



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg; Alemanha Ocidental, (inventores: Dr. Hermann Pelzer, Dr. Werner Stube e Dr. Klaus-Dister Hungerer, residentes na Alemanha Ocidental) para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTIGENES SINTÉTICOS".

D E S C R I Ç Ã O

A invenção refere-se a antígenos sintéticos constituídos por um péptido e por uma proteína de membrana de *Neisseria meningitidis* como molécula antigenizante, a um processo para a sua preparação, à sua utilização para a preparação de anticorpos, bem como à utilização dos antígenos ou dos anticorpos como medicamentos e dos anticorpos como meios de diagnóstico.

Na EP-A-0 161 188 encontra-se descrito que as proteínas de membrana da *Neisseria meningitidis* se podem ligar a polissacarídeos, de modo a melhorar a sua antigenidade.

De acordo com o estado da técnica, os péptidos que não são antígenos (haptenos) e contra os quais se quer preparar um anticorpo, ligam-se a uma molécula de elevado peso



molecular, de preferência solúvel, obtendo-se assim os chamados conjugados, com os quais se podem imunizar animais, por exemplo coelhos ou ratos. Após um tempo de quarentena de alguns dias ou semanas tiram-se amostras de sangue aos animais, após eventuais reforços, para se obterem os anticorpos.

Como moléculas de alto peso molecular usam-se na maior parte dos casos proteínas, referindo-se em particular a hemocianina "Keyhole Limpet" e a albumina.

Os conjugados de hemocianina "Keyhole Limpet" têm as desvantagens de serem pouco solúveis e de se induzirem anticorpos contra a hemocianina "Keyhole Limpet".

Estas desvantagens foram surpreendentemente ultrapassadas pela presente invenção, utilizando-se como proteína antigenizante para péptidos não antigénicos, de preferência para oligo-ou poli-péptidos com até 100 aminoácidos, uma proteína de membrana de *Neisseria meningitidis*.

O objetivo da invenção são por isso conjugados de uma proteína de membrana de *Neisseria meningitidis* e de um péptido.

Utiliza-se de preferência a proteína B₂ -meningococcus.

A preparação dos conjugados de péptido-proteína efectua-se de acordo com métodos em si conhecidos, por exemplo por acoplamento por meio de diglutaraldeído ou por introdução de grupos maleimido na proteína seguida da ligação de um péptido através da respectiva função sulfidrílo livre.

A preparação dos conjugados de péptido-proteína através do diglutaraldeído, dissolve-se por exemplo a proteína B-meningococcus num tampão, de preferência 1mg de proteína em 1 ml de PBS (solução salina tamponizada com fosfato), adiciona-se o péptido, de preferência 1 - 2 mg de péptido por mg de



proteína, e adiciona-se, por mg de proteína 5 - 20 µl, de preferência 10 µl, de uma solução aquosa a 25% de diglutaraldeído. Agita-se a solução à temperatura ambiente durante 30 minutos a 5 horas, de preferência durante 1 hora, e adicionam-se, por mg de proteína, 40 mg de lisina, para bloquear os grupos aldeído reactivos. Decorridos mais 10 minutos dializa-se contra água destilada e recupera-se o conjugado de preferência por liofilização.

Para a ligação de péptidos contendo grupos tiol à proteína podem ligar-se os grupos tiol através de pontes di-sulfureto ou tioéter à proteína B-meningococcus, efectuando-se de preferência a preparação do conjugado através da ligação de tioéteres.

Numa forma de execução preferencial para a conjugação derivatiza-se em primeiro lugar a proteína de modo a permitir a ligação directa dos grupos tiol à proteína. Para tal dissolve-se a proteína num tampão de pH 7 - 9, de preferência num tampão de hidrogenocarbonato ou de fosfato de sódio, e faz-se reagir com uma substância contendo grupos N-maleimido, de preferência com éster hidroxisuccinimídico do ácido N-maleimidobutírico. Após separação da proteína assim "activada", por exemplo por meio de permeação de gel em Sephadex ^(R)-G 50, adiciona-se, por mg de proteína, 1 - 3 mg de péptido contendo grupos tiol e deixa-se reagir a mistura durante 0,5 - 10 horas, de preferência durante 1 hora. O conjugado de proteína-péptido pode recuperar-se depois como habitualmente, de preferência por meio de diálise e liofilização.

Com um conjugado assim preparado efectua-se a imunização de animais apropriados, formando-se anticorpos contra o péptido sintético. A espécie animal preferida para a imunização e obtenção de anticorpos é, neste caso, o coelho. O antígeno sintético pode também utilizar-se para a imunização de ratos e para a preparação de anticorpos monoclonais utilizando a técnica do hibridoma.



O antisoro obtido pela imunização com o conjugado reage especificamente com a proteína da qual deriva a sequência peptídica utilizada para a imunização.

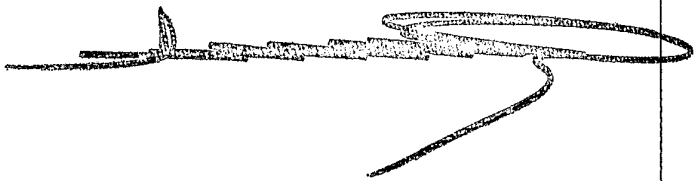
Para além da boa solubilidade do conjugado verificou-se surpreendentemente que o antisoro dirigido contra o péptido não apresenta, na difusão imunológica dupla, qualquer reactividade preponderante com a proteína meningococcus. Isto é tanto mais surpreendente quanto na utilização de outras proteínas antigenizantes ocorre logo a indução de anticorpos contra elas dirigidos.

Os anticorpos obtidos de acordo com a invenção podem utilizar-se para uma série de vários tipos de testes imunológicos.

Os exemplos destinam-se a ilustrar a invenção. Nestes exemplos utilizam-se as seguintes abreviaturas:

GMBS éster N-hidroxisuccinimídico do ácido gama-maleimidobutírico.

Cys	L-cisteína
Leu	L-leucina
Phe	L-fenilalanina
Ser	L-serina
Pro	L-prolina
Glu	L-ácido L-glutânico
Lys	L-licina
Gly	glicina
Val	L-valina
Ala	L-alanina
Arg	L-arginina
Asp	ácido L-asparagénico
Tyr	L-tirosina
Asn	L-asparagina
KLH	hemocianina "Keyhole Limpet"
AT III	antitrombina III



Exemplos

Exemplo 1

- a) Derivatização da proteína B-meningococcus com grupos maleimido

Dissolveram-se 40mg de proteína B-meningococcus em tampão de fosfato de sódio 0,05 mM, pH 8,0, e activaram-se com 5 mg de GMBS durante 1 hora. Cromatografou-se o produto bruto numa coluna de Sephadex ^(R)-G 50 (2 x 30 cm) em fosfato de sódio 0,1 M/EDTA 0,5 mM, pH 6,0. Recolhe-se a fracção contendo a proteína e concentra-se até ao volume de 8 ml.

- b) Preparação do conjugado de péptido-proteína: proteína B-meningococcus- (AT III 343-363)

À fracção contendo a proteína (vide exemplo 1a) adicionaram-se 40mg de péptido com a estrutura Cys-Leu-Phe-Ser-Pro-Glu-Lys-Ser-Lys-Leu-Pro-Glu-Ile-Val-Ala-Ala-Glu-Gly-Arg-Asp-Asp-Leu-Tyr (AT III 343-363), preparado pelo método da síntese peptídica em fase sólida, e agitou-se a mistura durante 1 hora na ausência de oxigénio. Após diálise e liofilização obtiveram-se 48 mg de conjugado péptido proteína.

Exemplo 2

- a) Derivatização de Hemocianina "Keyhole Limpet" com grupos maleimido.

De modo análogo ao do exemplo 1a), derivatizaram-se 40 mg de KLH.

- b) Preparação de KLH-(AT III 343-363)

De modo análogo ao do exemplo 1b,) acoplaram-se 40 mg do péptido AT III 343-363 à KLH derivatizada de



acordo com o exemplo 2a). Rendimento: 45 mg.

Exemplo 3

Preparação de Proteína B-meningococcus-(AT III 129-140)

Acoplaram-se 40mg do péptido Cys-Arg-Leu-Tyr-Arg-Lys-Ala-Asn-Lys-Ser-Ser-Lys-Leu (AT III 129-140) à proteína B-meningococcus "activada" de acordo com o exemplo 1. Rendimento: 47mg.

Exemplo 4

Preparação de KLH-(AT III 129-140)

De modo análogo ao do exemplo 3, acoplou-se o péptido AT III 129-140 à KLH derivatizada com GMBS . Rendimento: 49mg.

Exemplo 5

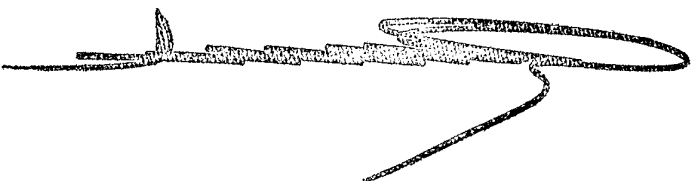
Imunização de coelhos e teste dos antisoros

Imunizaram-se 5 coelhos com 2 mg de antigene cada um durante um período de 8 semanas, efectuando-se em seguida a aplicação dos conjugados de modo subcutaneo e intravenoso. Recolheram-se em seguida amostras de sangue dos animais, reuniram-se os antisoros obtidos e estabilizaram-se com conservantes.

Exemplo 6

a) Teste dos antisoros por meio da técnica de ensaio imunológico enzimático (ELISA)

O teste da reacção imunológica dos antisoros obtidos efectuou-se por meio da técnica ELISA. Diluiu-se



antigene -AT III de elevado grau de pureza com uma solução Tris (0,025mol/l) até uma concentração de 10 µg/ml e imobilizou-se por meio de adsorção em tubos de poliestireno . Diluiu-se o antissoro a testar com tampão de incubação (0,01 mol/l Tris; 0,05% Tween; pH 7,6) na proporção de 1:1, colocou-se 200 µl desta solução em cada tubo e incubou-se durante 30 minutos a 37° C. Removeu-se em seguida a solução de incubação e lavaram-se 2 vezes com 500 µl de solução de lavagem (0,02 mol/l de fosfato de sódio; 0,05% Tween; pH 7,6) de cada vez. Adicionaram-se então 200 µl de conjugado de peroxidase-anticorpos antigomoglobulina de coelho e incubaram-se os tubos durante 30 minutos a 37°C. Após remoção da solução de conjugado e duas lavagens adicionaram-se 200 µl de solução de substrato-cromogene (peróxido de hidrógeno, o fenilenodiamina) e incubaram-se os tubos a 18-22°C. Passados 30 minutos inactivou-se a peroxidase com ácido sulfúrico e mediu-se a adsorção da solução reaccional a 492 nm.

Utilizou-se a técnica ELISA para testar todos os antissoros que se obtiveram a partir dos conjugados péptido-proteína descritos nas alíneas 1b), 2b), 3) e 4). Aplicaram-se nestes testes os antissoros em várias diluições (1:10¹ -1:10⁵).

Na tabela seguinte apresentam-se os valores de absorção a 492 nm em função da diluição de antissoro em relação à absorção de um tubo com solução tampão.

A semelhança dos valores de absorção medidos para cada um dos graus de diluição demonstra que tanto a KLH como a proteína meningococcus são igualmente apropriadas como proteína antigenizante de alto peso molecular, embora o antissoro obtido com o conjugado de proteína meningococcus não reaja com a proteína meningococcus na difusão imunológica dupla (vide b)).

b) Teste dos antissoros pela técnica da difusão imunológica dupla.

Os antissoros descritos na alínea 6a) testaram-se pela técnica da difusão imunológica dupla por formação de precipitado em relação à proteína de suporte.

Os antissoros obtidos com o conjugado de KLH-péptido mostraram, em diluições de 1:16, em relação ao antígeno de KLH, uma linha de precipitado evidente em gel de agarose. Pelo contrário, os antissoros, obtidos com o conjugado de meningococcus-péptido não deram qualquer precipitado imunológico com proteína B-meningococcus.

Tabela 1

Antissoro contra	Grau de diluição	OD 492 nm/30 min
Conjugado de péptido-proteína	1 : 10	2,0
	1 : 100	1,68
B meningococcus	1 : 1000	1,30
(AT III 343-363)	1 : 10000	6,77
	1 : 100000	0,63
Conjugado de péptido-proteína	1 : 10	1,28
	1 : 100	0,83
B meningococcus	1 : 1000	0,26
(AT III 129-140)	1 : 10000	0,09
Conjugado de péptido-KLH	1 : 10	2,0
	1 : 100	1,76
(AT III 343-363)	1 : 1000	1,32
	1 : 10000	0,79
	1 : 100000	0,72
Conjugado de péptido-KLH	1 : 10	1,03
	1 : 100	0,84
(AT III 129-140)	1 : 1000	0,34
	1 : 10000	0,14
Valor em branco do tampão		0,03

REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de um conjugado de proteína de membrana de *Neisseria meningitidis* e de um péptido caracterizado por se efectuar a ligação entre a proteína e o péptido por meio de um processo da química peptídica, por exemplo através do acoplamento de diglutaraldeído ou por introdução de grupos maleimido na proteína seguido da ligação do péptido através das suas funções sulfidrilo.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína ser a proteína *Meningococcus B₂*.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o péptido ser um péptido da antitrombina III.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 7 de Dezembro de 1988, sob o número P 38 41 091.5.

Lisboa, 6 de Dezembro de 1989
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



R E S U M O"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTIGENES SINTÉTICOS

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um conjugado de uma proteína de membrana de *Neisseria meningitidis* e de um péptido, que compreende efectuar-se a ligação entre a proteína e o péptido por meio de um processo da química peptídica, por exemplo através do acoplamento do di-glutaraldeído ou por introdução de grupos maleimido da proteína seguido da ligação do péptido através das suas funções sulfidrilo.