

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95 374

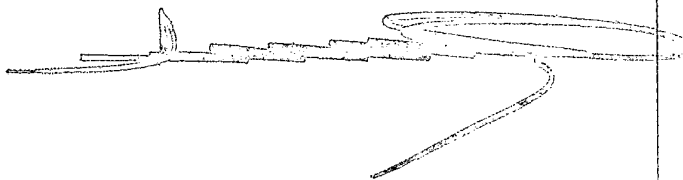
REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ALTAMENTE CONSERVADAS DE SUBSTÂNCIAS IMUNOGÊNICAS BEM COMO DE MEIOS DE ENSAIO IMUNOLÓGICO QUE CONTENHAM ESSES ANTICORPOS"

INVENTORES: Dr. Stefan Müllner, residente na República Federal Alemã

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

República Federal Alemã em 23 de Setembro de 1989 e em 30 de Maio de 1990, sob os N.ºs. P 39 31 787.0 e P 40 17 344.5, respectivamente.



Descrição referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt am Main 80, República Federal Alemã, (inventor: Dr. Stefan Müllner, residente na República Federal da Alemanha), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SEQUENCIAS DE AMINOÁCIDOS ALTAMENTE CONSERVADAS DE SUBSTÂNCIAS IMUNOGÊNICAS BEM COMO DE MEIOS DE ENSAIO IMUNOLÓGICO QUE CONTENHAM ESSES ANTICORPOS".

DESCRIÇÃO

Sabe-se que, para a identificação qualitativa e quantitativa de substâncias imunogênicas, como antígenos, se utilizam cada vez com maior frequência métodos imunométricos. Estes métodos baseiam-se na formação de um complexo da substância imunogênica com um ou mais anticorpos, em que um dos reagentes se encontra marcado para possibilitar a detecção. É deste modo possível verificar se, e em que quantidade, se formou um complexo entre a substância imunogênica e um ou mais anticorpos. Obtiveram-se progressos decisivos nos métodos de determinação imunométrica com a introdução de anticorpos monoclonais, segundo Milstein e Köhler, cuja utilização se encontra detalhadamente descrita no registo de patente alemão 31 30 834.

- Encontram-se também já descritos processos imunométricos para a

determinação de insulinas de determinadas espécies (J. Havranko va et al., Journal of Immunoassay, 5 (182), 131 - 144 (1984)). Estes anticorpos obtiveram-se por imunização com as várias insulinas como imunogenes. O emprego de anticorpos antipeptídicos, obtidos por imunização com constituintes da proteína em causa (antigenes), para a identificação de proteínas nativas, abriu novas perspectivas para uma maior aplicação dos métodos de determinação imunométrica. Tais anticorpos antipeptídicos tornaram-se assim um importante instrumento para a identificação de péptidos e das respectivas sequências genéticas.

Estes anticorpos são também particularmente interessantes para a determinação de substâncias, contra as quais, em condições normais, não se podem gerar, ou só em sentido estrito, antigenes, uma vez que estes - injectadas como proteínas completas - são demasiado activas nas concentrações utilizadas, p. ex. hormonas peptídicas, neuropéptidos, ou são demasiado tóxicas, p. ex. toxina da difteria, virus e outros microorganismos. Na preparação de "vacinas sintéticas" (J. G. Sutcliff et al., Science, Vol. 219, 600 (1983)), podem também empregar-se com sucesso os referidos anticorpos antipeptídicos. Para a escolha da sequência peptídica contra a qual, por um processo conhecido da literatura, se podem obter anticorpos policlonais ou monoclonais, parece ser vantajoso que pelo menos uma parte desta sequência esteja localizada à superfície da proteína nativa, isto é, exposta, contendo por isso vários grupos funcionais carregados ou fortemente polares. Sabe-se contudo, no actual estado da técnica, que os elementos peptídicos que representam sequências de aminoácidos altamente conservadas na evolução, são péssimos imunogenes (vide G. Walter, J. Immunol. Med. 88, (1986), 149 - 161). Por sequências de aminoácidos altamente conservadas na evolução entendem-se neste âmbito as sequências de uma determinada proteína que, no decorrer da evolução, não se alteram ou apenas se alteram muito pouco. Deste modo, por exemplo, o citocroma C de cavalo e de coelho distinguem-se por algumas sequências de aminoácidos. Outras sequências desta proteína das duas espécies animais são idênticas. Verificou-se que o sistema imunológico de uma espécie animal não gere quaisquer anticorpos contra estas regiões idênticas do citocroma C da ou-

tra espécie, uma vez que esta sequência já existe no citocroma C do próprio corpo. É uma regra geral que a resposta imunológica a um antigene é tanto melhor quanto maior a diferença evolucional entre a proteína imunizante e a proteína correspondente do próprio corpo.

O objectivo da invenção foi pois o de descobrir anticorpos que sejam capazes de formar complexos imunológicos tanto com uma proteína nativa como com derivados, mutantes, produtos desnaturados, fragmentos ou precursores sintéticos.

Mais em particular, o objectivo da invenção foi o de descobrir anticorpos que formem complexos imunológicos com produtos preparados por engenharia genética, das mais variadas espécies, bem como com os seus derivados, precursores desnaturados e fragmentos. Especialmente interessantes neste caso são as proteínas preparadas por engenharia genética como a insulina.

Um outro objectivo da invenção foi o desenvolver um método de determinação imunométrica que permita a quantificação do rendimento inicial de produtos preparados por engenharia genética, que ocorrem nos microorganismos com "Inclusion bodies" (corpos de inclusão) pouco solúveis - o que não era possível através dos métodos de determinação imunométrica até agora conhecidos - e, ao mesmo tempo, que seja capaz de determinar as concentrações de proteínas em cada um dos passos de preparação, pelo mesmo processo. Por rendimento inicial entende-se o rendimento efectivo imediatamente após a fermentação. Este valor não é falseado pelas perdas na preparação da amostra e nos passos subsequentes.

Descobriu-se então surpreendentemente, que os anticorpos obtidos por imunização com unidades peptídicas altamente conservadas da proteína nativa em causa, correspondem aos requisitos acima mencionados.

A invenção refere-se deste modo a anticorpos obtidos por imunização com um elemento peptídico que represente uma sequência de aminoácidos altamente conservada de uma proteína nativa.

Em especial a invenção refere-se aos an

ticorpos obtidos por imunização com elementos peptídicos altamente conservados da insulina.

A invenção refere-se ainda a um processo para a preparação dos anticorpos acima referidos, bem como à sua utilização em métodos de determinação imunométrica.

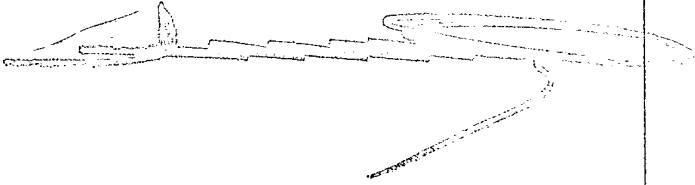
Tanto no que se referiu anteriormente como no que virá a seguir, entendem-se por sequências de aminoácidos altamente conservadas os fragmentos de proteína de uma determinada proteína, em várias espécies - mesmo mais ou menos ligeiramente modificada - que no decorrer da evolução não se alteraram ou apenas se alteraram muito pouco. Como exemplo refere-se aqui o octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina (Tyr-Glu-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn), que existe inalterado em várias insulinas conhecidas, como a humana, de porco, de carneiro, de cavalo, de vaca, de galinha, de pato, de peru, de ganso, de crocodilo, de cobra cascavel, de cobra "Colubrit", de baleia, de elefante, de cabra, de cão, de macaco, de ratazana, de rato, de hamster e de coelho.

Por proteína nativa entende-se uma proteína naturalmente ocorrente.

Por elementos peptídicos, fragmentos peptídicos, elementos proteicos e fragmentos proteicos entendem-se partes de um determinado péptido ou de uma determinada proteína, que sejam constituintes naturais desse péptido ou dessa proteína. Trata-se neste caso de aminoácidos de um conjunto (chamado sequência de aminoácidos) que representam uma parte ou um início ou um fim de um péptido ou de uma proteína.

Para a preparação dos anticorpos, de acordo com a invenção, contra sequências de aminoácidos altamente conservadas de proteínas nativas, procede-se de preferência do seguinte modo:

1. Escolha da sequência de aminoácidos em causa, segundo os critérios seguintes:
 - a) A sequência em causa deve, de preferência, estar exposta isto é, deve encontrar-se à superfície da proteína nativa, o que é de preferência o caso em que a sequência contém vários grupos funcionais carregados ou fortemente polares, ou quando a estrutura secundária da proteína apre



senta nós, que de preferência sobressaem da molécula. Esta condição é normalmente preenchida quando na sequência em causa ocorrem, por exemplo, asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), prolina (Pro), glutamina (Gln), ácido glutâmico (Glu) e/ou glicina (Gly), várias vezes repetidos.

- b) O número dos epitopos potenciais no elemento peptídico escolhido deve, por um lado, ser tão pequeno quanto possível, e por outro lado, o elemento peptídico deve ser grande, para permitir uma resposta imunológica. A sequência escolhida não deve ultrapassar 20 aminoácidos, de preferência 12, em particular 10 e muito em especial 8, mas não deve ter menos do que 4, de preferência 5 e em especial 6 aminoácidos. Revelaram-se particularmente convenientes os elementos peptídicos com 6-13, de preferência 7-11, e em especial 8-10 aminoácidos.
- c) De preferência, a sequência escolhida não deve situar-se no terminal azotado ou no terminal carbonado da proteína nativa em causa, entendendo-se neste caso por terminal azotado e carbonado os terminais correspondentes da proteína nativa total. No caso da proteína total ser constituída por várias proteínas ligadas entre si, a sequência pode naturalmente situar-se num terminal azotado ou carbonado interno da proteína integrada.
2. Preparação da sequência de aminoácidos em causa
Para a preparação do elemento proteico escolhido utiliza-se por exemplo o método da síntese peptídica de Merryfield conhecido da literatura. É contudo também possível obter fragmentos adequados a partir de uma cisão enzimática ou química da proteína nativa. Podem ainda sintetizar-se sequências curtas por via puramente química.
3. Acoplamento de um suporte quando necessário
Especialmente no caso de fragmentos proteicos curtos, que não são capazes por si sós de provocar uma resposta imunológica ou apenas o conseguem insuficientemente, e ainda no caso de fragmentos imunogénicos, é aconselhável acoplar um suporte ao elemento proteico escolhido. Este acoplamento efectua-se por processos conhecidos do especialista, por exem-

plo através de reagentes de acoplamento como o glutaraldeído ou o sal de sódio do éster N-maleinimido-6-caproílico do ácido 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-4-sulfônico (mal-sac-HNSA). Como suportes podem utilizar-se por exemplo: polímeros como polietilenoglicol, poliacrilamida ou poli-d-glutamina-d-lisina ou derivados de ácidos gordos como PAM-3-Cys (PAM=palmitoil) ou proteínas como albumina de soro de vaca (BSA) ou "Keyhole Limpet Hemocyanina" (KLH).

De preferência, acoplam-se várias moléculas do fragmento proteico ao suporte.

4. Imunização de uma espécie com o fragmento proteico ou com o fragmento proteico ligado ao suporte

A imunização de uma espécie com o elemento proteico ou com o elemento proteico ligado a um suporte efectua-se de acordo com processos conhecidos da literatura, por exemplo através de injeção intramuscular do imunogene, eventualmente em conjunto com um adjuvante como KFA (adjuvante de Freund completo) ou IFA (adjuvante de Freund incompleto). Quando necessário, após obtenção da resposta imunológica, pode repetir-se a dose uma ou mais vezes. A escolha da espécie não é crítica, sendo por exemplo adequados ratos, ratazanas, coelhos, carneiros ou cabras. A fim de se obterem maiores quantidades de soros contendo anticorpos é contudo vantajoso utilizar animais maiores, como carneiros ou cabras.

5. Isolamento dos anticorpos a partir dos soros

Em princípio, após obtenção da primeira resposta imunológica pode recolher-se o anti-soro. Conforme a espécie de animal utilizada obtêm-se maiores concentrações normalmente após uma ou várias imunizações com o imunogene correspondente. Conforme o fim em vista para a utilização purifica-se e concentra-se o soro ou utiliza-se directamente sem posterior purificação diluindo-se no meio do ensaio. Em especial para a preparação de ensaios "sanduiche" é aconselhável a purificação e a concentração do soro. Tal pode efectuar-se por exemplo através de precipitação com sulfato de amónio seguida de separação numa coluna de afinidade na qual se encontra immobilizado um antigene adequado. Neste caso separam-se todas as proteínas que não têm qualquer efeito de troca

com a proteína imobilizada. Os anticorpos que reconhecem a proteína em causa - ficando assim ligados à proteína imobilizada - podem eluir-se da coluna.

Em alternativa ao método acima descrito em 5. para o isolamento de anticorpos policlonais, podem também preparar-se naturalmente anticorpos monoclonais. Isto consegue-se por exemplo através da imunização de ratos, como acima descrito em 4., seguida da fusão das células do baço por exemplo com células de mieloma NS 1 e clonagem das células apropriadas. Conforme o caso, os anticorpos monoclonais assim obtidos, podem multiplicar-se por exemplo através de injeção em ratos pelados. Em princípio, a preparação destes anticorpos monoclonais é conhecida do especialista e encontra-se descrita na literatura. A continuação do processo de preparação e a purificação podem então efectuar-se como acima descrito em 5.

Os anticorpos de acordo com a invenção podem utilizar-se para a preparação de ensaios imunológicos. Em tais ensaios imunológicos, por exemplo, os anticorpos de acordo com a invenção ou um antigene podem estar imobilizados sobre uma fase sólida. Os processos para a imobilização de antigenes e anticorpos sobre fases sólidas, como polímeros sintéticos ou naturais como poliestireno, polipropileno, PVC ou Latex em várias formas geométricas como tubos, esferas ou placas de microtitulação, são conhecidos do especialista. O ensaio imunológico pode ser por exemplo um ensaio competitivo ou um ensaio sanduiche. Em ambos os casos, marca-se um dos componentes - ou o antigene ou o anticorpo - para fins de detecção. A marcação efectua-se na maioria dos casos através de um marcador (Label") radioactivo, quimiluminescente ou enzimático. Também estes processos de marcação de antigenes e anticorpos são conhecidos do especialista. Uma vez que os anticorpos de acordo com a invenção são capazes de reconhecer tanto as proteínas nativas de uma espécie como também as proteínas nativas correspondentes de outras espécies e mesmo derivados, fragmentos, precursores sintéticos e naturais ou produtos desnaturados destas proteínas - desde que estes contenham o elemento peptídico uti

lizado para a imunização ou pelo menos um seu fragmento que corresponda pelo menos a 60-80% do elemento peptídico utilizado para a imunização - é conveniente, para a preparação de um ensaio imunológico multi-espécies, marcar os anticorpos de acordo com a invenção, construindo assim, de acordo com processos conhecidos da literatura, um RIA (ensaio radioimunológico), um CIA/LIA (ensaio imunológico quimi) luminescente) ou um EIA (ensaio enzimoimunológico).

Como particularmente vantajoso para a determinação de produtos preparados por engenharia genética, que ocorrem em microorganismos com "inclusion bodies" pouco solúveis, num ensaio RIA, revelou-se um sistema tampão, que para além dos sistemas tampão habituais como tampões de fosfato (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), tampão Tris (TRis hidroximetil)aminoetano) ou tampão de barbiturato (por exemplo dietilbarbiturato de sódio), contém pelo menos uma proteína como albumina de soro de vaca (BSA), albumina láctea, ovalbumina, albumina de ovo, leite em pó ou gelatina e pelo menos um detergente iônico como dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamônio ou um sal galênico e/ou pelo menos um detergente não iônico como ^RNonidet P40, ^RTriton x 100 ou ^RTween 20.

Numa forma de concretização especial a invenção refere-se a anticorpos que formam complexos imunológicos tanto com a insulina de várias espécies como com derivados de insulina, fragmentos, precursores da insulina desnaturados sintéticos e naturais e derivados destes precursores da insulina desnaturados. Para a preparação destes "anticorpos de insulina multi-espécies" escolhe-se como imunogene um fragmento de insulina de acordo com os critérios 1 a - b acima mencionados. São por exemplo adequadas as sequências A_1-A_7 ou $A_{11}-A_{17}$ ou $A_{11}-A_{21}$ da cadeia A da insulina bem como a região à volta da cadeia B da cisteína. Revelou-se particularmente adequado o octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina.

Tyr-Glu-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn

Este octapéptido pode preparar-se de acordo com processos conhecidos da literatura (W. König, K.



Kernebeck, Liebigs Ann. Chem. 1979, 227-247). O acoplamento do suporte, a imunização e o isolamento dos anticorpos efectua-se de acordo com os passos processuais 3-5 acima referidos. Os anticorpos de insulina obtidos podem também utilizar-se, sem posterior tratamento e purificação, para a preparação de um ensaio de insulina multi-espécies.

Um ensaio de insulina multi-espécies deste tipo pode efectuar-se na forma de um RIA, CIA/LIA ou EIA, de acordo com processos conhecidos da literatura. Para tal, os anticorpos de insulina de acordo com a invenção podem encontrar-se em solução livre (por exemplo num RIA de precipitação) ou ligados a uma fase sólida (imobilizados). Para o RIA de precipitação são apropriados por exemplo insulinas, fragmentos de insulina, derivados da insulina, precursores de insulinas naturais ou sintéticos radioactivos, de preferência marcados com iodo radioactivo, ou por exemplo o elemento peptídico marcado radioactivamente, utilizado para a geração dos anticorpos de insulina de acordo com a invenção, em especial o octapétido (14-21) da cadeia A da insulina marcado com iodo radioactivo. Para a preparação de um ensaio imunológico sanduiche utilizam-se dois anticorpos, dos quais um - normalmente o que não está ligado à fase sólida - se encontra marcado. Os dois anticorpos podem ser dirigidos contra o mesmo epítopo da insulina, contudo é preferível serem dirigidos contra epítopos da insulina diferentes. Para um ensaio imunológico sanduiche desse tipo, no qual os dois anticorpos utilizados estão dirigidos contra epítopos diferentes, utilizam-se de preferência anticorpos policlonais ou monoclonais, purificados por afinidade e marcados com iodo radioactivo. A marcação dos anticorpos ou antigenes (insulina, fragmentos de insulina, derivados de insulina, precursores naturais ou sintéticos, efectua-se de acordo com processos conhecidos da literatura, por exemplo pode utilizar-se para a marcação com iodo radioactivo o método do iodogene.

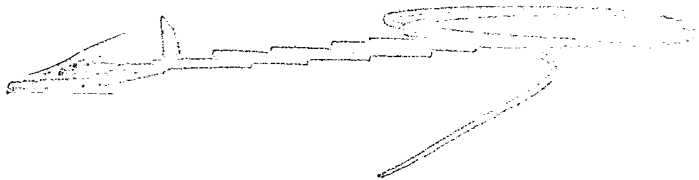
O ensaio de insulina multi-espécies apresenta em relação aos ensaios de insulina de acordo com o estado da técnica, a vantagem de com ele ser possível determinar e quantificar tanto as insulinas de várias espécies, como ainda derivados de insulina, fragmentos de insulina, precursores de

insulina sintéticos e naturais desnaturados e derivados destes precursores de insulina desnaturados.

Verificou-se que se podem mesmo identificar e quantificar proteínas que contêm sequências de aminoácidos, que representam apenas 60-80% do elemento peptídico que se utilizou para a imunização (e desse modo para a geração de anticorpos. Podem deste modo, por exemplo, com o ensaio de insulina multi-espécies, contendo anticorpos obtidos por imunização com o octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina, podem também determinar-se as proteínas que contêm apenas o hexapéptido (16-21). As seguintes insulinas, derivados de insulina ou proteínas resultantes da insulina, podem por exemplo determinar-se com o ensaio de insulina multi-espécies de acordo com a invenção:

1. Fusões β -galactosidase-insulina expressas em E. coli P1, P6, P1-trímero-Des-Met-Des-Cys, P1-trímero-Des-Met, P1-Poli-Gly-Des-Met, P1-poli-Gly-Des-Met-Des-Cys, P-Lz-gama;
2. Fusões interleucina 2-insulina expressas em E. coli pB40, pK52, pGF12, pIK10, pSW3, pSW2, pSW3*M
3. Fusões trp-insulina expressas em E. coli pB70, pINT 14, pINT 41, pINT 30, pSL 27, pINT 91
4. Insulinas de várias espécies: insulina humana, de porco, de carneiro, de cavalo, de vaca, de galinha, de pato, de peru, de ganso, de crocodilo, de cobra cascavel, de cobra "colubrid", de baleia, de elefante, de cabra, de cão, de macaco, de ratazana, de hamster, de coelho
5. Derivados de insulina:
Insulina humana B31-mono-Arg, insulina humana B31, B32-di-Arg, insulina de porco B1-des-Phe, insulina humana A14-mono-iodo
6. Fragmentos de insulina:
Tetra-sulfonato da cadeia A da insulina (de vaca), tetra-sulfonato da cadeia A da insulina (humana), octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina, hexapéptido (16-21) da cadeia A da insulina.
7. Precursores de insulina:
Pré-pró-insulina-S-sulfonato (P1), pré-pró-insulina (P1), pré-pró-insulina (pSW3), pró-insulina (de porco).

Além disso, o ensaio de insulina multi-espécies de acordo com a invenção, apresenta a vantagem de se



poder proceder a determinações na presença de detergentes iônicos e não iônicos, proteínas auxiliares, misturas de detergentes bem como misturas de detergentes e proteínas auxiliares. Como detergentes podem utilizar-se por exemplo dodecilsulfato de sódio (SDS), [®] Triton x 100 ou [®] Nonidet P 40 e como proteínas auxiliares albumina de soro de vaca (BSA), albumina de galinha, albumina de ovo ou proteínas de E. coli.. Os detergentes iônicos podem aplicar-se de preferência na gama de 0-0,3%, os não iônicos de preferência na gama de 0-2% e as proteínas auxiliares de preferência de 0-3% (dados percentuais em p/v = peso/volume). A determinação na vantagem destas substâncias tem a vantagem de se poder aplicar também, por exemplo, a produtos pouco solúveis preparados por engenharia genética, sem perturbarem apreciavelmente o ensaio, o que não era até agora possível com os processos imunométricos de acordo com o estado da técnica. Nem as proteínas auxiliares, nem as proteínas estranhas como a calcitonina ou o nonapéptido buserelina, ou ainda os sistemas tampão habituais, perturbam apreciavelmente o ensaio multi-espécies. Por exemplo, revelou-se particularmente adequado para a determinação radioimunológica (determinação RIA) de produtos preparados por engenharia genéticas, que ocorrem nos microorganismos como "inclusion bodies" pouco solúveis, um sistema tampão, que para além das substâncias tampão habituais como tampões de fosfato (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4), tampão Tris (Tris(hidroximetil)aminometano) ou tampão de barbiturato (por exemplo dietilbarbiturato de sódio), contém pelo menos uma proteína como albumina de soro de vaca (BSA), albumina de leite ou ovalbumina, e pelo menos um detergente iônico como dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de hexadeciltrimetilamônio ou um sal galênico e/ou pelo menos um detergente não iônico como [®] Nonidet P40, [®] Triton x 100 ou [®] Tween 20.

Uma vez que os anticorpos de insulina de acordo com a invenção se podem utilizar para a determinação simultânea de antígenos de insulina consideravelmente diferentes, são também adequados, em combinação com anticorpos de insulina de alta especificidade até agora conhecidos, para a pesquisa da estrutura terciária e da localização de pormenores estruturais essenciais e secundários da molécula de insulina.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Acoplamento do octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina à BSA

Sintetiza-se o octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina, protegido, de acordo com o método de W. König e K. Kernebeck, Liebig's Ann. Chem. 1979, 227-247. Para conjugação à BSA como molécula suporte removem-se todos os grupos protectores do octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina protegido Ddz-Tyr(tBu)-Gln-Leu-Glu(OtBu)-Asn-Tyr(tBu)-Cys(Ttr)-AsnotBu, por tratamento com uma mistura de ácido trifluoroacético e etanotiol (segundo W. König, K. Kernebeck, Liebig's Ann. Chem., 1979, 227-247). O produto resultante liga-se então de forma covalente a BSA por meio do reagente de acoplamento bifuncional éster N-maleinimido-6-caproílico do ácido 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-4-sulfônico (sal de sódio) (mal-sac-HNSA). Para tal, adicionam-se 55 mg de mal-sac-HNSA a uma solução de 111 mg de BSA (correspondente a 95 equivalentes de lisina) em 10 ml de tampão de fosfato 0,1 molar a pH 7,4. Após 60 minutos de agitação à temperatura ambiente cromatografa-se a mistura reaccional através de Sephadex G 25 em tampão de fosfato 0,1 molar a pH 6,2 e recolhe-se o pico eluído em primeiro lugar. A esta solução adicionam-se 67 mg (65 umol) de octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina. Deixa-se em seguida em repouso durante a noite à temperatura ambiente. Dializa-se depois a mistura reaccional contra água e liofiliza-se a solução resultante.

Rendimento: 112 mg

Teor em proteína: 83%

15 moléculas de octapéptido por molécula de BSA (determinado por análise de aminoácidos).

EXEMPLO 2

Imunização

Para a imunização utilizaram-se três tipos de animais, nomeadamente coelhos domésticos de raça mista (número de indivíduos = 3) e um carneiro e uma cabra. Iniciou-se a imunização ao mesmo tempo em todos os animais, tendo-se

aplicado a cada um dos coelhos 0,1 mg do conjugado octapéptido /BSA do Exemplo 1 em KFA (adjuvante de Freund completo, Difco) e ao carneiro e à cabra 2,5 mg de conjugado octapéptido/BA em KFA, como dose inicial, por via intramuscular. Na terceira semana após a primeira aplicação repetiu-se a imunização com a mesma quantidade de conjugado octapéptido/BSA em IFA (adjuvante de Freund incompleto Behring) e repetiu-se este processo na 4ª, 8ª, 13ª, 18ª e 25ª semanas. Na 27ª, 32ª e 37ª semanas inoculou-se a mesma quantidade de octapéptido puro não conjugado com BSA em IFA. A recolha dos anti-soros efectuou-se em todos os casos pela primeira vez na 10ª semana e depois todos os 10 dias após as inoculações. A determinação dos títulos efectuou-se como descrito na literatura (T. Chard, "An introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques", Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1987), pag. 101-102). Para tal fez-se uma série de diluições (1:10 - 1:10⁶) do soro recolhido em tampão MSTB (composição do tampão, ver Exemplo 3) e determinou-se a quantidade de cada um dos traçadores ligados, nas condições do ensaio (ver Exemplo 3). Deste modo, o título é o valor ao qual o anticorpo do soro em causa, a uma determinada diluição, se liga a 50% do traçador utilizado. Regista-se o título como valor recíproco. Os soros dos animais imunizados acima descritos tinham títulos de 1:500 - 1:10000.

EXEMPLO 3


Preparação e execução de um ensaio radioimunológico

Materiais utilizados:

Para a preparação de um ensaio radioimunológico utilizou-se um anti-soro de carneiro (S 239) com um título de 1:500. Utilizou-se directamente o anti-soro sem mais purificação. A diluição do soro foi de 1:20 (em tampão MSTB) e armazenou-se a -20°C. A diluição de trabalho foi de 1:500 (em tampão MSTB).

Tampão MSTB:

O tampão MSTB utilizado tinha a seguinte constituição:



0,1 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) ajustado a pH
7,5 com NaOH 1M
2,5% (p/v) de albumina de soro de vaca
0,2% (p/v) de dodecilsulfato de sódio
0,2% (p/v) de ^RTriton x-100
0,04% (p/v) de azida de sódio

Solução de imunoglobulina:

Para a execução do ensaio utilizou-se uma solução de imunoglobulina numa concentração de 10/ml de água bidestilada.

Traçador:

Como traçador utilizou-se insulina de porco marcada com ¹²⁵I (Behringwerke AG, Marburg, Prod.-Nº OCSM) (10 ng < 74 KBq, liofilizada).

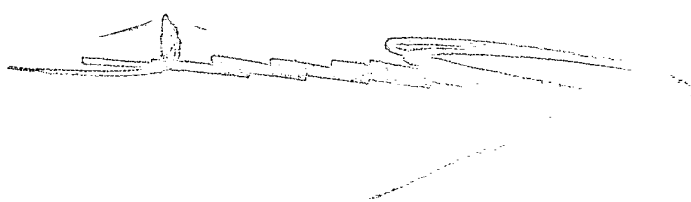
Por tubo de ensaio aplicou-se uma atividade total de 20.000-30.000 contagens.

Padrões:

Testaram-se, em primeiro lugar, os padrões em relação ao seu teor em proteína. Em seguida, determinou-se o teor da substância a determinar mais tarde num ensaio RIA (insulinas de diferentes espécies, 16 derivados de insulinas, precursoras de insulina, etc.). Depois ajustaram-se os padrões a uma concentração de 2000 ng/ml em tampão MSTB. Para o traçado das curvas de calibração faz-se uma série de diluições em progressão geométrica, nas seguintes concentrações (dados em ng/ml de tampão MSTB): 3,71; 7,5; 15; 30; 60; 120; 240; 480; 960; 1920.

Traçado das curvas de calibração (condições de ensaio):

Para o traçado das curvas de calibração pipetaram-se para um tubo de ensaio (da firma Sarstedt, nº. 55-535) 100 µl de padrão, 100 µl de traçados e 100 µl de anti-soro. Misturou-se bem a amostra e deixou-se em repouso durante a noite (18 horas) à temperatura ambiente (18-25°C). Antes da precipitação com 1000 µl de polietilenoglicol (peso molecular



cerca de 4000) adicionaram-se 50 μ l de solução de imunoglobulina e misturou-se bem. Após 20 minutos centrifugou-se a 1500 x g e decantou-se a camada sobrenadante. Mediu-se o precipitado com um contador gama (Gamma Counter, 1277, Pharmacia LKB) durante 1 minuto. Para cada determinação fez-se um ensaio duplo.

Determinação do valor do ensaio em branco:

Para a determinação do ensaio em branco procedeu-se como acima descrito em "traçado das curvas de calibração", mas em vez do padrão utilizaram-se neste caso 100 μ l de tampão MSTB.

EXEMPLO 4

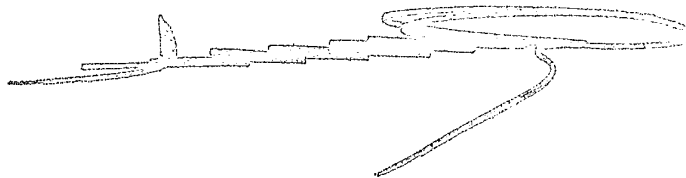
Determinação de várias insulinas e de proteínas delas derivadas num ensaio RIA

Com base nos padrões de teor, previamente determinado, em insulina ou em proteína derivada de insulina (vide Exemplo 3 : padrões), traçaram-se curvas de calibração para as seguintes insulinas:

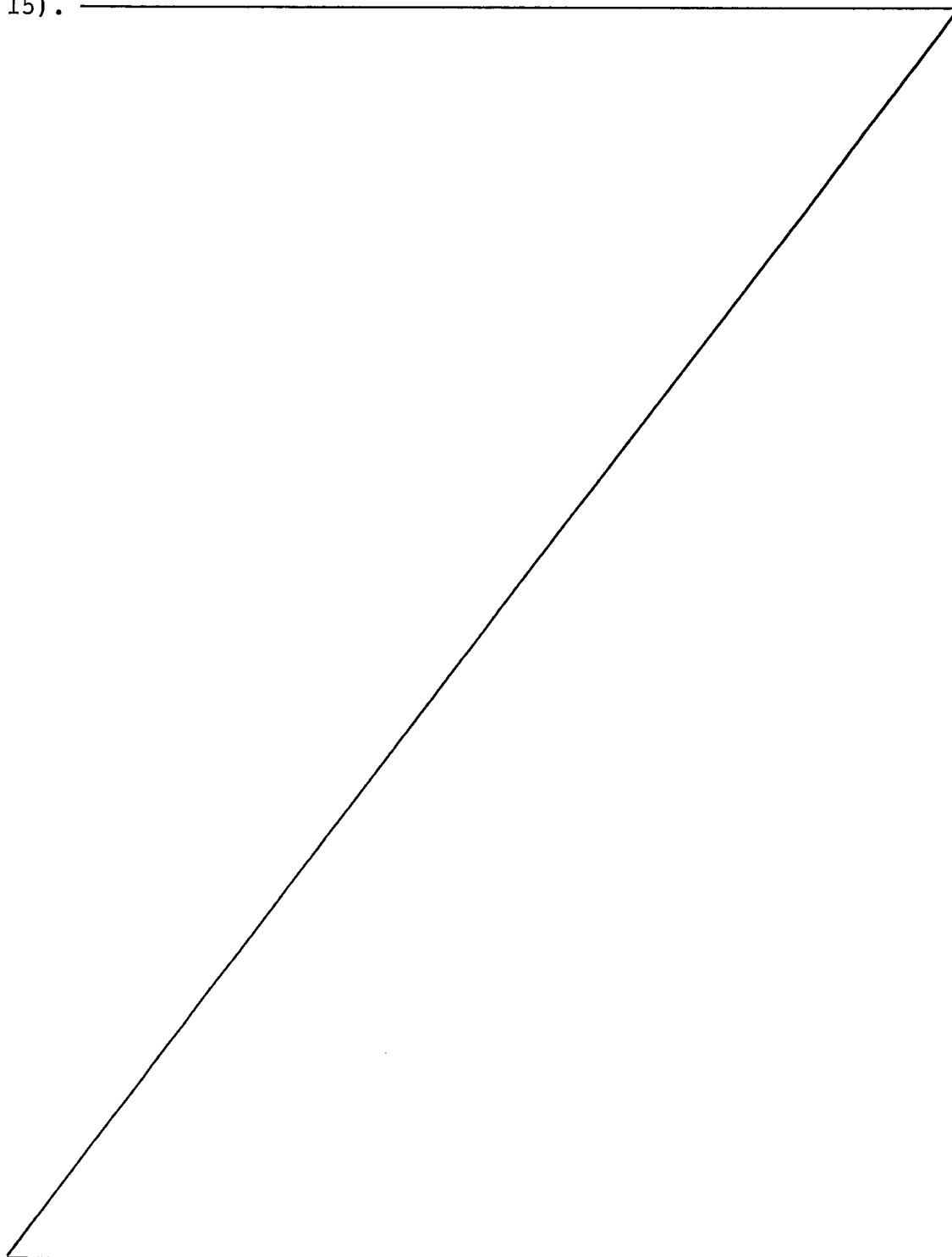
Insulina humana (Fig. 1), insulina de porco (Fig. 2), insulina de vaca (Fig. 3), insulina de carneiro (Fig. 4), insulina de galinha (Fig. 5) e insulina de cavalo (Fig. 6), os derivados de insulina de porco Des-Phe-B1 (Fig. 7), insulina humana Di-Arg-B31-B32 (Fig. 8), insulina humana Mono-Arg-B31 (Fig. 9), pro-insulina de porco (Fig. 10), bem como tetra-sulfonato da cadeia A de insulina (Fig. 11), octapéptido 14-21 (Fig. 12) e hoxapéptido 16-21 (Fig. 13).

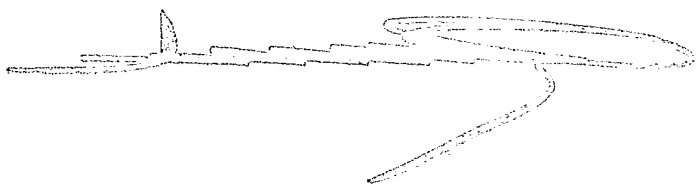
Os valores B/B_0 indicados nas figuras representam os quocientes da actividade medida B e da actividade máxima B_0 (saturação completa do anticorpo com o traçador). As curvas de calibração apresentadas nas Figuras 1-13 mostram claramente que, com os ensaios RIA de acordo com a invenção utilizando os anticorpos de acordo com a invenção, se obteve um processo de identificação sensível para um grande número de insulinas.

Testou-se a influência de proteínas estranhas e do sistema tampão sobre as determinações e verificou-



-se que elevadas concentrações de BSA ou de proteínas de E. coli não prejudicam o ensaio. Como controle negativo para a identificação da falta de reactividade cruzada com pequenas estruturas peptídicas, adicionaram-se à substância a testar calcitonina e busserelina em concentrações iguais às do octapéptido. Não se verificou qualquer reactividade cruzada (vide Fig. 14 e Fig. 15).





REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de anticorpos que se obtêm através de imunização com um fragmento peptídico correspondente a uma sequência de aminoácidos altamente conservada de uma proteína nativa, caracterizado por se imunizar uma espécie animal adequada com um fragmento peptídico correspondente a uma sequência de aminoácidos altamente conservada de uma proteína nativa, e se isolarem em seguida os anticorpos a partir do soro da espécie animal.

- 2ª -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de aminoácidos se encontrar na superfície externa da proteína nativa.

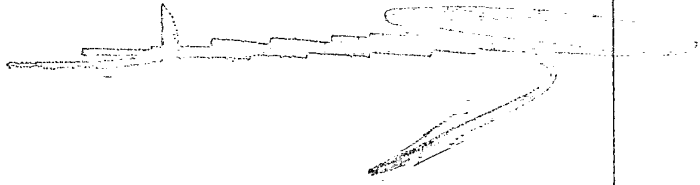
- 3ª -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado por a sequência de aminoácidos conter grupos funcionais carregados e/ou fortemente polares.

- 4ª -

Processo para a preparação de anticor-

- 17 -



pos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 3, caracterizado por a sequência de aminoácidos conter pelo menos um aminoácido escolhido de entre: Asn, Asp, Pro, Gly, Gln, Glu.

- 5a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 4, caracterizado por a sequência de aminoácidos ter um comprimento de 6 a 13 aminoácidos.

- 6a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 5, caracterizado por a proteína nativa ser a insulina.

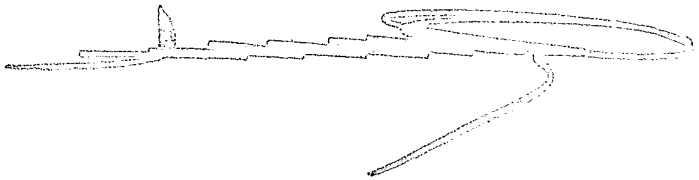
- 7a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a sequência de aminoácidos se encontrar na cadeia A ou na cadeia B da insulina.

- 8a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 7, caracterizado por o fragmento peptídico ser octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina.

- 18 -



- 9a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 8, caracterizado por esses anticorpos apresentarem reactividade cruzada com proteínas que contêm sequências de aminoácidos que coincidem em pelo menos 60 a 80% com a sequência de aminoácidos do fragmento peptídico utilizado para a imunização.

- 10a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 6 a 9, caracterizado por esses anticorpos apresentarem reactividade cruzada com proteínas que contêm o octapéptido (14-21) da cadeia A da insulina.

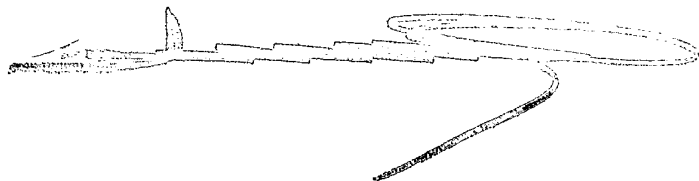
- 11a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 6 a 10, caracterizado por esses anticorpos apresentarem reactividade cruzada com proteínas que contêm o hexapéptido (16-21) da cadeia A da insulina.

- 12a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 11, caracterizado por os anticorpos serem policlonais.

- 19 -



- 13a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 12, caracterizado por, após a imunização da espécie animal adequada, se fundirem as micelas desta espécie animal imunizada com células de mieloma NS1, e se seleccionarem os hibridomas assim preparados em relação à secreção de anticorpos monoclonais contra o fragmento peptídico utilizado para a imunização, obtendo-se assim anticorpos monoclonais.

- 14a -

Processo para a preparação de anticorpos, de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 13, caracterizado por o fragmento peptídico utilizado para a imunização se encontrar acoplado a um suporte.


- 15a -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, caracterizado por nele se conter um ou mais anticorpos quando preparados por um processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 14.

- 16a -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por conter um antigene marcado que forma com o(s) anticorpo(s) um complexo imunológico.

- 20 -



- 17a -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por pelo menos um anticorpo ser marcado.

- 18a -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, de acordo com as reivindicações 16 ou 17, caracterizado por a marcação se efectuar com um agente ("Label") radioactivo, quimiluminescente ou enzimático.

- 19a -

Processo para a preparação de um meio de teste imunológico, de acordo com uma ou mais das reivindicações 15 a 18, caracterizado por um anticorpo se encontrar imobilizado sobre uma fase sólida.

- 20a -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, de acordo com uma ou mais das reivindicações 15 a 19, caracterizado por conter um ou mais detergentes e/ou uma ou mais proteínas adicionais e/ou uma ou mais misturas de detergente - proteína adicional.

- 21 -

- 21ª -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por conter pelo menos um detergente iónico e pelo menos um detergente não iónico.

- 22ª -

Processo para a preparação de um meio de ensaio imunológico, de acordo com uma ou mais das reivindicações 15 a 21, caracterizado por conter ainda um anticorpo altamente específico para a insulina.

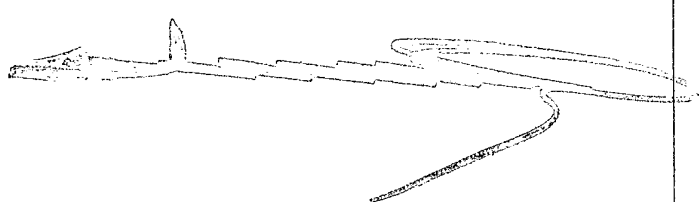
A requerente reivindica as prioridades dos pedidos alemães apresentados em 23 de Setembro de 1989 e em 30 de Maio de 1990, sob os N.ºs. P 39 31 787.0 e P 40 17 344.5, respectivamente.

Lisboa, 20 de Setembro de 1990.

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



- 22 -



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA SEQUÊN-
CIAS DE AMINOÁCIDOS ALTAMENTE CONSERVADAS DE SUBSTÂNCIAS
IMUNOGÊNICAS BEM COMO DE MEIOS DE ENSAIO IMUNOLÓGICO
QUE CONTENHAM ESSES ANTICORPOS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de anticorpos que se obtêm através de imunização com um fragmento peptídico correspondente a uma sequência de aminoácidos altamente conservada de uma proteína nativa, que compreende imunizar-se uma espécie animal adequada com um fragmento peptídico correspondente a uma sequência de aminoácidos altamente conservada de uma proteína nativa, e isolarem-se em seguida os anticorpos a partir do soro da espécie animal.

-
-
-

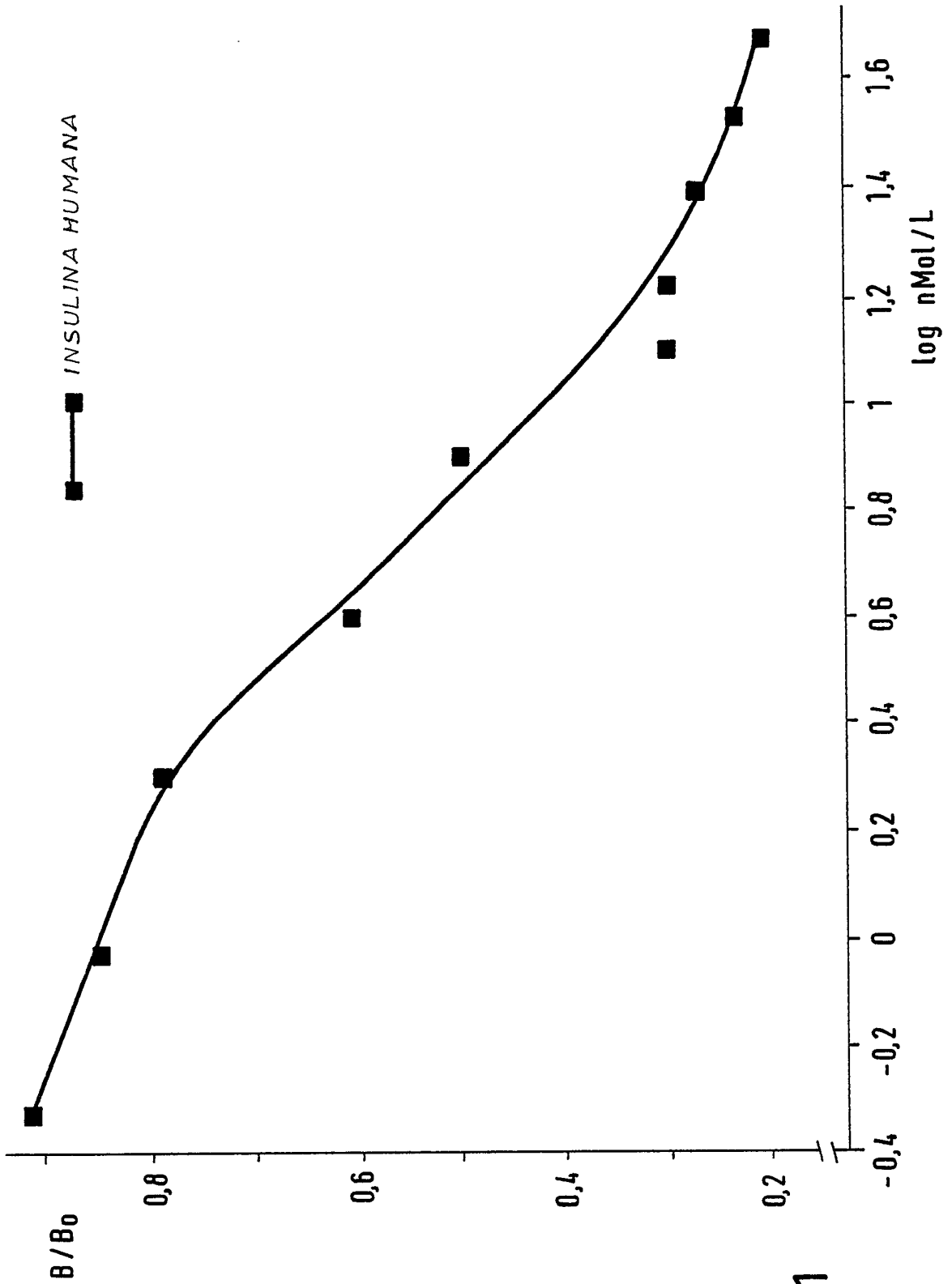


FIG.1

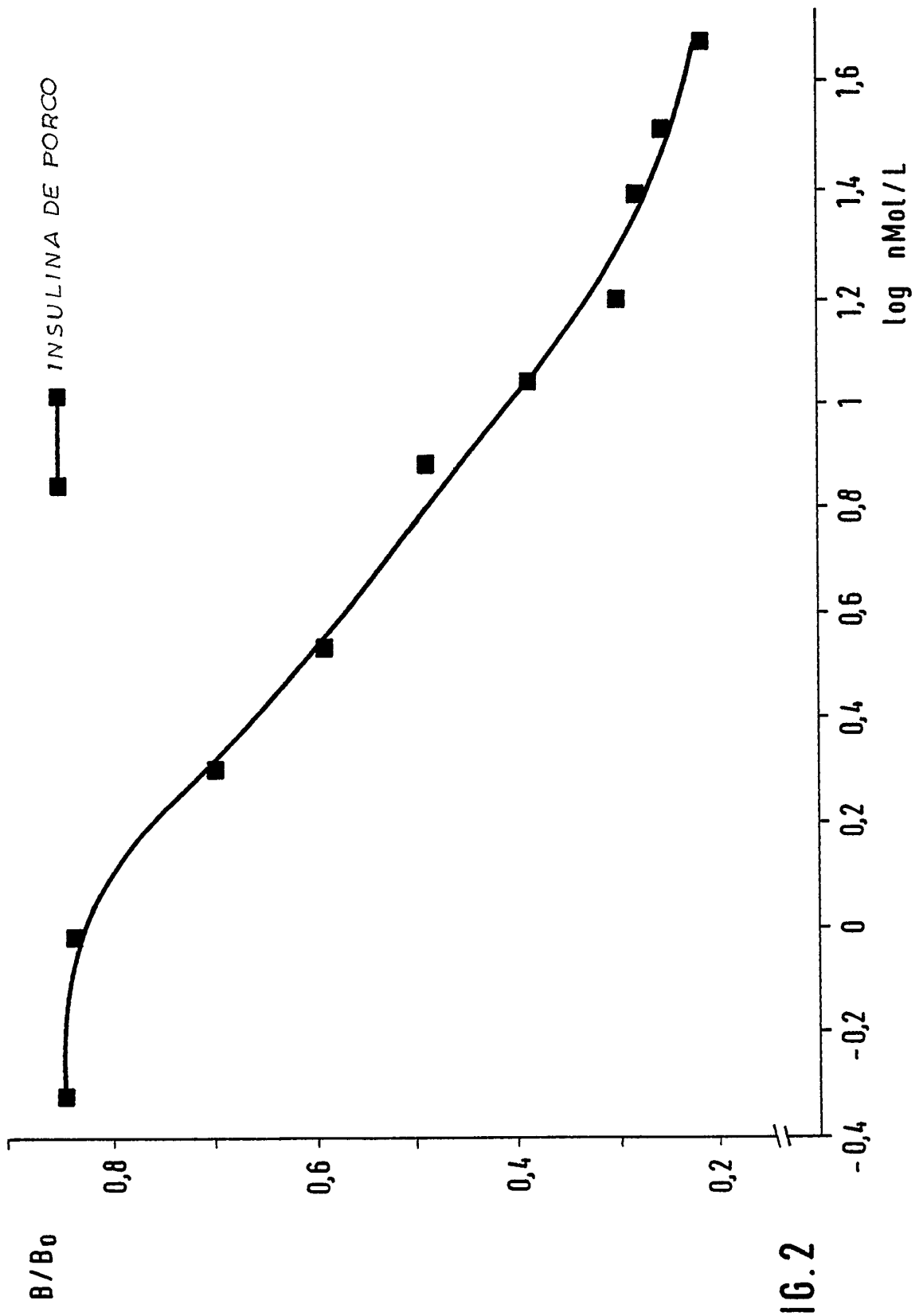
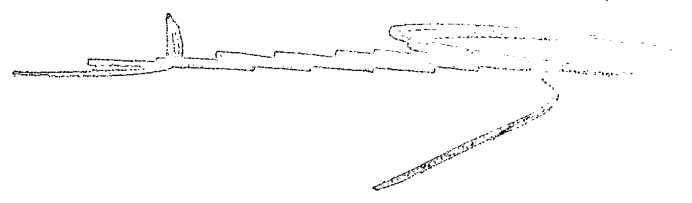


FIG.2



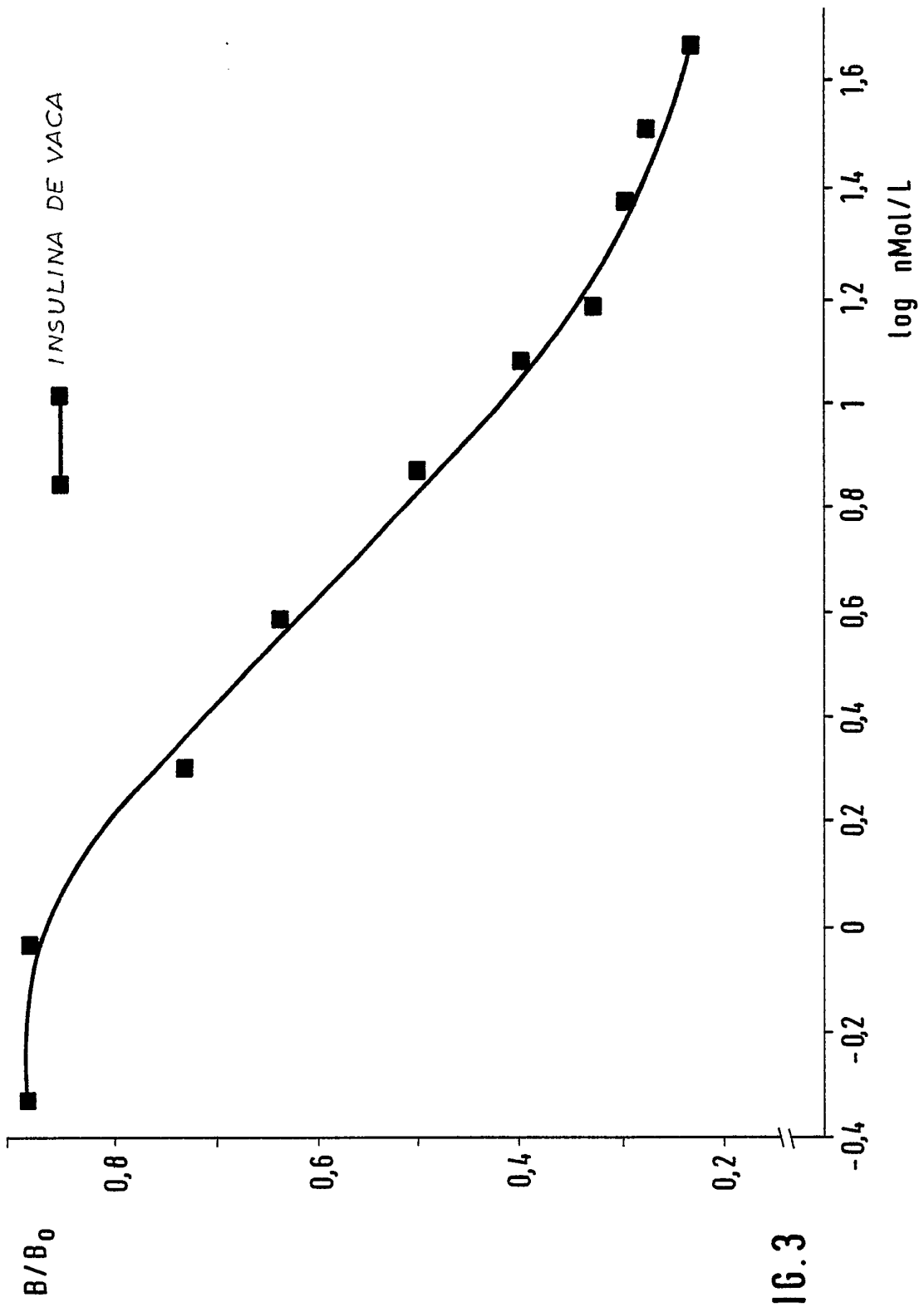
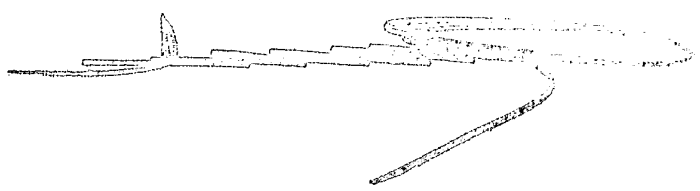


FIG. 3



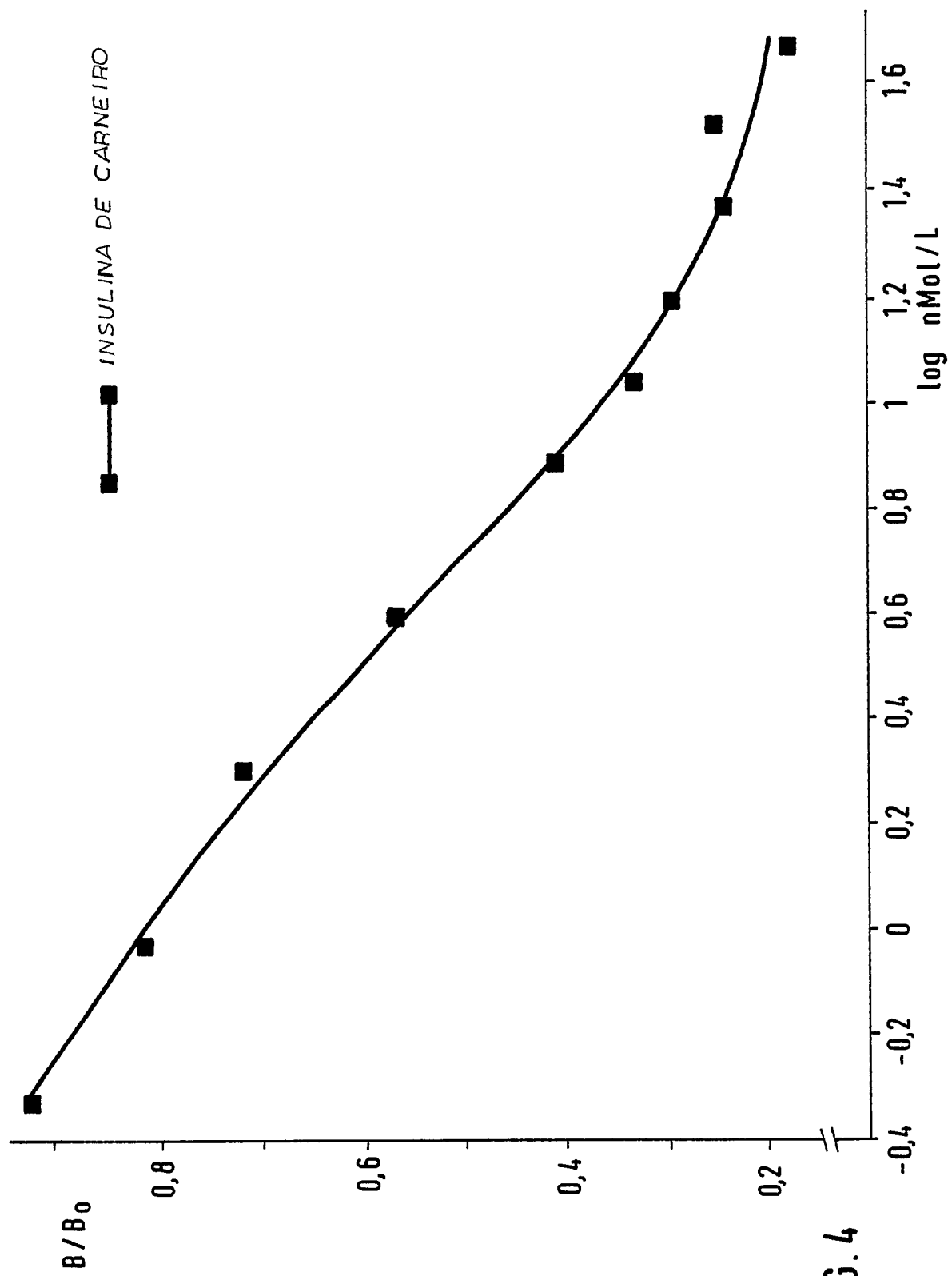


FIG. 4

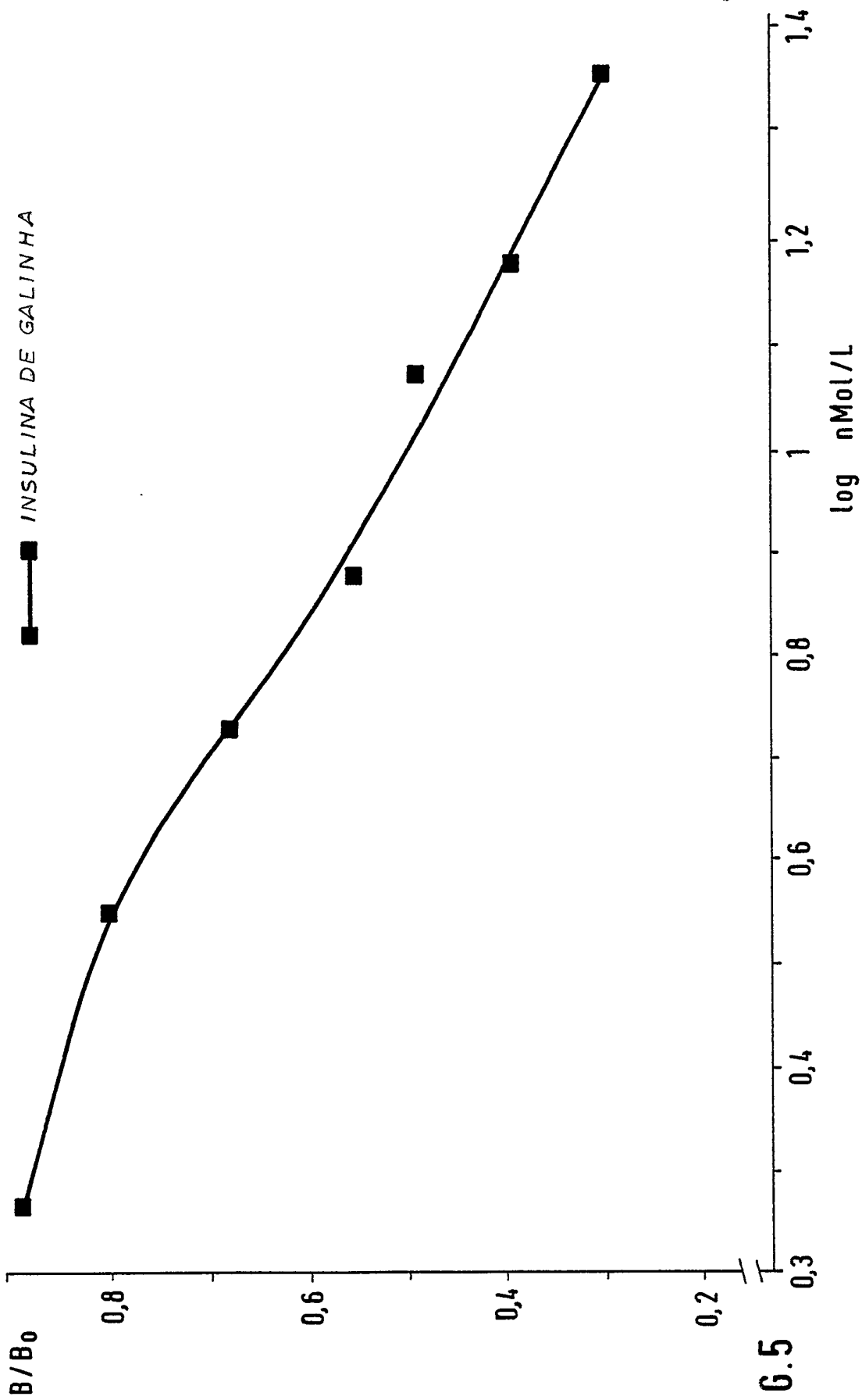


FIG. 5

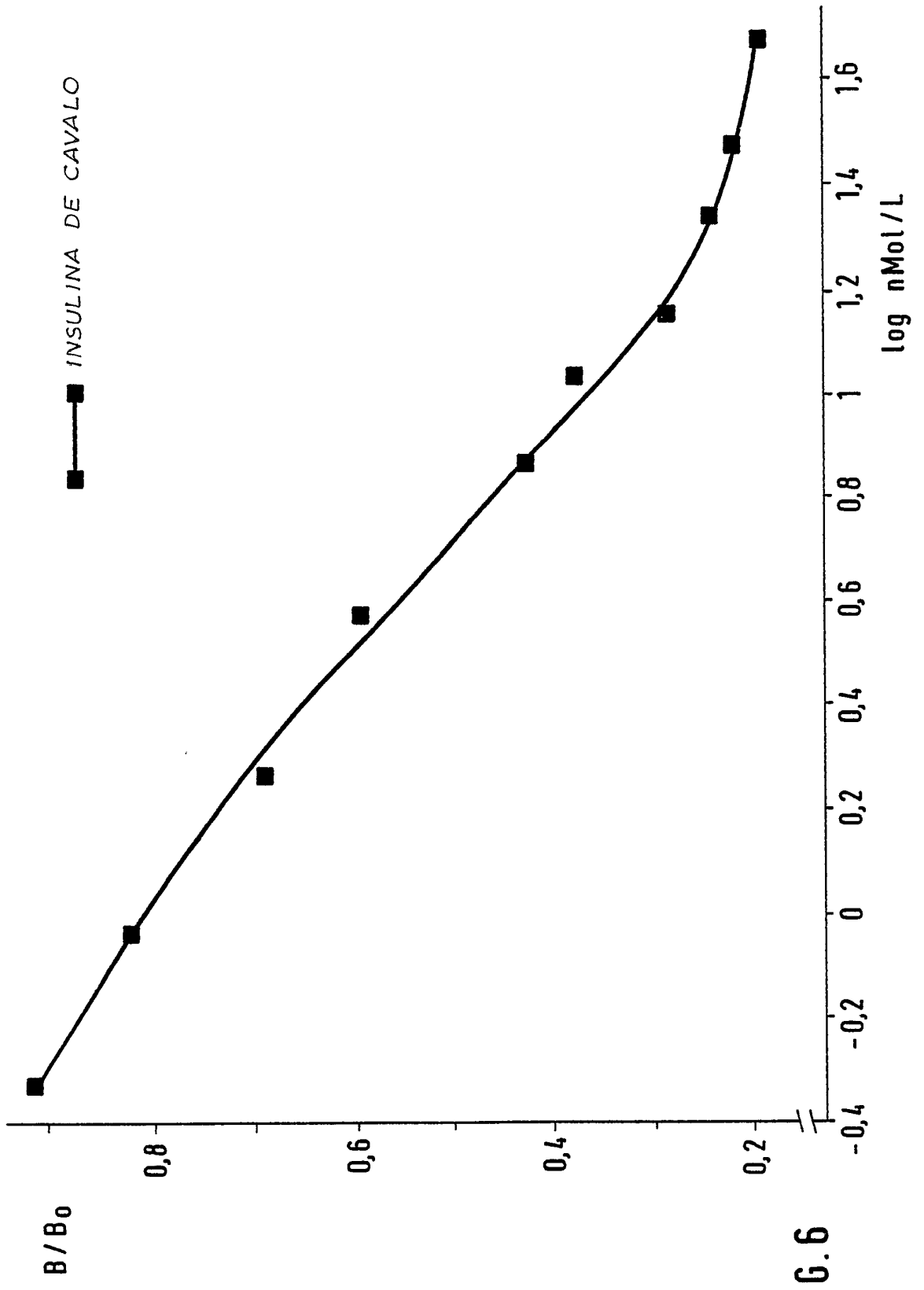
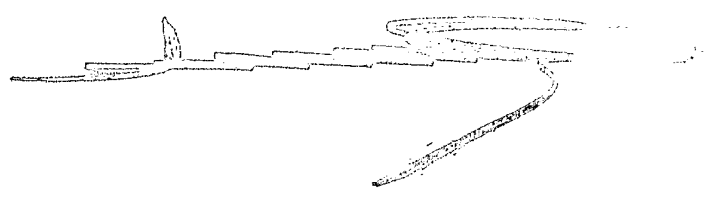


FIG. 6



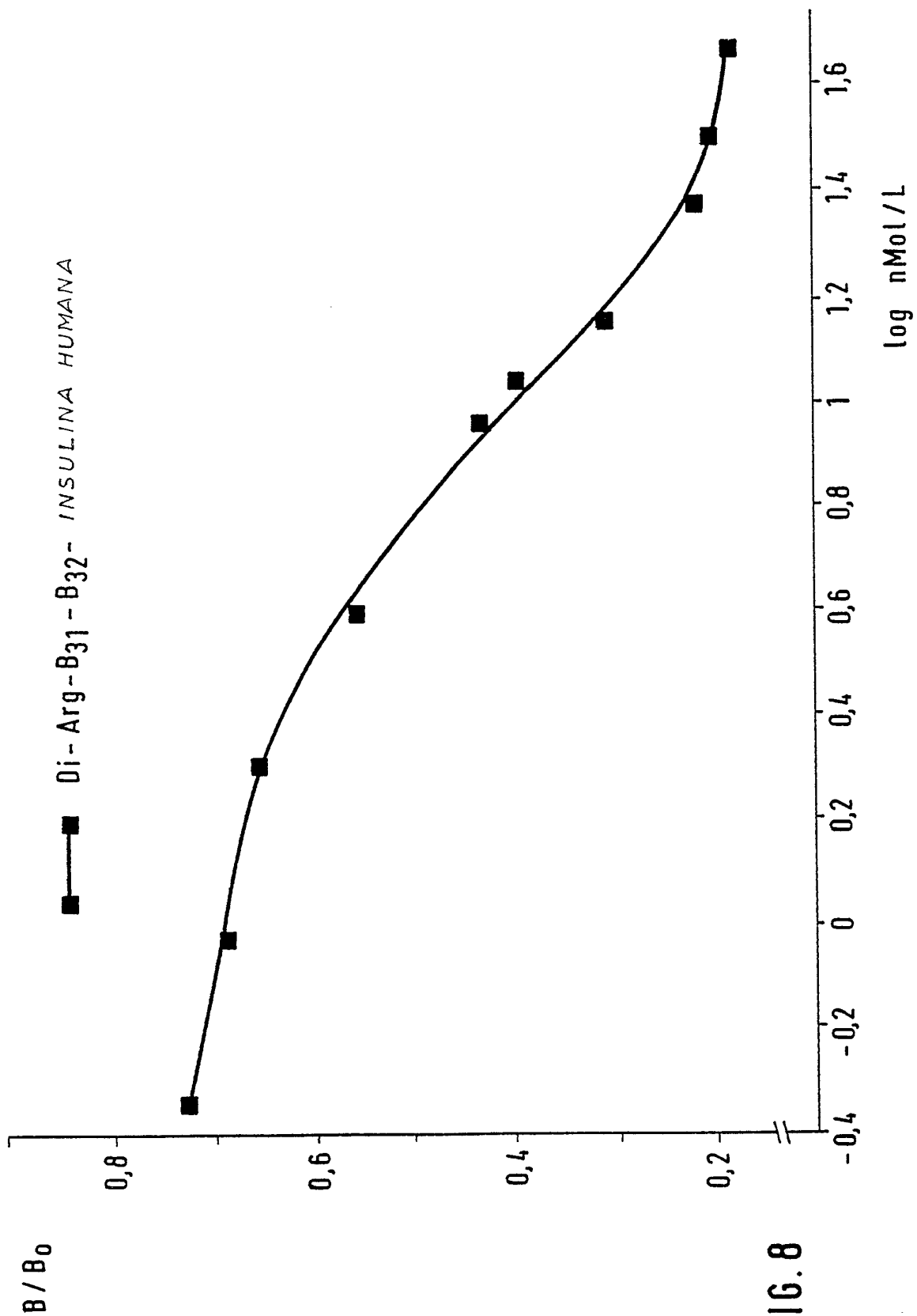
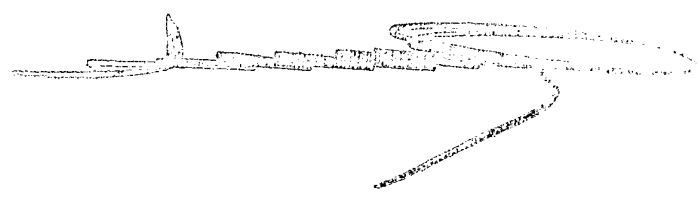


FIG. 8



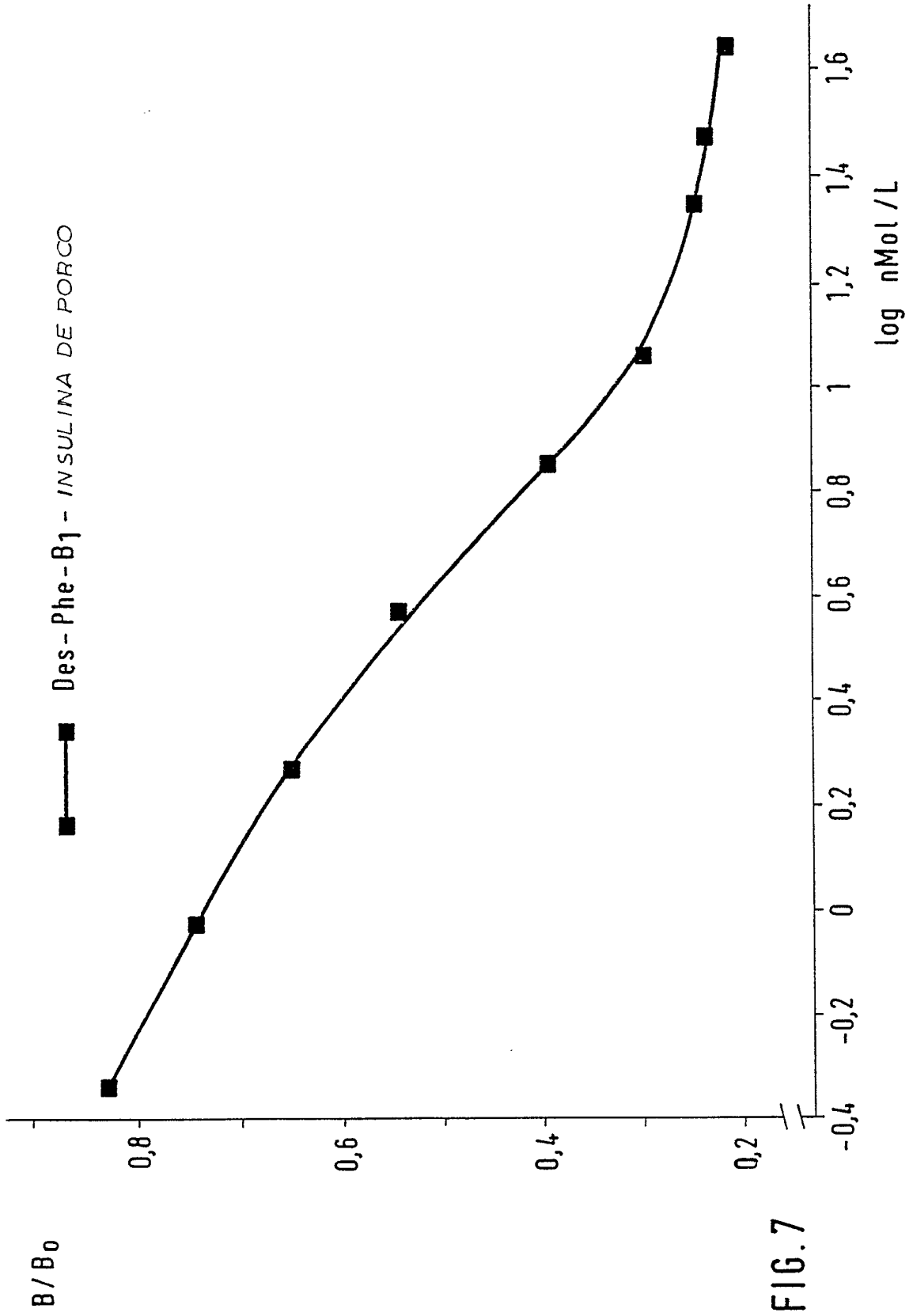


FIG. 7



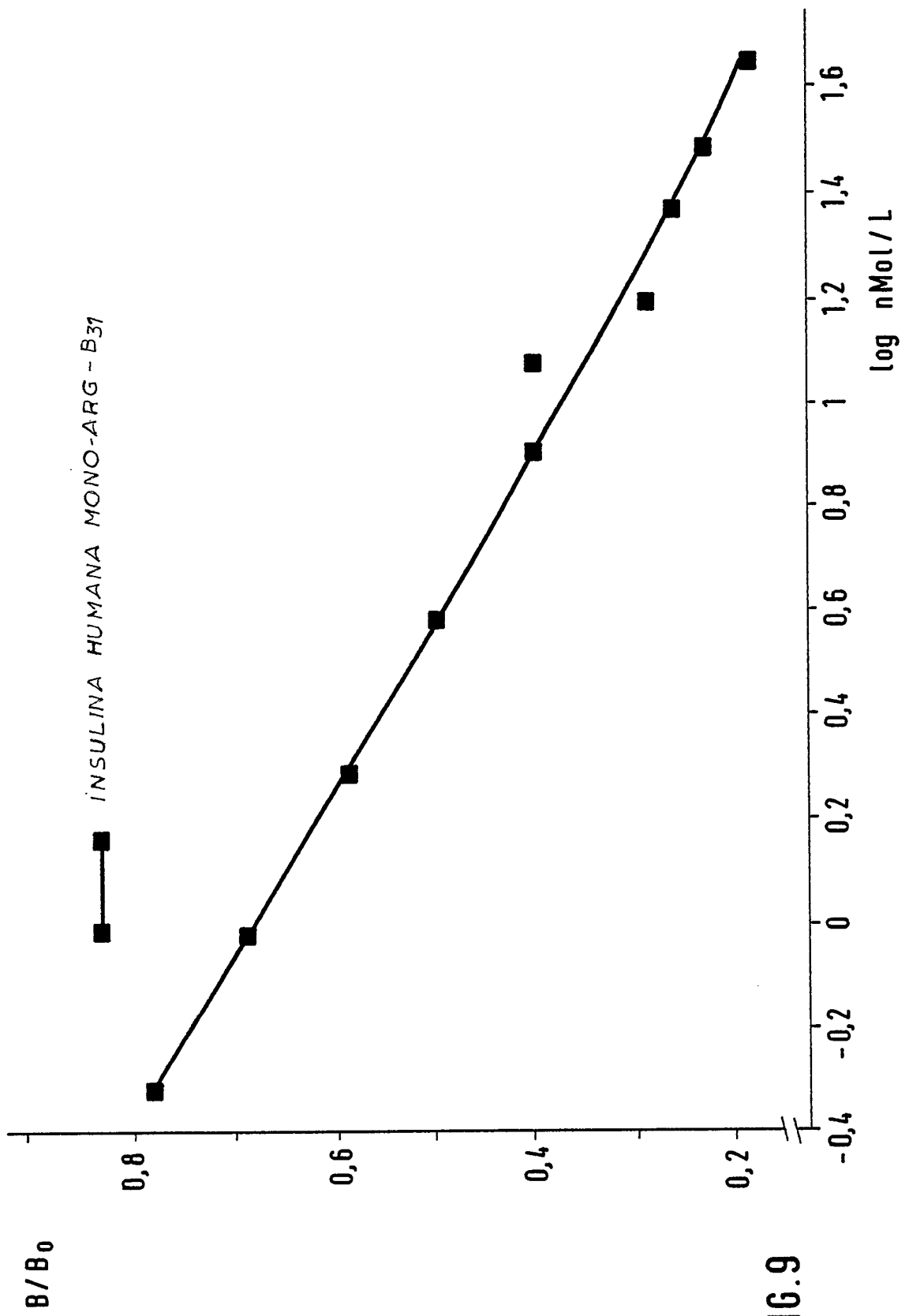
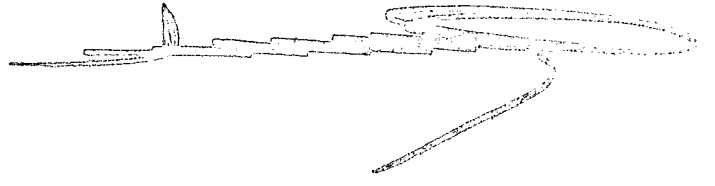


FIG.9



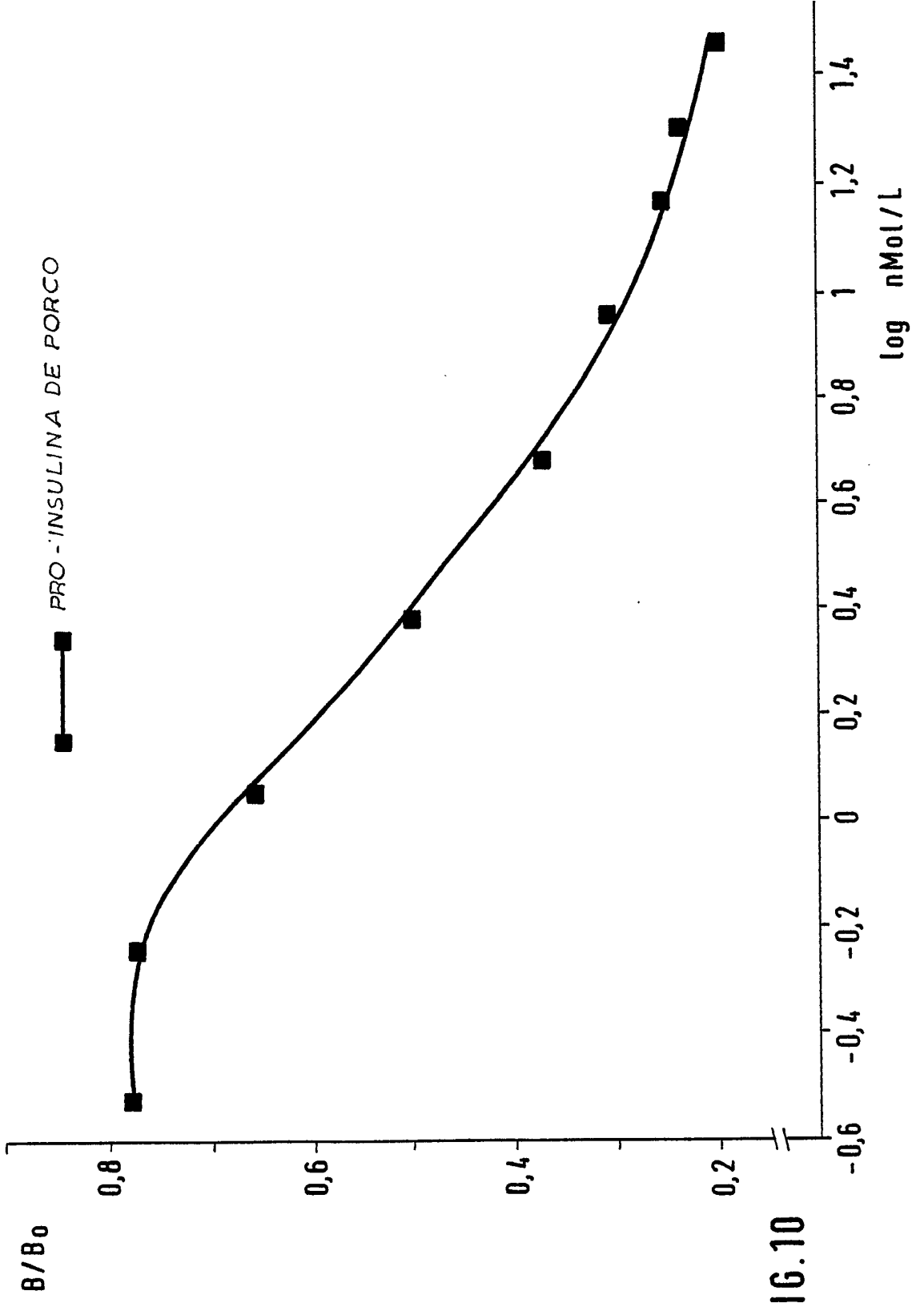
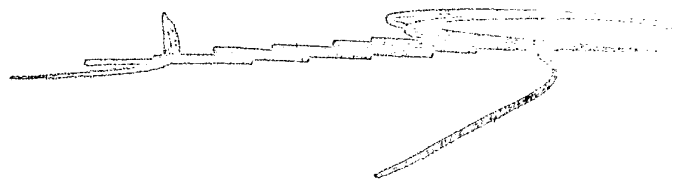


FIG. 10



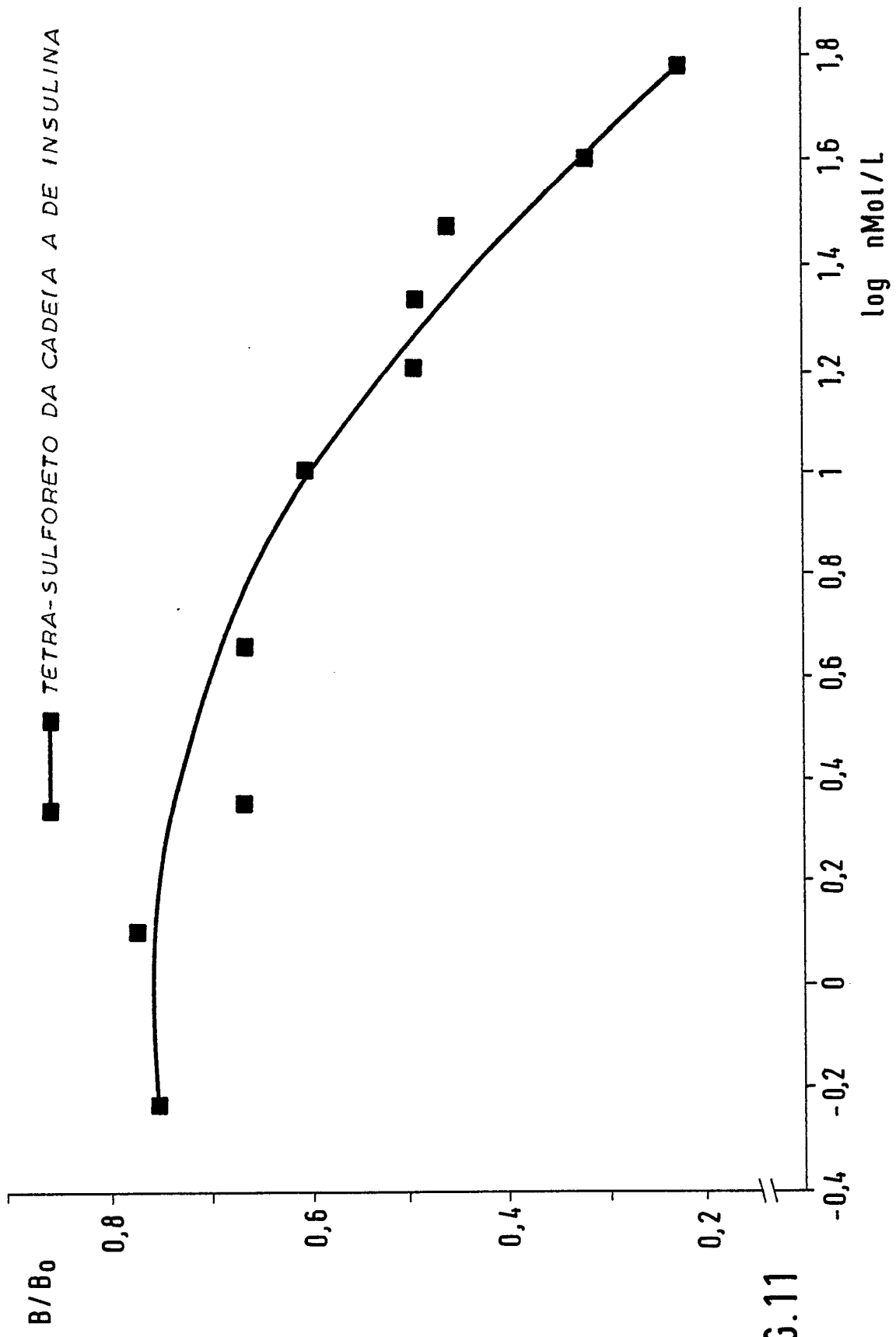
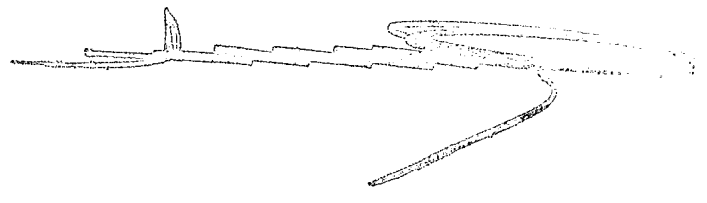


FIG. 11



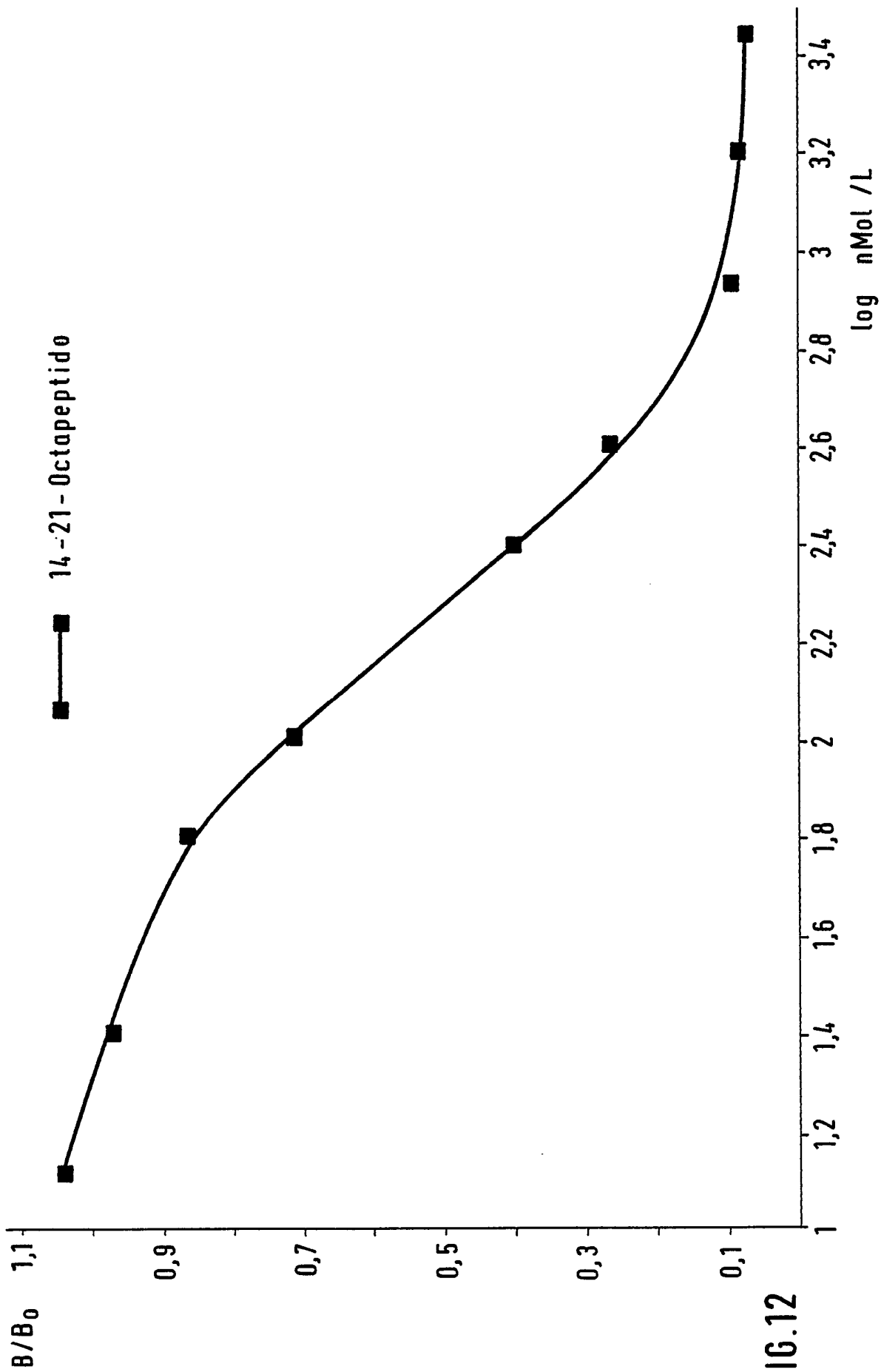
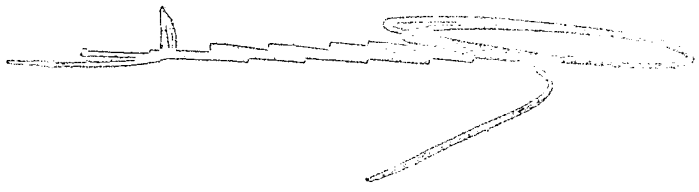


FIG.12



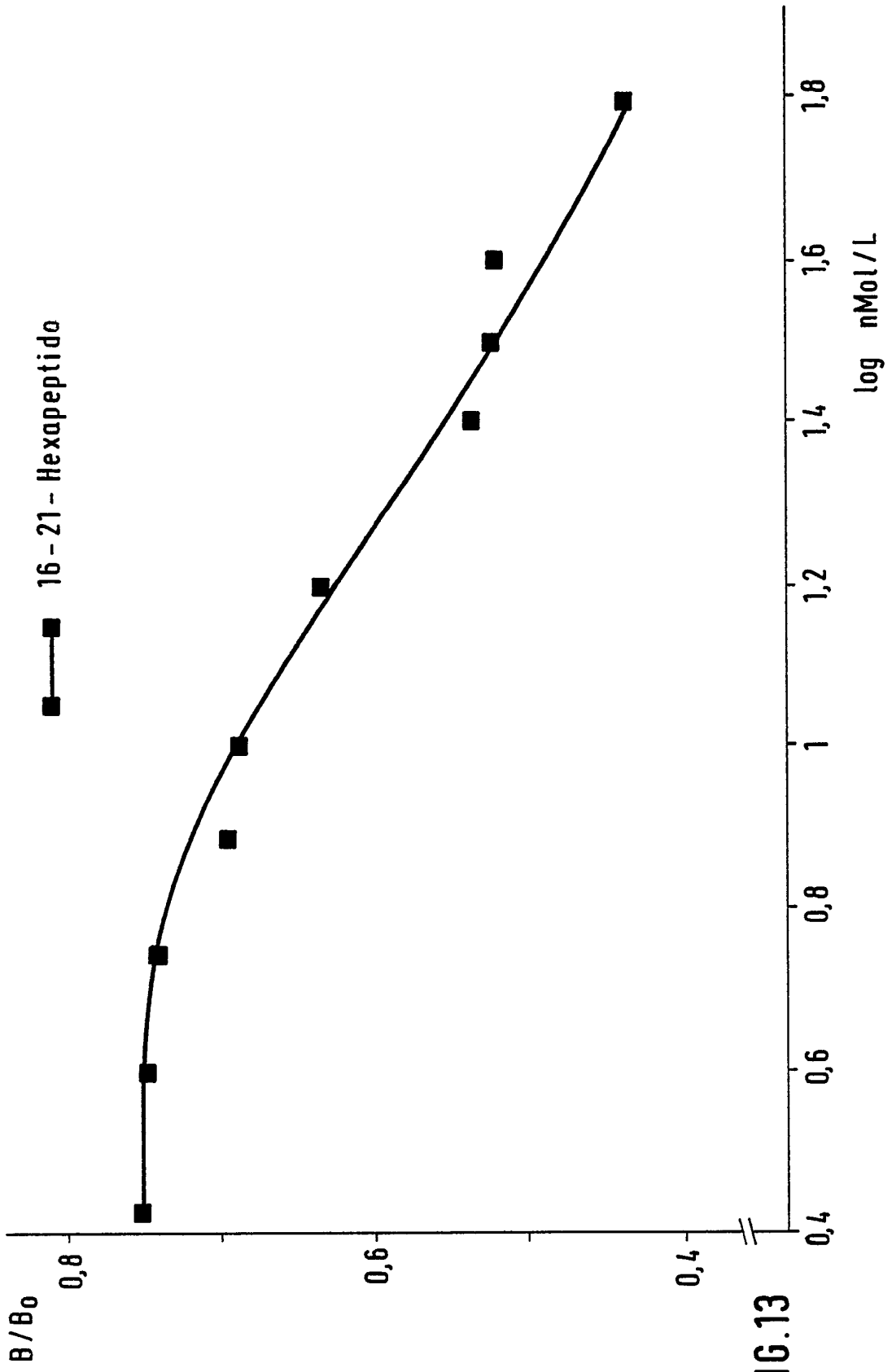


FIG.13

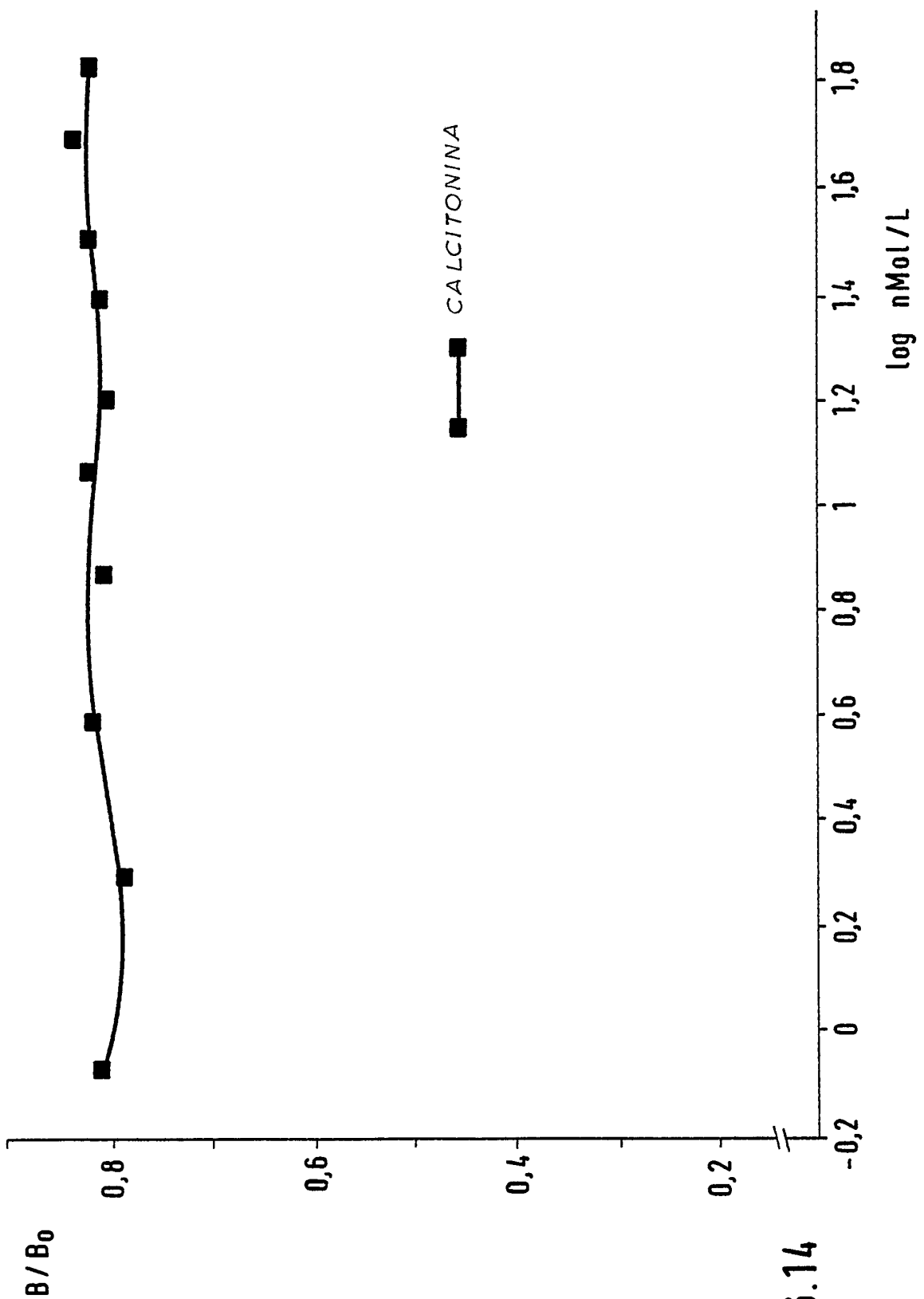


FIG.14

CALCITONINA

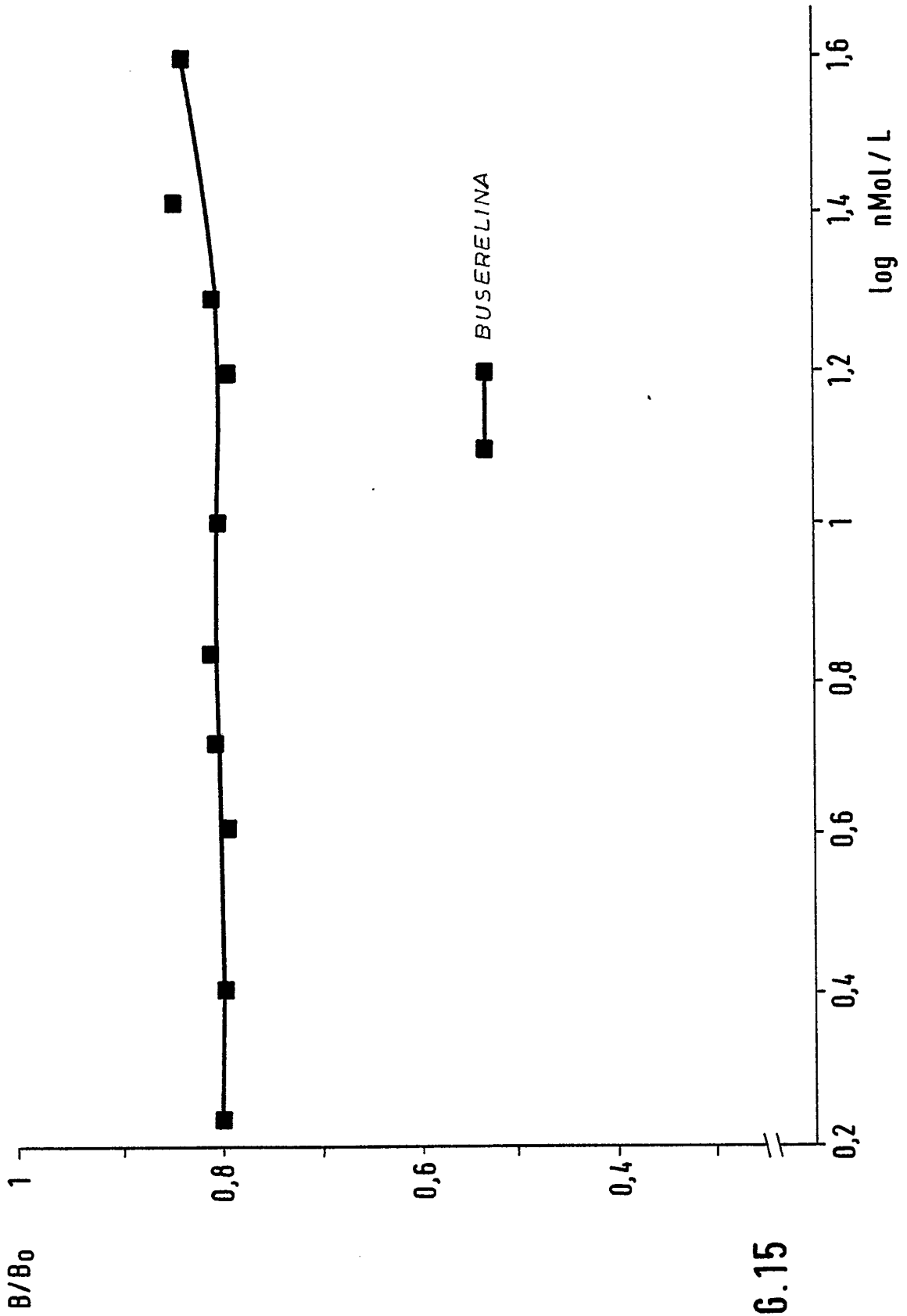


FIG.15