

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96 945

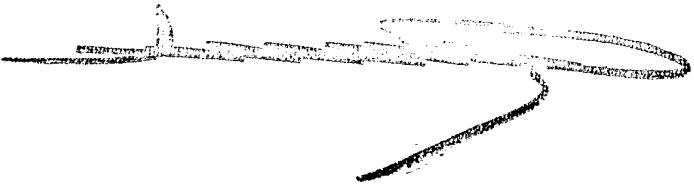
REQUERENTE: BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, com sede
em D-3550 Marburg, República Federal Alemã

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS"

INVENTORES: Dr. Klaus Bosslet, Dr. Peter Hermentin e
Dr. Gerhard Seemann

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 7 de Março de 1990, sob o
N.º. P 40 07 079.4



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã (inventores: Dr. Klaus Bosslet, Dr. Peter Hermentin e Dr. Gerhard Seemann, residentes na República Federal Alemã) para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS".

Descrição

A invenção refere-se a anticorpos monoclonais (MAK) que se ligam com alta especificidade e avidéz a complexonas solúveis em água, como por exemplo etilenodiaminotetraacetato (EDTA) ou a dietilenotriaminopentaacetato (EDTA) e que após complexação do EDTA ou do DTPA com iões metálicos mantêm a sua alta avidéz e especificidade a estas complexonas.

Estes MAK podem pois ser utilizados, por exemplo acoplados sobre filtros ou outros suportes, para a eliminação de metais pesados tóxicos que são complexados com EDTA. Para além disso estes MAK são apropriados como componentes de imunoensaios (RIA, ELISA, etc.) para a determinação quantitativa de EDTA ou respectivamente DTPA em soluções aquosas.

Os metais pesados que são ligados com complexonas, como por exemplo EDTA, representam no campo do tra-

tamento de águas potáveis um grave risco. Por consequência a determinação rápida, exacta e quantitativa da concentração de ADTA é tão importante como a eliminação de complexos EDTA-metal das águas residuais ou da água potável.

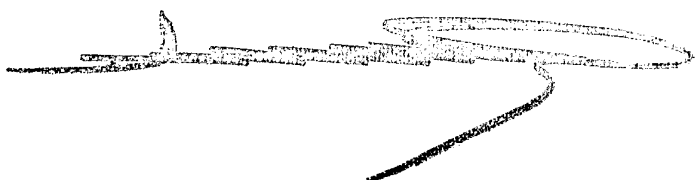
No nosso trabalho para obtenção de MAK contra complexonas hidrófilas no âmbito da terapia de tumores aconteceu-nos surpreendentemente, produzir MAK que possuem uma elevada avidéz tanto contra EDTA ou DTPA não complexados, bem como também contra estas substâncias complexadas com metais.

Os MAK foram preparados do seguinte modo. Complexou-se como heptano isotiocianato-benzil-DTPA acoplado sobre albumina de soro humano e acolado com iões de ítrio. Com estes complexos hapteno- "Carrier" imunizaram-se em seguida ratos apropriados e os baços dos ratos com os mais altos títulos de anticorpo anti-DTPA foram fundidos com uma linha de células de mieloma apropriada. Os hibridomas resultantes foram ensaiados no "Enzyme-linked Immunoassay (ELISA)" específico descrito adiante.

O ensaio ELISA consistiu numa fase sólida que foi carregada com uma solução contendo albumina de soro humano (HSA)-benzil-DTPA. O sobrenadante a ensaiar, contendo o MAK, foi pré-incubado com a complexona livre ou com o seu complexo de ião metálico e mediu-se a sua ligação à fase sólida específica. Para isso utilizou-se um sistema de amplificação de enzima que estava acoplado a um anticorpo anti-immoglobulina de rato. Os pormenores desta metodologia estão descritos nos exemplos 2 e 3.

Por meio deste sistema de ensaio obtiveram-se MAK que possuem as propriedades descritas no quadro I.

Estes MAK, ao contrário de muitos outros MAK anti-DTPA/EDTA, não se ligam ao tecido humano normal, como foi determinado por meio da técnica APAAP (Cordell et al, J. Histochem. Cytochem. 32:219, 1984) sobre tecidos conservados criogenicamente. É por conseguinte possível uma utilização in vivo destes MAK no campo do diagnóstico e da terapia.



Como competidores utilizaram-se as complexonas DTPA e EDTA na forma não complexada (exemplo 4). Adicionalmente empregaram-se como inibidores os compostos estruturalmente análogos ácido trans-aconítico e 1,2-diaminoetano (ver Quadro I). Os excessos de competidor, apresentados no quadro I, que conduzem a uma inibição de 50 % da ligação MAK-antigene, mostram que os MAK utilizados possuem uma forte ligação tanto a EDTA ou DTPA não complexados como também a EDTA ou DTPA complexados com iões metálicos. Estas características permitem uma utilização dos MAK, por exemplo acoplados sobre filtros ou outros suportes sólidos, para a eliminação tanto de EDTA ou DTPA não complexados como também de complexos de EDTA ou DTPA com iões metálicos de líquidos. São igualmente apropriadas reacções de precipitação de complexos MAK/EDTA-ião metálico para a eliminação dos iões metálicos tóxicos.

É particularmente adequado para esta utilização o MAK BW 2050/535, cuja interacção com EDTA e com os seus complexos é excepcionalmente forte.

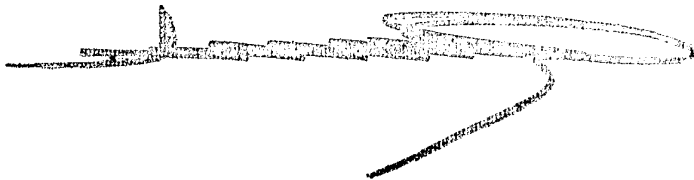
A invenção refere-se por conseguinte a anticorpos monoclonais (MAK) de alta afinidade tanto contra EDTA ou DTPA complexados com iões metálicos, como também contra estas substâncias não complexadas, ao processo para a sua preparação bem como à sua utilização como constituintes de um agente de diagnóstico ou de um agente terapeutico, ou para a eliminação de iões metálicos tóxicos.

A invenção é ainda abordada com mais pormenor nos exemplos e está caracterizada nas reivindicações de patente.

Exemplo 1:

Preparação de anticorpos monoclonais específicos para EDTA ou DTPA

Utilizou-se como hapteno isotiocianato-benzil-DTPA acoplado de forma covalente sobre albumina de



soro humano (HSA) como veículo 8"Carrier", com um grau de derivação de 19 moléculas de benzil-DTPA por molécula de HSA, correspondente à metodologia descrita por N. W. Brechbiel et al., Inorganic Chemistry 25: 2772-2781 (1986). 20 ug deste complexo hapteno-veículo, no qual foi complexado YCl_3 não marcado, foram injectados por via subcutânea em ratos BALB/C no dia 0 com adjuvante de Freundschem, no dia 7 e 14 com adjuvante de Freundschem incompleto e no dia 21 com PBS. No dia 24 os braços dos ratos com os mais altos títulos de anticorpo anti-DTPA foram fundidos com a linha de células de mieloma SP210-Ag14 (Shulman et al. Nature 276:269 (1976)). Os hibridomas formados foram ensaiados num ensaio ELISA específico (exemplo 2) quanto à produção de anticorpos monoclonais de alta afinidade.

Exemplo 2:

Ensaio ELISA de inibição quantitativa para MAK por meio de complexos de DTPA ou EDTA

Como material de suporte foram utilizadas placas de microtítulo divisíveis, de poliestireno, de 96 cavidades (forma U) tipo B, da Firma Nunc. 4-60 445. O ensaio foi realizado de acordo com o seguinte protocolo.

- (1) pipetaram-se por cavidade 50 μ g de conjugado Y-benzil-DTPA-HAS 19 com uma concentração de 1 μ g de conjugado por ml de PBS, pH 7,2 e incubou-se uma noite à temperatura ambiente (TA).
- (2) O sobrenadante foi removido por aspiração e lavado 3 vezes com tampão tris-citrato 0,05 M, pH 7,4 (solução de lavagem 1) (1 x lavagem = enchimento de cada cavidade com cerca de 200 μ l de solução de lavagem, deixar em repouso 2 minutos, aspirar).
- (3) Se a placa de microtítulo não for necessária imediatamente, deixa-se uma noite sobre celulose à temperatura ambiente (aberturas para baixo). Em se-

guida a placa é encerrada em folhas com cartuchos desidratantes (Firma Gaplast, Apt^o 529, 8100 Germishe-Partenkirchen). Nestas condições as placas podem conservar-se a +4°C durante pelo menos 8 semanas.

- (4) Colocam-se 250 ul da solução de bloco por cavidade e deixa-se incubar 30 minutos a 37°C.
- (5) Durante a formação dos blocos realiza-se a pré-incubação de sobrenadante de hibridoma diluído com o competidor (ver exemplo 3 ou exemplo 6).
- (6) Tomam-se dos sobrenadantes de hibridomas a ensaiar, convenientemente diluídos previamente e incubados previamente, por cada cavidade, 50 ul e deixam-se incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
- (7) Em seguida lava-se 3 x com a solução de lavagem 2.
- (8) Seguidamente aplicam-se por cada cavidade 50 ul de anticorpos de cabra I_G₁ anti-rato diluídos a 1:500 na solução de bloco, marcados com fosfatase alcalina, e deixa-se incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
- (9) Seguidamente lava-se 3 x com solução de lavagem para Enzygnost^R (Behringwerke AG).
- (10) Em seguida adicionam-se 50 ul de NADP 0,1 mM.
- (11) Deixa-se depois incubar 30 minutos à temperatura ambiente.
- (12) Durante a incubação com NADP adiciona-se o sistema de reforço como se segue:

adicionam-se por placa 2 partes de violeta de p-iodo-nitrotetrazólio (INT) e uma parte de PBS, pH 7,2, adiciona-se depois 1 parte de diaforase e pipeta-se ainda 1 parte de ADH.
- (13) Adicionam-se 50 ul deste sistema de reforço por cavidade.

- (14) Quando se dá uma nítida viragem de cor incolor para vermelho a reacção é parada com 100 ul de uma solução 0,1 N de ácido sulfúrico por va cavidade.
- (15) Medem-se as extinções a 492 nm em TITERTEK^R MULTISCAN. Como ensaio em branco utilizam-se 50 ul de NADP com 50 ul de solução de reforço e 100 ul de ácido sulfúrico 0,1 N.

Foram utilizados os seguintes reagentes:

NADP - Fa. Sigma Best. Nr. N-0505

INT - Fa. Sigma Best. Nr. I-8377

ADH - Fa. Sigma Best. Nr. A-3263

DIAPHORASE - Fa. Sigma Best. Nr.D-2381

Solução de

lavagem 2 - Fa. Behring, Best. Nr. OSEW96, contém Tween/PBS

Solução de bloco: PBS, pH 7,2, por adição de caseína e agitação de 30 minutos, é ajustada a 3 % em caseína e também a pH 7,4. Seguidamente eliminam-se por centrifugação as partículas durante 10 minutos a 4.000 rpm.

Anticorpos de cabra IgG₁ anti-rato diluído, marcado com fosfatase alcalina (Firma Southern Biothchnology Associates, No. de catálogo 1080-04).

Preparação de NADP 0,1 mM:

Dissolvem-se 7,65 mg de NADP em 100 ml de tris 20 mM, MgSO₄ 0,1 mM, pH 9,5; a solução pode ser conservada vários meses a -20°C.

Preparação de INT (violeta de p-iodo-nitrotetrazólio):

Dissolvem-se 2,5 mg/ml em etanol a 30 % em banho de ultras-sons; utilizar sempre solução recém-preparada.

Preparação de diaforase/ml de PBS, pH 7,2, conservada em pequenas porções a -20°C.

Preparação de disegrogenase de álcool:

0,5 mg de ADH/ml de PBS, pH 7,2, são conservados em porções a -20°C .

Exemplo 3

Pré-incubação do sobrenadante de hibridoma com o comptidor

A concentração de IgG de rato no sobrenadante de hidrogedoma pode ser determinada por meio de sistemas ELISA quantitativos obtidos comercialmente e constituem uma técnica corrente.

Com base na determinação da concentração em ELISA diluem-se os sobrenadantes de hibridoma a $1,25\text{ }\mu\text{g/ml}$ em PBS isento de Ca^{++} e de Mg^{++} .

Calculo de gramas em mol: $150\ 000\text{ g} = 1\text{ mol}$ de MAK

$$1,25\text{ }\mu\text{g} = 8,33 \times 10^{-12}\text{ mol}$$

Para se ter uma relação 1+1 de MAK e inibidor adicionaram-se a $50\text{ }\mu\text{l}$ de sobrenadante de hibridoma com uma concentração de $8,33 \times 10^{-12}\text{ mol/ml}$ $10\text{ }\mu\text{l}$ de inibidor com uma concentração elevada de um factor 5 de $8,33 \times 10^{-12}\text{ mol/200 ul}$.

O sobrenadante de hibridoma é incubado 30 minutos à temperatura ambiente com um excesso de competidor de 100 000 vezes, de 50 000 vezes, de 10 000 vezes, de 5 000 vezes e de 100 vezes. Destas soluções pipetam-se $50\text{ }\mu\text{l}$ para os ensaios ELISA (ver exemplo 2, ponto 6).

Exemplo 4

Produção de complexo de DTPA ou EDTA

As constantes de complexos de DTPA ou de EDTA para os iões metálicos constantes do quadro I é extremamente alta, de modo que na mistura em proporção equimolecular de DTPA ou EDTA com estes iões metálicos é de esperar uma saturação completa. Os iões metálicos correspondentes foram incubados por essa razão num excesso molar triplo com o DTPA ou EDTA. Como exemplo incubaram-se $170\text{ }\mu\text{l}$ de uma solução

10 mM de sulfato de cálcio em água bidestilada (ver exemplo 5) com 30 µl de uma solução-mãe 0,028 de DTPA em água bidestilada durante 5 minutos à temperatura ambiente. A incorporação de 10 µl desta solução de competidor com o sobrenadante de hibridoma conduziu a um excesso de 100 000 vezes de competidor relativamente ao anticorpo monoclonal contido no sobrenadante de hibridoma. Foram obtidos menores relações de competidor para MAk diluindo-se a solução de competidor de harmonia com o excesso molar pretendido (ver exemplo 3) em cada uma das soluções de iões salinos.

Exemplo 5

Fontes e parâmetros físico-químicos relevantes dos iões metálicos utilizados

Prepararam-se soluções 10 milimolar em água bidestilada dos seguintes iões metálicos:

cloreto de manganês PM 161,88

Fa. Merck Nr. 5934

Raio iónico Mn: 80 pm

sulfato de cálcio PM 256,5

Fa. Riedel de Haen Nr. 31145

Raio iónico Cd: 97 pm

Cloreto de zinco PM 136,28

Fa. Merck Nr. 8816

Raio iónico Zn: 74 pm

Sulfato de cobre PM 159,61

Fa. Riedel de Haen Nr. 31294

Raio iónico Cu: 96 pm

Cloreto de étrio PM 303,36

Fa. Aldrich Nr. 20,491-9

Raio iónico Y: 92 pm

Nitrato de chumbo (II) PM 331,20

Fa. Riedel de Haen Nr. 31137

Raio iónico Pb: 120 pm

Exemplo 6

Imunoensaio enzimático competitivo para determinação da concentração de EDTA ou de DTPA em dissolventes aquosos

No ensaio ELISA quantitativo de inibição, descrito no exemplo



2, em vez das quantidades de competidor definidas (linhas 15 - 17, passo 5) incorpora-se uma amostra aquosa (50 ul) com um teor desconhecido de EDTA, a determinar. A restante marcha do ensaio é realizada como foi descrito no exemplo 2, passo 6-15. A redução da extinção é proporcionar à concentração de EDTA ou DTPA nas amostras desconhecidas. Depois de ajustamento de uma recta de calibração por adição de concentrações definidas de EDTA ou DTPA e da correspondente diluição prévia das amostras desconhecidas a ensaiar, determina-se quantitativamente a concentração de EDTA ou DTPA nas amostras desconhecidas.

Exemplo 7

Descrição de MAk especialmente apropriado BW 2050/535

Os genes V_H e V_L de MAk BW 2050/535 foram clonados de acordo com o método descrito por Orlandi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 3833 (1989)) e em seguida foram sequenciados.

A sequência dos ácidos nucleicos do gene V_H do MAk BW 2050/535 está representada no quadro 11 e a do gene V_L está representada no quadro III. A sequência do gene V_H compreende a sequência codificante para os aminoácidos 4 a 110 da proteína madura.

A sequência do gene V_L compreende a sequência codificante dos aminoácidos 3 a 106 da proteína madura.

Os aminoácidos estão indicados no código de três letras.

Quadro I

Teste de inibição quantitativo de MAK por complexos de DTPA ou EDTA

Excesso molar de competidor que conduz a 50 % de inibição da ligação do antígeno da fase sólida.

MAK-Nr.	DTPA-Y	DTPA	DTPA-Mn	DTPA-Cd	DTPA-Zn	DTPA-Cu	DTPA-Pb	1,2-Diaminoetano
2050/174	10^4	10^3	10^2	10^2	5×10^3	5×10^3	10^3	nenhuma inibição até 10^5
2050/531	5×10^4	10^3	10^2	10^2	5×10^3	5×10^3	5×10^3	"
2050/532	5×10^4	10^3	10^2	10^2	5×10^3	5×10^3	5×10^3	"
2050/534	5×10^4	10^3	10^2	10^2	5×10^3	5×10^3	5×10^3	"
2050/535	10^4	10^2	10^2	10^2	10^3	10^3	10^3	"

Quadro I (continuação)

MAK Nr.	Ácido trans-acotínico	EDTA-Y	EDTA	EDTA-Mn	EDTA-Cd	EDTA-Zn	EDTA-Cu	EDTA-Pb
2050/174	nenhuma ini- bição até 10^5	10^2	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	5×10^3
2050/531	"	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	10^2	10^5
2050/531	"	10^2	10^3	10^3	10^3	10^2	5×10^3	10^5
2050/534	"	10^2	10^3	10^2	10^2	10^3	10^3	5×10^3
2050/535	"	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2	10^2

•
•
•
—

$$= 12 =$$

2050/535 VI.

Quadro III:

1	cag	ctg	act	bag	gaa	tct	gca	ctc	acc	aca	toa	cct	ggt	gaa	aca	gtc	act	tgt	ctc	act
	gln	leu	thr	gln	glu	ser	ala	leu	thr	thr	ser	pro	gly	glu	thr	val	thr	leu	thr	cys
61	/		21								91	/	31							
	cgc	tca	agt	act	ggg	gct	gtt	aca	act	agt	aac	tat	gcc	acc	tgg	gtc	caa	gaa	aaa	cca
	arg	ser	ser	thr	gly	ala	val	thr	thr	ser	asn	tyr	ala	thr	trp	val	gln	glu	lys	pro
121	/		41								151	/	51							
	gat	cat	tta	ttc	act	ggt	cta	ata	gtt	gtt	acc	aag	aac	cga	gct	cgc	ggt	gtt	cct	gcc
	asp	his	leu	phe	thr	gly	leu	ile	gly	gly	thr	lys	asn	arg	ala	pro	gly	val	pro	ala
181	/		61								211	/	71							
	aga	ttc	tca	ggc	tcc	ctg	att	gga	gac	aag	gct	gcc	ctc	acc	atc	aca	ggg	gca	cag	act
	arg	phe	ser	gly	ser	leu	llo	gly	asp	lys	ala	leu	thr	ile	thr	gly	ala	gln	gln	thr
241	/		81																	
	gag	gat	gag	gca	ata	tat	ttc	tgt	gct	cta	tgg	tac	agc	aac	cac	tgg	gtg	ttc	ggt	gga
	glu	asp	glu	ala	ile	tyr	phe	cys	ala	leu	trp	tyr	ser	asn	his	trp	val	phe	gly	gly
301	/		101																	
	ggg	acc	aag	ctg	aaf	atc														
	gly	thr	lys	ley	lys	ile														

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

- 1ª -

Processo para a preparação de anticorpos monoclonais de alta afinidade (MAK) que reagem no estado complexado e no estado não complexado com aproximadamente a mesma especificidade e avidéz contra EDTA ou DTPA, caracterizado por se utilizar isotiocianato-benzil-DTPA ou isocianato-benzil-EDTA como hapteno acoplado e albumina de soro humano (HSA) como veículo ("carrier") para imunização e por se isolar o anticorpo monoclonal referido dos hibridomas produzidos.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se isolarem os anticorpos monoclonais referidos dos hibridomas resultantes por meio de um ensaio ELISA de competição com HSA-benzil-DTPA ou HSA-benzil-EDTA como fase sólida.

- 3ª -

Processo para a preparação de líquidos aquosos contaminados com iões pesados, caracterizado por se utilizarem materiais filtrantes contendo anticorpos monoclonais preparados pelos processos das reivindicações 1 ou 2, ou por se adicionarem anticorpos monoclonais preparados segundo o processo das reivindicações 1 ou 2, e em seguida se separarem.

- 4ª -

Processo para a determinação quantitativa de EDTA ou DTPA em soluções aquosas, caracterizado por se utilizarem anticorpos monoclonais preparados pelos processos das reivindicações 1 ou 2, de preferência na forma de um imunoensaio apropriado.

A requerente reivindica a prioridade do

pedido de patente alemão apresentado em 7 de Março de 1990, sob o No. P 40 07 079.4.

Lisboa, 6 de Março de 1991

ANTONIO MANUEL DA SILVA



- R E S U M O -

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de anticorpos monoclonais de alta afinidade (MAK) que reagem no estado complexado e no estado não complexado com aproximadamente a mesma especificidade e avidéz contra EDTA ou DTPA que compreende utilizar-se isotiocianato-benzil-DTPA ou isotiocianato-benzil-EDTA como hapteno acoplado e albumina de soro humano (HSA) como veículo ("carrier) para imunização, e por se isolar o anticorpo monoclonal referido dos hibridomas produzidos.

•
•
•