn Glu His Thr Ser Lys Ile Thr Thr Gly Gly Asp Val
 325 330 335
 Ile Asn Asn Gly Leu Trp Asn Met Val Ser Val Glu Glu Leu Glu His
 340 345 350
 Ser Ile Ser Ile Lys Ile Ala Lys Glu Ala Val Met Asp Ile Asn Lys
 355 360 365
 Pro Gly Pro Leu Phe Lys Pro Glu Asn Gly Leu Leu Glu Thr Lys Val
 370 375 380
 Tyr Phe Ala Gly Phe Pro Arg Lys Val Glu Ser Glu Leu Ile Lys Pro
 385 390 395 400
 Ile Asn Pro Arg Leu Asp Gly Cys Ile Arg Ser Trp Asn Leu Met Lys
 405 410 415
 Gln Gly Ala Ser Gly Ile Lys Glu Ile Ile Gln Glu Lys Gln Asn Lys
 420 425 430
 His Cys Leu Val Thr Val Glu Lys Gly Ser Tyr Tyr Pro Gly Ser Gly
 435 440 445
 Ile Ala Gln Phe His Ile Asp Tyr Asn Asn Val Ser Ser Ala Glu Gly
 450 455 460
 Trp His Val Asn Val Thr Leu Asn Ile Arg Pro Ser Thr Gly Thr Gly
 465 470 475 480
 Val Met Leu Ala Leu Val Ser Gly Asn Asn Thr Val Pro Phe Ala Val
 485 490 495
 Ser Leu Val Asp Ser Thr Ser Glu Lys Ser Gln Asp Ile Leu Leu Ser
 500 505 510
 Val Glu Asn Thr Val Ile Tyr Arg Ile Gln Ala Leu Ser Leu Cys Ser
 515 520 525
 Asp Gln Gln Ser His Leu Glu Phe Arg Val Asn Arg Asn Asn Leu Glu
 530 535 540

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:3:

Ser Gly Val Lys Glu Ile Ile Gln Glu Lys Gln Asn Lys His Ser
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:4:

Asp Ile Arg Ser Trp Asn Leu Met Lys Gln Gly Ala Ser Gly Ile
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:5:

Ser Pro Glu Gly Tyr Arg Tyr Asn Leu Lys Ser Lys Ser Ser Glu
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:6:

Ile Asn Gly Val Gln Leu Asp Leu Asp Glu Ala Ile Ser Lys Cys
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:7:

Arg Ala His Ser Cys Pro Ser Val Trp Lys Lys Thr Lys Asn Cys
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:8:

Ser Asn Lys Thr Lys Lys Trp Val Ser Pro Ser Ser His Ala Arg
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 3

(D) OUTRAS INFORMAÇÕES: /nota= "Em que X é
Ile ou Val, DE UM MODO PREFERIDO Ile."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:9:

Ser	Gly	Xaa	Lys	Glu	Ile	Ile	Gln	Glu	Lys	Gln	Asn	Lys	His
1				5					10				

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 8

(D) OUTRAS INFORIMAÇÕES: /nota= "Em que X é Cys ou Ser."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:10:

Gln Glu Lys Gln Asn Lys His Xaa
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 26 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:11:

Cys Ile Arg Ser Trp Asn Leu Met Lys Gln Gly Ala Ser Ile Lys Glu
1 5 10 15

Ile Ile Gln Glu Lys Gln Asn Lys His Cys
20 25

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:12:

Ser Gly Ile Lys Lys Ile Ile Gln Glu Lys Gln Asn Lys Cys
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 14 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:13:

Ser Gly Ile Lys Glu Ile Ile Gln Lys Lys Gln Asn Lys Cys
1 5 10

Lisboa, 8 de Março de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido de proteína S possuindo um comprimento de não mais do que 100 resíduos de aminoácidos e incluindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e resíduos correspondentes são apresentados em parêntesis, representada pela fórmula seleccionada a partir de:

-QEKNQKH- e (1:427-433)

-SGIKKIIQEK-, (12:1-10)

e em que o referido polipéptido inibe a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b.

2. Polipéptido da reivindicação 1 em que o referido polipéptido inclui uma sequência de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e resíduos correspondentes são apresentados em parêntesis, representada pela fórmula seleccionada a partir de:

-QEKNQKH- e (1:427-434)

-SGIKKIIQEKQKNC-, (12:1-14)

em que X é C ou S.

3. Polipéptido da reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o referido polipéptido compreende uma sequência de resíduos de aminoácidos correspondendo a uma porção da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína S apresentada na SEQ ID N° 1.

4. Polipéptido da reivindicação 1, em que o referido polipéptido possui uma sequência de resíduos de aminoácidos,

cujas SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representado pela fórmula:

QEKQNKHS (1:427-434)

5. Anticorpo que inibe a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b e que imunorreage com:

(a) proteína S, e

(b) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cujas SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representada pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

mas não imunorreage com o polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula: CTCKPGWQGEKCEFDINECKDPSNINGGCS (1:103-131).

6. Anticorpo da reivindicação 5, em que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal.
7. Utilização de um polipéptido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4 na preparação de um medicamento para tratar a trombose num doente.
8. Utilização da reivindicação 7, em que o referido polipéptido é para administração numa quantidade suficiente para produzir uma concentração intravascular de polipéptido de

proteína S no sangue do referido doente, no intervalo de 0,1 a 100 micromolar.

9. Utilização de um anticorpo de acordo com a reivindicação 5 na preparação de um medicamento para tratar a trombose num doente.
10. Utilização da reivindicação 9, em que o referido anticorpo é para administração numa quantidade suficiente para produzir uma concentração intravascular de anticorpo no sangue do referido doente no intervalo de 0,1 a 100 µg/mL.
11. Composição compreendendo um excipiente farmacologicamente aceitável e um polipéptido de proteína S seleccionado do grupo de polipéptidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 numa quantidade suficiente para inibir a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b.
12. Composição da reivindicação 11, em que a referida quantidade possui pelo menos 0,1 por cento em peso do polipéptido de proteína S por peso da composição total.
13. Composição compreendendo um excipiente farmacologicamente aceitável e um anticorpo de acordo com a reivindicação 5 numa quantidade suficiente para inibir a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b.
14. Composição da reivindicação 13, em que a referida quantidade inibidora de APC é, pelo menos, 0,1 por cento em peso de anticorpo por peso da composição total.

15. Método *in vitro* para inibir a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b numa composição aquosa compreendendo o contacto da referida composição aquosa com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido de proteína S seleccionado do grupo de polipéptidos de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4.
16. Método *in vitro* para inibir a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b numa composição aquosa compreendendo o contacto da referida composição aquosa com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de acordo com a reivindicação 5.
17. Método de ensaio da quantidade de proteína S livre numa amostra de fluido vascular compreendendo os passos de:

(a) formar uma mistura de imunorreacção misturando uma amostra de fluido vascular com um anticorpo anti-proteína S que imunorreage com:

(i) proteína S, e

(ii) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representada pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

mas não imunorreage com o polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula: CTCKPGWQGEKCEFDINECKDPSNINGGCS (1:103-131), e

estando o referido anticorpo operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de imunorreacção possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo PS_F na fase sólida, e

(c) determinar a quantidade de produto formado no passo (b)

18. Método da reivindicação 17, em que a referida determinação no passo (c) compreende os passos de:

(i) misturar o referido produto de imunorreacção contendo PS_F na fase sólida com um segundo anticorpo para formar uma segunda mistura de imunorreacção possuindo uma fase líquida e uma fase sólida, possuindo o referido segundo anticorpo a capacidade de imunorreagir com o produto de imunorreacção contendo PS_F ;

(ii) manter a referida segunda mistura de reacção durante um período de tempo suficiente para o referido segundo anticorpo imunorreagir com o produto de imunorreacção e formar um segundo produto de imunorreacção na fase sólida; e

(iii) determinar a quantidade de segundo anticorpo presente no segundo produto de imunorreacção e, desse

modo, a quantidade de produto de imunorreacção formado no passo (b).

19. Método da reivindicação 17, em que o referido anticorpo utilizado no passo (a) é um anticorpo monoclonal.

20. Método de ensaio da quantidade de proteína S livre numa amostra de fluido vascular compreendendo os passos de:

(a) formar uma mistura de imunorreacção de competição misturando uma amostra de fluido vascular com:

(1) um anticorpo antiproteína S que imunorreage com:

(i) proteína S, e

(ii) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representado pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

mas não imunorreage com o polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula: CTCKPGWQGEKCEFDINECKDPSNINGGCS (1:103-131), e estando o referido anticorpo operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de imunorreacção de competição possua uma fase líquida e uma fase sólida, e

(2) um polipéptido imunorreactivo com o anticorpo, estando o referido polipéptido operacionalmente ligado a um meio de indicação;

(b) manter a referida mistura de imunorreacção de competição durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo meio de indicação na fase sólida, e

(c) determinar a quantidade de meio de indicação presente no produto formado no passo (b), e assim a quantidade de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

21. Método de ensaio da quantidade de proteína S livre numa amostra de fluido vascular compreendendo os passos de:

(a) formar uma primeira mistura de imunorreacção misturando uma amostra de fluido vascular com um primeiro anticorpo antiproteína S que imunorreage com proteína S, mas não inibe a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b, estando o referido primeiro anticorpo operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo a que a primeira mistura de imunorreacção possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida primeira mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo proteína S na fase sólida;

(c) formar uma segunda mistura de imunorreacção misturando o referido produto de imunorreacção contendo proteína S na fase sólida com um segundo anticorpo antiproteína S que imunorreage com:

(i) proteína S, e

(ii) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representado pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK, (12:1-14)

mas não imunorreage com o polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula:
CTCKPGWQGEKCEFDINECKDPSNINGGCS (1:103-131);

(d) manter a referida segunda mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para o referido segundo anticorpo imunorreagir com a proteína S na fase sólida e formar um segundo produto de imunorreacção contendo proteína S na fase sólida; e

(e) determinar a quantidade de produto formado no passo (d) e assim a quantidade de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

22. Método da reivindicação 21, em que o referido primeiro anticorpo é o anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma LJS S-7 possuindo o número de acesso da ATCC, HB 10819.

23. Método de ensaio da quantidade de proteína S livre numa amostra de fluido vascular compreendendo os passos de:

(a) formar uma mistura de imunorreacção de competição misturando uma amostra de fluido vascular com:

(1) um anticorpo antiproteína S que imunorreage com:

(i) proteína S, e

(ii) um polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representado pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

mas não imunorreage com o polipéptido possuindo uma sequência de resíduos de aminoácidos representada pela fórmula: CTCKPGWQGEKCEFDINECKDPSNINGGCS (1:103-131), e

(2) um polipéptido imunorreactivo com o anticorpo, estando o referido polipéptido operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de imunorreacção de competição possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida mistura de imunorreacção de competição durante um período de tempo suficiente para formar um produto de imunorreacção contendo anticorpo na fase sólida, e

(c) determinar a quantidade de anticorpo presente no produto formado no passo (b), e assim a quantidade de proteína S livre na amostra de fluido vascular.

24. Método da reivindicação 23, em que o referido anticorpo está operacionalmente ligado a um meio de indicação e a referida determinação no passo (c), compreende a determinação da quantidade de meio de indicação presente no produto formado no passo (b).

25. Método para a determinação da quantidade da proteína de ligação C4b numa amostra de fluido vascular que é capaz de ligar a proteína S, compreendendo os passos de:

(a) formar uma mistura de reacção de ligação misturando uma amostra de fluido vascular com um polipéptido da proteína S, possuindo um comprimento de não mais do que 100 resíduos de aminoácidos e incluindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cujos SEQ ID N° e correspondentes resíduos são apresentados entre parêntesis, representada pela fórmula:

-SGIKKIIQEK- (12:1-10)

em que o referido polipéptido inibe a ligação da proteína S à proteína de ligação C4b, e o referido polipéptido está operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de reacção de ligação possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida mistura de reacção de ligação durante um período de tempo suficiente para qualquer proteína de ligação C4b competente presente na amostra de fluido vascular se ligar ao polipéptido e formar um produto de reacção contendo a proteína de ligação C4b na fase sólida, e

(c) determinar a quantidade de proteína de ligação C4b presente no produto de reacção na fase sólida.

26. Método da reivindicação 25, em que a referida determinação compreende os passos de:

(i) misturar o produto de reacção formado no passo (b) com um anticorpo antiproteína de ligação C4b, que imunorreage com a proteína de ligação C4b para formar uma mistura de imunorreacção;

(ii) manter a referida mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para o anticorpo imunorreagir com qualquer proteína de ligação C4b na fase sólida e formar um produto de imunorreacção de fase sólida; e

(iii) determinar a quantidade de anticorpo presente no produto de imunorreacção na fase sólida formado no

passo (ii), e assim a quantidade de proteína de ligação C4b competente na amostra de fluido vascular.

27. Método da reivindicação 25, em que o referido anticorpo imunorreage com a subunidade alfa da proteína de ligação C4b.

28. Método da reivindicação 25, em que o referido polipéptido possui uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos de aminoácidos são apresentados em parêntesis, representado pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

29. Método para a determinação da quantidade de proteína de ligação C4b numa amostra de fluido vascular que é capaz de ligar a proteína S compreendendo os passos de:

(a) formar uma mistura de imunorreacção de competição por mistura de uma amostra de fluido vascular com:

(i) um polipéptido da proteína S possuindo um comprimento de não mais do que 100 resíduos de aminoácidos e incluindo uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos de aminoácidos são apresentados entre parêntesis, representado pela fórmula:

-SGIKKIIQEK- (12:1-10)

em que o referido polipéptido inibe a ligação de proteína S à proteína de ligação C4b, e

(ii) um anticorpo antiproteína de ligação C4b que imunorreage com a proteína de ligação C4b, estando o referido anticorpo operacionalmente ligado a uma matriz sólida de modo que a mistura de imunorreacção possua uma fase líquida e uma fase sólida;

(b) manter a referida mistura de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para qualquer proteína de ligação C4b competente presente na amostra de fluido vascular se ligar ao anticorpo e formar um produto de imunorreacção na fase sólida, e para o polipéptido se ligar ao referido produto de imunorreacção; e

(c) determinar a quantidade de polipéptido presente no produto de imunorreacção na fase sólida, e assim a quantidade de proteína de ligação C4b competente.

30. Método da reivindicação 29, em que o referido anticorpo imunorreage com a subunidade alfa da proteína de ligação C4b.

31. Método da reivindicação 29, em que o referido polipéptido possui uma sequência de resíduos de aminoácidos, cuja SEQ ID N° e correspondentes resíduos de aminoácidos são apresentados entre parêntesis, representado pela fórmula:

SGIKKIIQEKQNK (12:1-14)

32. Método para purificar a proteína S livre (PS_F) a partir de uma solução aquosa compreendendo os passos de:

(a) misturar uma solução aquosa que contém PS_F com um anticorpo de acordo com a reivindicação 5, que imunorreage especificamente com PS_F para formar uma mistura de imunorreacção;

(b) manter a mistura de imunorreacção em condições de imunorreacção durante um período de tempo suficiente para o PS_F em solução imunorreagir com o referido anticorpo e formar um produto de imunorreacção; e

(c) recuperar o produto de imunorreacção da mistura de imunorreacção, formando assim PS_F purificado.

33. Método da reivindicação 32, em que o referido anticorpo é um anticorpo imobilizado operacionalmente ligado a um suporte sólido de modo que a mistura de imunorreacção possua uma fase líquida e uma fase sólida, e o produto de imunorreacção formado esteja na fase sólida.

34. Método da reivindicação 33, em que o referido passo de recuperação no passo (c) compreende os passos de:

(i) misturar o produto de imunorreacção formado no passo (b) com um tampão de eluição para formar uma mistura de eluição;

(ii) manter a mistura de eluição durante um período de tempo suficiente para eluir o PS_F do produto de imunorreacção na fase sólida, na fase sólida, para a fase líquida; e

(iii) recolher a fase líquida, recuperando assim o PS_F eluído e purificado.

35. Composição de imunoafinidade para purificar proteína S livre (PS_F) de uma solução aquosa, compreendendo um anticorpo de acordo com a reivindicação 5, operacionalmente ligado a um suporte sólido.

Lisboa, 8 de Março de 2007

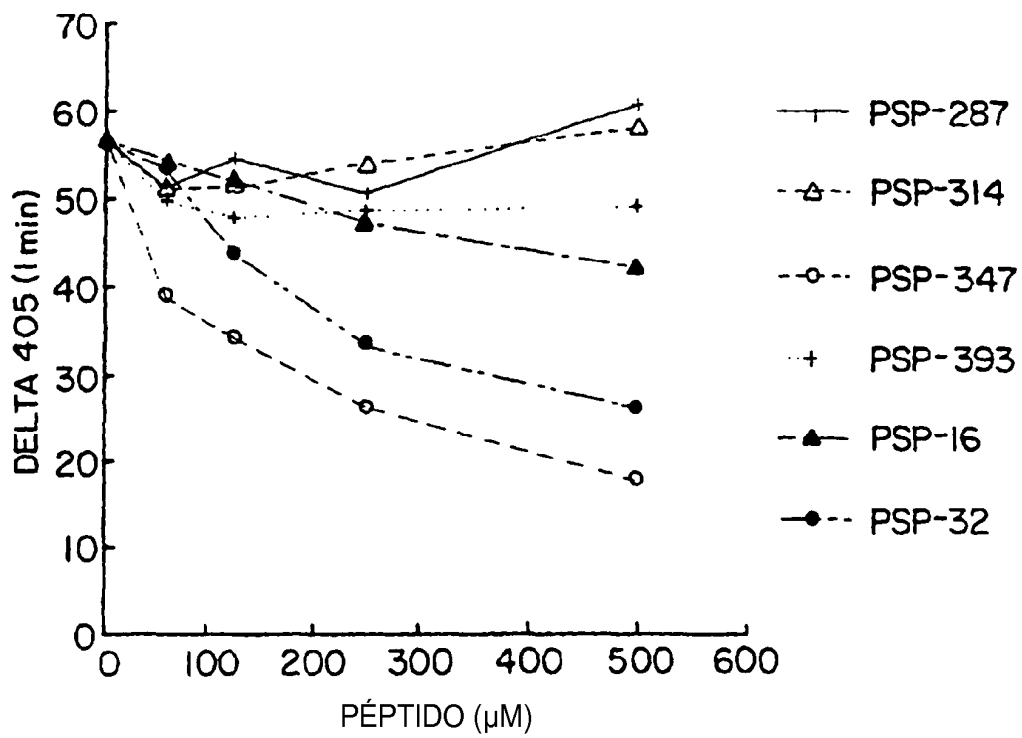


FIG. 1

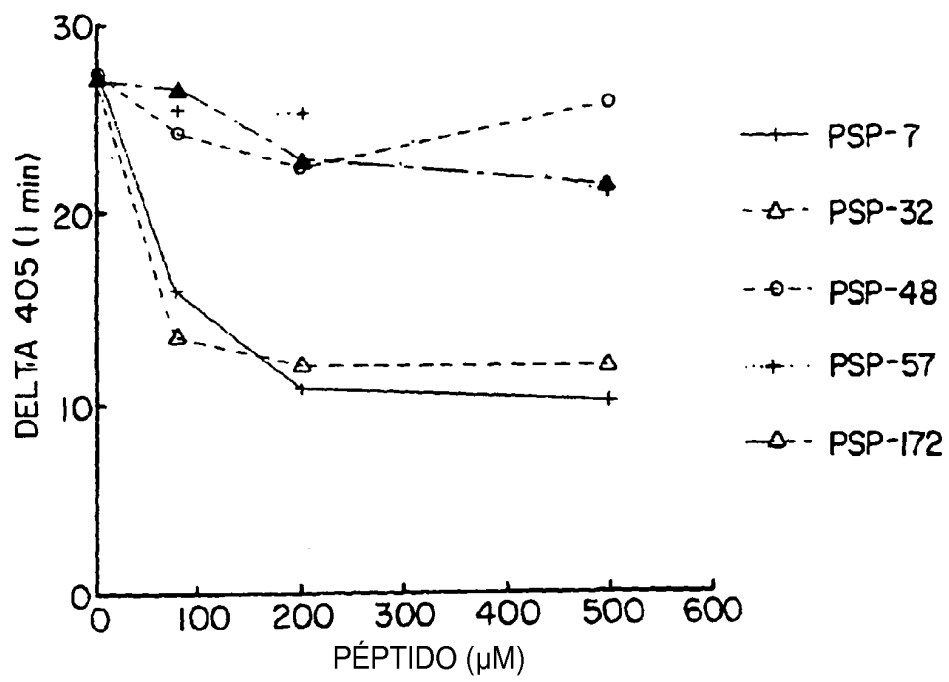


FIG. 2

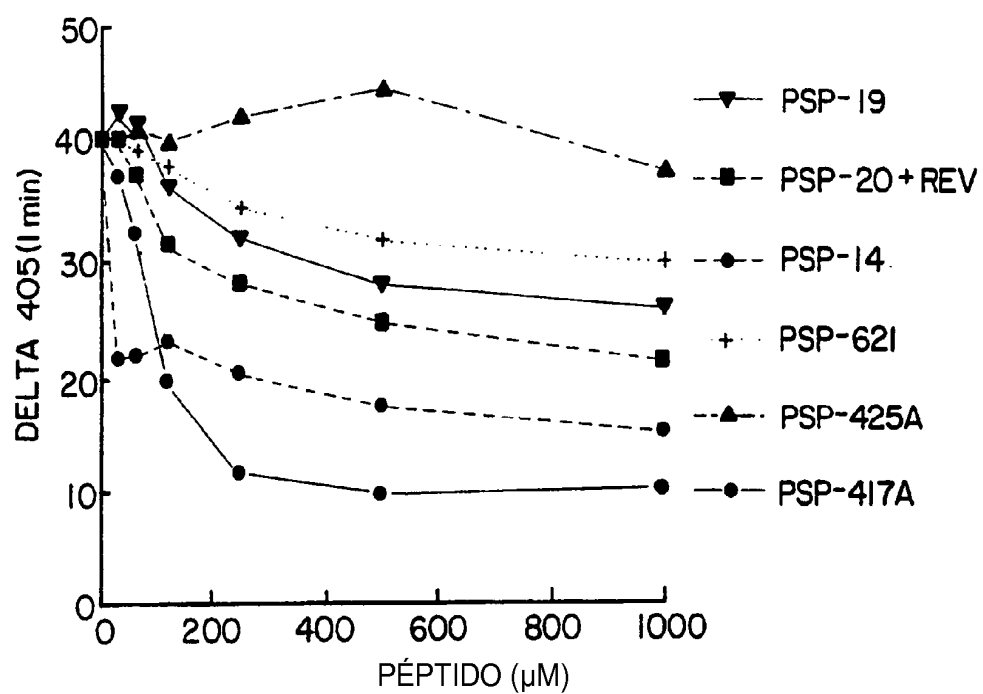


FIG. 3

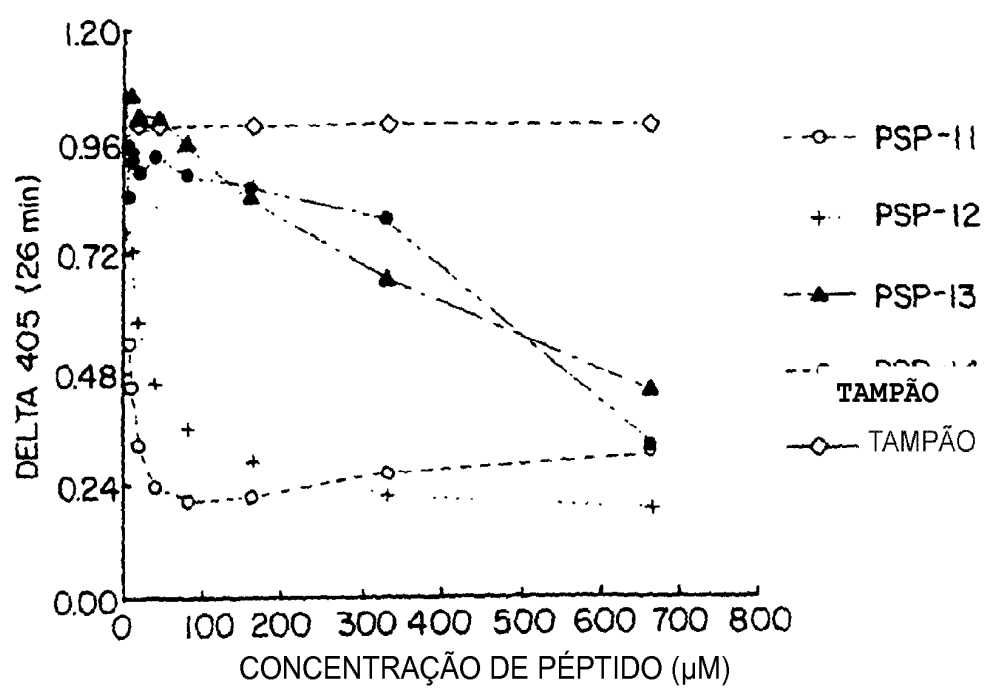


FIG. 4

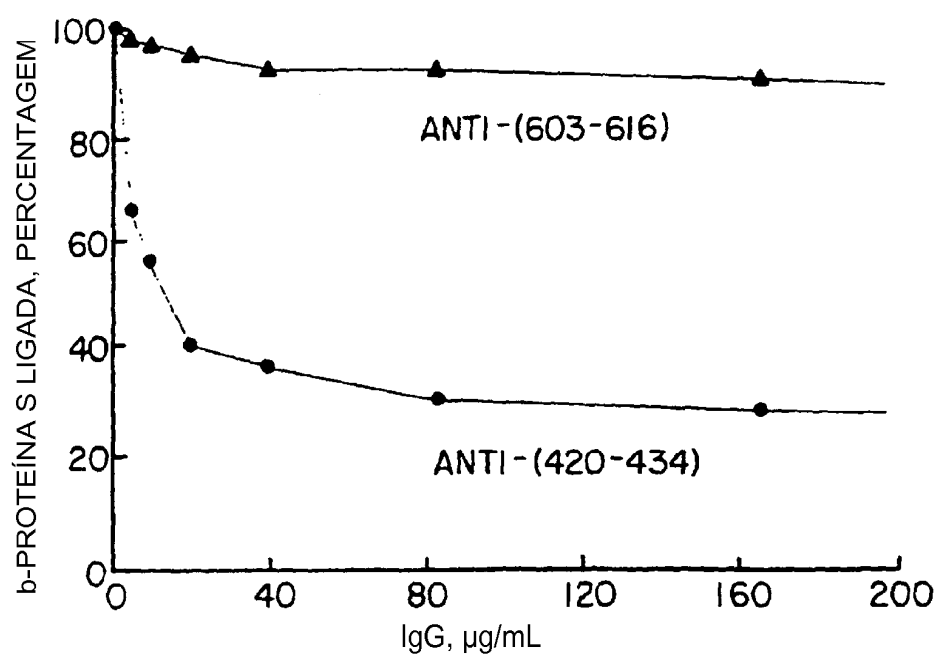


FIG. 5

PLASMA NORMAL

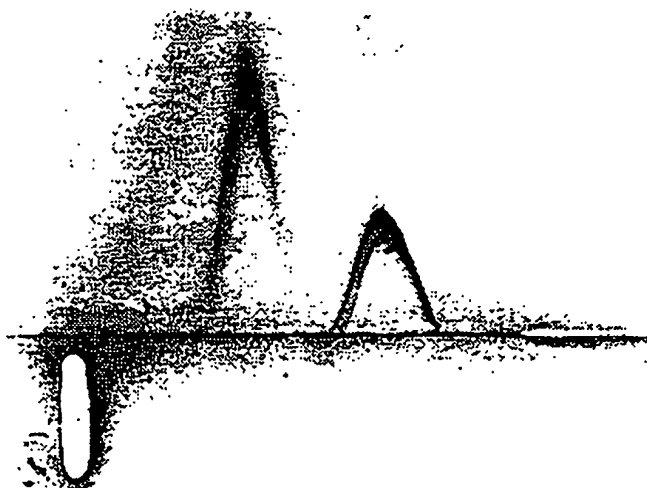
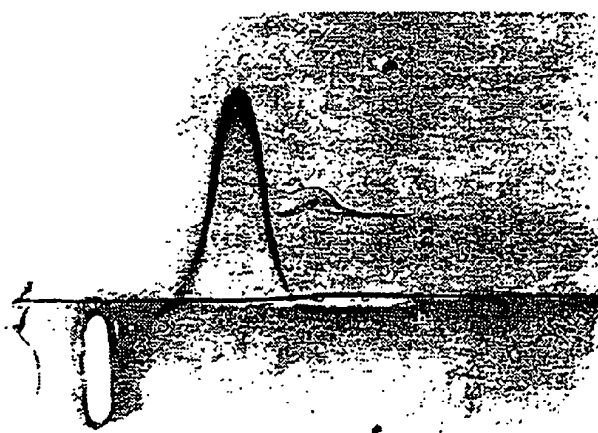


FIG. 6A

PLASMA ADSORVIDO A Mab56



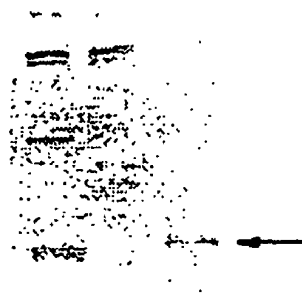
COMPLEXO

PS

C4BP:PS

LIVRE

FIG. 6B



1 2 3

FIG. 7