

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99.618

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

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE LI-
GAÇÃO E RECEPTORES CELULARES ISENTOS DE CÉLULAS
E DE IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO
DE AGENTES BIOLÓGICOS POR MEIO DESSE ENSAIO"

INVENTORES: Dr. Leander Lauffer, Dr. Gerd Zettmeissi e
Dr. Patricia Oquendo

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 28 de Novembro de 1990 sob o
Nº P 40 37 837.3



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã (inventores: Dr. Leander Lauffer, Dr. Gerd Zettlmeissl e Dr. Patricia Oquendo, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE LIGAÇÃO A RECEPTORES CELULARES ISENTOS DE CÉLULAS E DE IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS POR MEIO DESSE ENSAIO".

Descrição

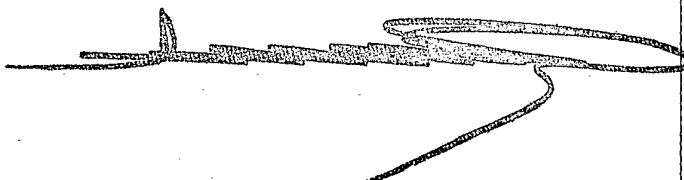
A presente invenção refere-se a ensaios de ligação a receptores celulares isentos de células que permitem a investigação do comportamento de ligação de proteínas receptoras situadas na membrana celular frente a ligandos naturais ou sintéticos. Nestes ensaios, cada receptor liga-se com uma molécula de suporte adequada, de preferência a cadeia pesada de uma imunoglobulina, e fixa-se por meio do suporte a uma fase sólida adequada com conservação das suas propriedades biológicas.

A determinação do comportamento de ligação de proteínas receptoras situadas na membrana celular frente a ligandos naturais ou sintéticos é para muitas questões em biolo

J.M. .
.
.

logia e em medicina de grande importância. Para investigar este comportamento normalmente prepara-se um ligante marcado com isótopos radioactivos e determina-se a sua ligação específica por métodos apropriados, como por exemplo centrifugação de gradientes, diálise de gradiente ou filtração. As moléculas dos receptores podem neste caso permanecer ligadas às células e neste caso o ensaio é efectuado com células inteiras, mas também podem estar situadas em fracções celulares, como vesículas da membrana, ou ser extraídas a partir da membrana celular com detergentes adequados e ser estabilizadas em micelas de detergente. Os ensaios de ligação de receptores conhecidos são realizados com crescente dificuldade à medida que se consideram moléculas cada vez mais numerosas de receptores de membrana celular. Muitos receptores, especialmente os de maior interesse em medicina, são normalmente expressos apenas em escala reduzida (na ordem de grandeza de alguns centos até alguns milhares de moléculas por célula) sobre a superfície celular. É o que acontece com, por exemplo, os receptores para o factor de estimulação de colónias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), muitas interleuquinas, a eritropoietina, o factor de necrose de tumores (TNF), etc..

O objectivo preferido de acordo com a presente invenção era o desenvolvimento de um ensaio de ligação apropriado para os receptores referidos. Um ensaio de ligação específico, sensível e de fácil realização possibilitaria por exemplo ensaiar numerosos compostos para investigação das suas propriedades de ligação, identificando deste modo candidatos a agonistas e antagonistas ("screening" de receptores). Para além disso, com ensaios deste tipo seria também possível em consequência investigar anticorpos dirigidos contra receptores ou ligandos, para verificar se estes eram dirigidos contra epítomos que desempenhassem uma função na ligação. De acordo com a presente invenção procurou-se atingir o objectivo de desenvolver um sistema de ensaio que preenchesse as condições referidas. Nas publicações de Patentes Europeias EP-A 0325 262 e EP-A 0314 317 e no pedido de Patente Alemã (DE) P 4020 607



descrevem-se ou reivindicam-se proteínas de fusão constituídas a partir de diferentes fracções dos domínios extracelulares de proteínas de membrana humanas ou de proteínas solúveis (parceiro de fusão) e a fracção constante (Fc) da cadeia pesada de uma Ig. Nestes casos a sequência de codificação do parceiro de fusão é fundida ao nível do ADN com um ADN que codifica para a fracção Fc de tal modo que o parceiro de fusão de preferência a fracção aminoterminal da proteína de fusão. O ADN recombinante é então expresso num sistema celular apropriado. Os parceiros de fusão para a fracção Fc são por um lado proteínas que pertencem à família das imunoglobulinas como o antígeno das células T CD4 (EP-A 0325 262 e 0314 317) e por outro lado também proteínas não estruturais como a tromboplastina ou o receptor para a interleuquina 4 (IL-4) (DE P 4020607.6). As referidas proteínas de fusão são de preferência expressas em células animais. O parceiro de fusão aminoterminal conserva em geral a sua actividade biológica; se tem origem por exemplo numa proteína receptora situada normalmente na membrana, liga-se a ligandos com uma afinidade que iguala a do receptor ligado à membrana. É também caracterizada ao nível do ADNs uma proteína receptora cuja propriedade principal consiste na possibilidade de produzir grandes quantidades das moléculas dotadas de actividade biológica no sistema de expressão recombinante. Estas podem em seguida, conforme descrito mais adiante, ser utilizadas num ensaio de ligação. As proteínas de fusão descritas são segregadas em células animais e podem ser purificadas facilmente a partir do sobrenadante da cultura por meio de cromatografia de afinidade, uma vez que se ligam através da sua fracção Fc à proteína A, a qual pode por sua vez ser acolada por exemplo a Sepharose. A síntese das proteínas de fusão pode também ter lugar em sistemas de expressão procarióticos (E. Coli, Pseudomonas, Bacillus, etc.) ou em leveduras (por exemplo Saccharomyces cerevisiae) usando vectores de expressão conhecidos apropriados. Para além da fracção Fc descrita preferida para a presente invenção (como suporte) podem acoplar-se de acordo com a presente

invenção também parceiros de fusão de qualquer outra proteína de suporte (por exemplo albumina, proteína A, proteína-B, transferase de glutatíão S, nuclease de Staphylococcus aureus).

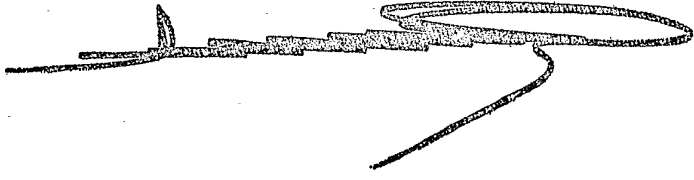
Para a realização do ensaio de ligação de receptores de acordo com a presente invenção usa-se em primeiro lugar um anti-soro (ou anticorpo monoclonal) dirigido contra a fracção de suporte ou um outro agente apropriado para o revestimento de uma fase sólida, por exemplo uma placa de análise por ELISA. Uma vez que se considera preferida para suporte a fracção Fc de um anticorpo e especialmente preferida a fracção de Fc de uma IgG1 humana, usa-se de preferência um soro de coelho dirigido contra o domínio CH₂ de uma IgG1 humana. Em seguida ligam-se sobre a fase sólida pré-revestida as proteínas de fusão através da sua fracção de suporte.

Deste modo, os locais de ligação para os ligandos conservam-se acessíveis localizados sobre a fracção do receptor. A fim de poder detectar então os ligandos ligados, estes devem estar marcados. Esta marcação pode ser conseguida por exemplo por introdução de um nuclídeo radioactivo (por exemplo por introdução de um nuclídeo Siekierka, J.J. e DeGudicibus, S., Anal. Biochem. Vol. 172 (1988), 514-517), de preferência no entanto por biotinilação dos ligandos (King e Catino, Anal. Biochem. Vol. 188 (1990), 97-100). A detecção é por sua vez efectuada por meio de um conjugado de estreptavidina-enzima, de preferência por estreptavidina-peroxidase. A realização do ensaio da presente invenção é descrita resumidamente na Figura 1.

Os ensaios de acordo com a presente invenção possuem amplas possibilidades de utilização, de que se apresentam seguidamente as preferidas e que fazem parte igualmente da presente invenção:

- Utilização em "screening" de receptores:

a) Receptor na fase sólida: Busca entre um grande número de substâncias para identifica



ção de agonistas e antagonistas do ligando.

b) Ligando na fase sólida : Busca entre um grande número de substâncias para identificação de agonistas e antagonistas do receptor.

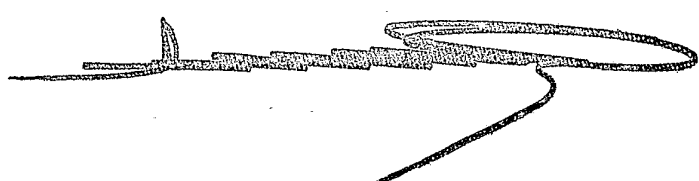
- Utilização em "screening" de anticorpos:
Identificação de anticorpos que influenciam o metabolismo de ligandos e receptores.
- Utilização para a análise quantitativa da actividade de ligação de formas de receptores solúveis.
- Utilização para a análise quantitativa da actividade biológica de ligandos específicos.
- Análise funcional de ligandos modificados ("muteinas") ou de fracções (por exemplo oligopeptídeos) destes.
- Identificação de substâncias que influenciam o metabolismo de organismos patogénicos (por exemplo vírus ou bactérias) com os seus receptores celulares.
- Identificação de substâncias que influenciam o metabolismo de moléculas de adesão celular.

Os exemplos que se seguem destinam-se mais completamente a elucidar a presente invenção, que se encontra, por outro lado, definida por meio das reivindicações.

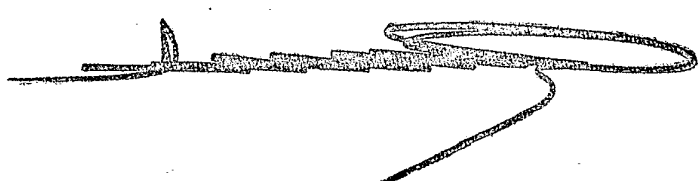
Exemplo 1

Ensaio de ligação de IL-4 isento de células

A proteína IL-4RFc é conhecida da Patente DE P 4020 607.6. Esta proteína é constituída pela fracção extracelular do receptor humano para a IL-4 fundida à fracção Fc da cadeia pesada de uma molécula de IgG1 humana. Revestiram-se de um dia para o outro placas de análise por ELISA (Nunc, tipo B) a 4⁰C com 100 µl de um soro de coelho contra um



domínio CH2 de IgG humana purificado por afinidade (Dakopatts). A concentração era de 10 µg/ml em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 6,1 mM, KH₂PO₄ 3,9 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,1 mM, de pH 7,0). Após cinco lavagens com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 incubou-se a placa de análise com 275 µl de PBS contendo 5 % de suco gástrico seco durante 60 min. à temperatura ambiente e em seguida lavou-se como anteriormente. Em seguida efectuou-se em primeiro lugar uma "titulação de tabuleiro de xadrez" a fim de determinar uma combinação adequada das concentrações do receptor e do ligando para a realização do ensaio. Para este fim, incubou-se em primeiro lugar durante 60 min. à temperatura ambiente a placa de análise com diferentes concentrações de proteína IL-4R_{Fc} purificada (100 µl) em meio de Eagle (modificado segundo Dulbecco) contendo 10 % de soro fetal de vitela (MEMD/SFV) e em seguida lavou-se como anteriormente. Biotinilou-se a IL-4 por meio de N-hidroxissuccinimida-biotina (Sigma) (Niendorf, A. et al., J. Histochem. Cytochem. Vol. 34 (1986), 357-361) e ligou-se à placa de análise pré-incubada com IL-4R_{Fc} em diferentes concentrações em MEMD/sfv (100 µl) usualmente durante 60 min. à temperatura ambiente. Após lavagem como anteriormente incubou-se durante 30 min. à temperatura ambiente com 100 µl de estreptavidina-peroxidase (Amersham; 1:250 em MEMD/SFV) e em seguida lavou-se como anteriormente. Efectuou-se a detecção da peroxidase ligada por desenvolvimento de coloração em 100 µl de solução de substrato de tetrametilbenzidina (Behringwerke). Após 30 min. de incubação à temperatura ambiente, determinou-se a extinção a 450 nm. Os resultados da experiência são apresentados na Figura 2. Obtiveram-se numerosas curvas típicas de ligação em função das quantidades utilizadas de receptor e de ligando. O sinal que reflete os ligandos ligados atinge um patamar que é tanto mais elevado quanto maior quantidade de receptor se utilizou para o revestimento da placa de análise. Para continuação da experiência com o ensaio competitivo apresentado esquematicamente na Figura 1 utilizou-se uma combinação de 300 ng/ml de IL-4R_{Fc} para o revestimento e 300 ng/ml de IL-4-biotina para a ligação.

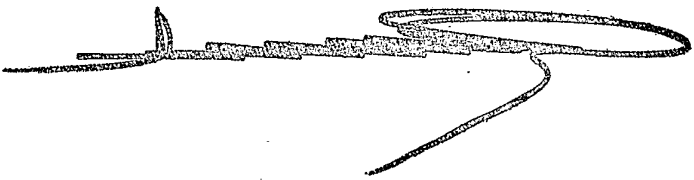


Para o cálculo da concentração da IL-4-biotina como também dos ligantes apresentados nos exemplos 3 e 5 admitiu-se que todo o ligando utilizado para a biotinilação tinha sido realmente recuperado. A combinação usada deu um sinal (cerca de 2000 mU) que (i) pode ser medido com nitidez e (ii) que se situa antes de atingir o patamar para a concentração usada para o receptor. A fim de determinar a especificidade e a sensibilidade do ensaio, experimentou-se até que ponto diferentes ligandos podiam competir com a IL-4-biotina na ligação de IL-4R_h (Fig. 3). Para este fim utilizou-se uma concentração constante (300 ng/ml) de IL-4-biotina na presença de diferentes concentrações de IL-1-alfa, IL-3 e IL-4. A Fig. 3 mostra que apenas a IL-4 pode competir de modo activo, enquanto que a IL-1-alfa e a IL-3 nas concentrações utilizadas não apresentam qualquer actividade de ligação. A concentração de IL-4 à qual se observa uma inibição semi-máxima da ligação de IL-4-biotina (IC₅₀) é de 1 ng/ml.

Exemplo 2

Detecção de receptor de IL-4 solúvel no ensaio de ligação isento de células

Pretendia-se verificar se com o ensaio se podia, para além da detecção de ligandos competitivos, detectar também formas recombinantes solúveis de receptores. Para este fim seleccionou-se a própria proteína IL-4R_h. A realização do ensaio foi idêntica à descrita no Exemplo 1, com a diferença de que depois da incubação das placas de análise com a concentração normal de IL-4R_h (300 ng/ml) se saturaram os locais de ligação de Fc que tinham ficado livres por incubação com soro humano a 10 % em MEMB/SFV (60 min. à temperatura ambiente). Em seguida efectuou-se o ensaio de ligação na presença de diferentes concentrações de IL-4R_h. A Figura 4 mostra que é realmente possível detectar a proteína IL-4R_h neste ensaio competitivo, enquanto que a proteína IL-7R_h, uma proteína de fusão do receptor humano da IL-7, não apresenta



qualquer actividade de ligação. A IC50 para a IL-4RFc situa-se em 250 ng/ml.

Exemplo 3:

Ensaio de ligação de TNF isento de células

Isolou-se rapidamente ADNc da forma de 80 kD do receptor humano do RNF (Smith, C.A. et al., Science, Vol. 248 (1990), 1019-1023). Este ADNc codifica para uma proteína típica de membrana constituída por o domínio extracelular aminoterminal, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático carboxiterminal. Na região de codificação para o receptor do TNF situa-se imediatamente antes do codão para os cinco últimos resíduos de ácidos aminados da região extracelular um local de corte singular para a enzima de restrição PvuII. Cortou-se com PvuII o plasmídeo de expressão HuTNFR-cavnot que contém o ADNc e ligou-se com adaptadores BamHI (5' CGGATCCB 3'). Em seguida digeriu-se ainda com NotI, que cortou imediatamente antes da região 3' não traduzida do receptor TNF. As extremidades reentrantes resultantes forma preenchidas por meio da enzima de Klenow e em seguida efectuou-se uma digestão com BamHI. O fragmento NotI (preenchido)/BamHI (~ 800 pb) codifica para todo o domínio extracelular do receptor do TNF (com excepção dos cinco resíduos de ácidos aminados imediatamente antes da região transmembrana) com um quadro de leitura livre desde o codão de início até à sequência nucleotídica GAT contida na sequência de reconhecimento BamHI, que neste quadro de leitura codifica para um resíduo de asparagina. Este fragmento foi clonado no vector p4EGammaH descrito na patente de DE P 4020607. Para este fim digeriu-se o vector p4EGammaH com HindIII, preencheram-se as extremidades desalinhadas com a enzima de Klenow e em seguida digeriu-se novamente desta vez com BamHI. O plasmídeo de expressão obtido pTHFRFc codifica para a fracção extracelular do receptor de TNF acoplada por meio da região de charneira (hinge) à fracção Fc da cadeia pesada de uma IgG1 humana.



O vector pTNFRFc é representado esquematicamente na Fig. 5 e a sequência de ácidos aminados do TNFRFc codificado por aquele vector é representada na Fig. 6. O vector pTNFRFc foi transfectada em células BHK e obtiveram-se clones estáveis após selecção dupla com metotrexato e G418 (EP-A 0330 977). As taxas típicas de expressão situam-se em cerca de 20 ug/ml de sobrenadante, a partir do qual se isolou TNFRFc por meio de cromatografia sobre proteína A-Sepharose (DE P 4020607.6). Conforme se descreve no Exemplo 1, efectuou-se em primeiro lugar com TNFRFc e TNF-alfa biotinilado uma titulação em tabuleiro de xadrês, a fim de definir as condições adequadas para um ensaio de ligação. A Fig. 7 mostra uma série de curvas de ligação que foram obtidas nesta experiência. Para continuação da investigação seleccionou-se para a ligação a combinação de 200 ng/ml de TNFRFc para o revestimento e 20 ng/ml de TNF-alfa-biotina para a ligação de TNF também é sensível e específico para o TNF-alfa. Na Fig. 8 apresenta-se o resultado de um ensaio competitivo. Apenas o TNF-alfa inibe a ligação de TNF-alfa-biotina com uma IC50 de 5 ng/ml, enquanto que a IL-1-alfa, a IL-3, a IL-4 e o GM-CSF não apresentam qualquer efeito nas concentrações usadas.

Exemplo 4:

Detecção do receptor de TNF solúvel num ensaio de ligação isento de células

Esta experiência foi efectuada de forma análoga à descrita no Exemplo 2 (Fig. 9). O TNFRFc provoca uma inibição com uma IC50 de 35 ng/ml, enquanto que uma proteína de fusão do receptor da IL-1 humano e da fracção Fc de uma IgG1 humana não apresenta qualquer actividade inibitória.

Exemplo 5 :

Ensaio de ligação de GM-CSF isento de células

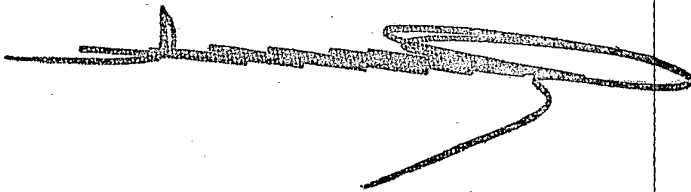
Isolou-se o ADNc para um receptor humano para o GM-CSF (Gearing, D.P. et al., Embo J. Vol. 8 (1989),



3667-3676). O receptor do GM-CSF é uma proteína de membrana típica com um domínio extracelular aminoterminal, uma região transmembrana e um domínio intracelular carboxiterminal. Sintetizaram-se dois oligonucleótidos que podem hibridar com regiões na região não traduzida 5' (oligonucleótido A : 5'AGCAGGTGGAAGGA GAGGAAGCGG 3') ou com a região não traduzida 3' (oligonucleótido B: 5'AAGAATGGGAACAGGCAGGCCTGGGC 3'). Por amplificação do ADN plasmídico de um banco génico de ADNc de placenta humana (Simmons, D. e Seed, B., Nature Vol. 333 (1988), 568-570) com polimerase de Taq-ADN termoestável obteve-se um fragmento de ADN (cerca de 1400 pb), que corresponde na sua dimensão ao ADNc do receptor do GM-CSF. Por análise de restrição confirmou-se a identidade do fragmento de ADN amplificado. Após ligação de adaptadores BstXI (Aruffo, A. e Seed, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 84, 8573-8577) incorporou-se o fragmento no vector de expressão eucariótica CDM8 tratado com BstXI (Seed B., Nature Vol. 329 (1987), 840-842). Na Fig. 10 representa-se esquematicamente o plasmídeo pCDM(GM-CSFR).

A fim de poder preparar uma fusão da Fc com o receptor de GM-CSF, efectuou-se uma nova amplificação de ADN com polimerase de Taq-ADN termostável em pCDM8.

Para este fim sintetizaram-se dois novos oligonucleótidos. O oligonucleótido C (5'GATCGATTAAGCTTAG AGGTGGAAGGAGAGGAAGCGGATGCCG 3') hibrida com a região não traduzida 5' e incorpora antes desta um local de corte HindIII e o oligonucleótido D (5'GCCATTGAATTTGGTTCTGAGGATCCAGATATGC 3') hibrida com o ADNc antes da região de codificação para o domínio transmembrana e incorpora imediatamente antes desta um local de corte BamHI. Obteve-se o fragmento de 1131 previsto e após tratamento com BamHI e HindIII introduziu-se no vector p⁴EGammaH cortado com BamHI/HindIII foi obtido. O plasmídeo de expressão pGM-CSFRFc assim obtido codifica para a proteína de fusão GM-CSFRFc constituída pelo domínio extracelular do receptor do GM-CSF, que se encontra acoplado através da região de charneira (hing) na fracção Fc de uma IgG1 humana. Nas



Figs. 11 e 12 representam-se o vector pGM-CSFRFc e a sequência peptídica da proteína de fusão GM-CSFRFc.

Exprimiui-se o vector pGM-CSFRFc transitoriamente em células COS. Para este fim transfectaram-se as células COS com o auxílio de dextrano-DEAE com o vector pGM-CSFRFc (EP A 0325 262). Utilizaram-se os sobrenadantes para os ensaios de ligação de GM-CSF isento de células.

A Fig. 13 apresenta o resultado da titulação em tabuleiro de xadrês com GM-CSFRFc e GM-CSF biotinilado. Para continuação das investigações seleccionou-se a combinação de 1000 ng/ml de GM-CSFRFc para revestimento e 150 ng/ml de GM-CSF-biotina para a ligação.

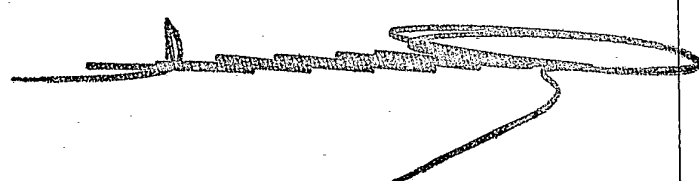
O ensaio de ligação é especificado para o GM-CSF. Nas condições seleccionadas o GM-CSF não marcado inibe a ligação de GM-CSF com uma IC50 de 200 ng/ml, enquanto que o TNF-alfa, o G-CSF, a IL-1-alfa e a IL-4 nas concentrações utilizadas não apresentam qualquer actividade inibitória (Fig. 14).

Exemplo 6:

Caracterização de anticorpos monoclonais contra GM-CSF em ensaios de ligação de receptores isento de células

Preparou-se uma série de diferentes anticorpos monoclonais contra o GM-CSF (Behringwerke). Usaram-se simultaneamente com GM-CSF-biotina no ensaio de ligação nas condições descritas no Exemplo 5 (Fig. 15).

O anticorpo monoclonal 699/779 inibe a ligação e é portanto dirigido muito provavelmente contra um receptor-epítipo de ligação de GM-CSF. Os anticorpos monoclonais 691/A40, 799/3, 3.G11, 932/453 bem como o anticorpo de comparação BMA031 (dirigido contra um receptor humano das células T) não inibem esta ligação. O anticorpo monoclonal 932/453 e em escala mais reduzida também o 691/A40 activam sim uma



aumento do sinal medido.

Legendas das Figuras

Legenda da Fig. 1:

Construção resumida do ensaio de ligação de receptores isento de células:

- A) Ligou-se um receptor/suporte-proteína de fusão (3) a um anti-suporte-anticorpo (4) ou a outro agente apropriado sobre uma fase sólida. No local de ligação do receptor é possível ligar um ligando marcado (2), que por sua vez pode ser determinado através de um sistema de detecção/amplificação (1).
- B) é possível detectar um ligando não marcado do receptor através da competição para o local de ligação do receptor.
- C) é possível detectar um receptor solúvel através da competição para os ligandos marcados.

Legenda da Fig. 2:

Ensaio de ligação de IL-4 isento de células: Relação entre a ligação de IL-4-biotina e a concentração de IL-4R_{Fc} usada para o revestimento da placa de análise de ELISA.

Legenda da Fig. 3:

Ensaio de ligação de IL-4 isento de células:
Relação entre a ligação de IL-4-biotina e a concentração dos ligandos usados para a competição.

Legenda da Fig. 4:

Ensaio de ligação de IL-4 isento de células:
Relação entre a ligação de IL-4-biotina e a concentração de receptor/Fc-proteína de fusão usada para a competição.

Legenda da Fig. 5:

Construção esquemática do plasmídeo de expressão pTNFRFc.

Legenda da Fig. 6:

Sequência de ácidos aminados da proteína de fusão TNFRFc.

Legenda da Fig. 7:

Ensaio de ligação de TNF-alfa isento de células:

Relação entre a ligação de TNF-alfa-biotina e a concentração de TNFRFc usada para o revestimento da placa de análise de ELISA.

Legenda da Fig. 8:

Ensaio de ligação de TNF-alfa isento de células:

Relação entre a ligação de TNF-alfa-biotina e a concentração dos ligandos usados para a competição.

Legenda da Fig. 9:

Ensaio de ligação de TNF-alfa isento de células:

Relação entre a ligação de TNF-alfa-biotina e a concentração de receptor/Fc-proteína de fusão usada para a competição.

Legenda da Fig. 10:

Construção esquemática do plasmídeo de expressão pCDM8GM-CSFR.

Legenda da Fig. 11:

Construção esquemática do plasmídeo de expressão pGM-CSFRFc.

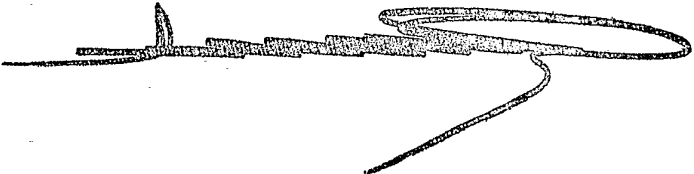
Legenda da Fig. 12:

Sequência de ácidos aminados da proteína de fusão GM-CSFRFc.

Legenda da Fig. 13:

Ensaio de ligação de GM-CSF isento de células:

Relação entre a ligação de GM-CSF-biotina e a concentração de GM-CSFRFc usada para o revestimento da placa de análise de



ELISA.

Legenda da Fig. 14:

Ensaio de ligação de GM-CSF isento de células:

Relação entre a ligação de GM-CSF-biotina e a concentração dos ligandos usados para a competição.

Legenda da Fig. 15:

Ensaio de ligação de GM-CSF isento de células:

Relação entre a ligação de GM-CSF-biotina e a concentração de anticorpo anti-GM-CSF usado para o ensaio de ligação.

= R E I V I N D I C A Ç Õ E S =

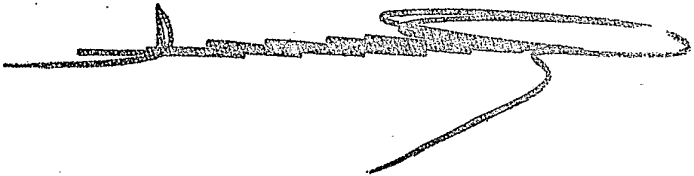
- 1ª -

Processo para a realização de um ensaio de ligação caracterizado por

- (1) acoplar a uma fase sólida apropriada uma proteína de fusão recombinante (interveniente na ligação I) dum proteína de suporte por meio de um agente apropriado, de preferência um anti-soro ou um anticorpo monoclonal, com conservação da actividade de ligação da fracção fundida na proteína de fusão, e
- (2) marcar o outro interveniente de ligação II de modo apropriado para a medição da ligação.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1,



caracterizado por a fracção fundida na proteína de fusão recombinante ser um domínio extracelular de um receptor celular ou uma sua fracção.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o receptor celular ser um receptor de uma citocina.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o receptor celular ser um receptor de um factor de crescimento.

- 5ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o receptor celular ser um receptor de uma hormona.

- 6ª -

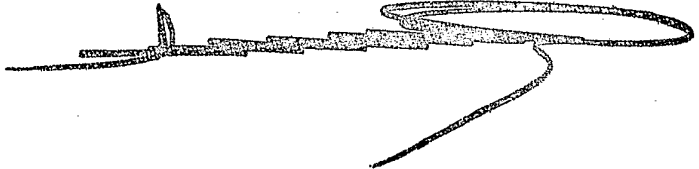
Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o receptor celular ser um receptor de um neurotransmissor.

- 7ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o receptor celular ser um receptor para um organismo patogénico ou uma sua fracção.

- 8ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a fracção fundida na proteína de fusão recombinante ser um domínio extracelular de uma molécula de adesão celular ou uma sua fracção.



- 9ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a fracção fundida na proteína de fusão recombinante ser uma proteína solúvel ou uma sua fracção.

- 10ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína de suporte na proteína de fusão re combinante ser uma molécula de uma imunoglobulina ou uma sua fracção.

- 11ª -

Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por a proteína de suporte na proteína de fusão recombinante ser a fracção constante da cadeia pesada de uma imunoglobulina ou uma sua fracção.

- 12ª -

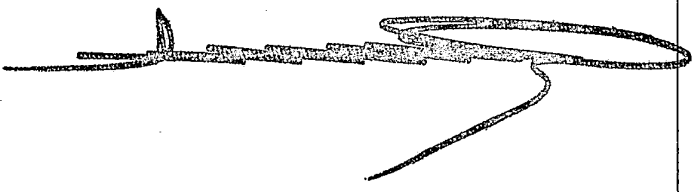
Processo de acordo com qualquer das reivindicações 10 ou 11, caracterizado por a proteína de suporte na proteína de fusão recombinante ser a fracção constante da cadeia pesada da IgG 1 humana ou uma sua fracção.

- 13ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, em que se utiliza uma proteína de suporte numa proteína de fusão recombinante, caracterizado por a referida proteína de suporte não influenciar a actividade biológica da fracção fundida da proteína na fusão e por a proteína de fusão tornar possível uma purificação por meio de cromatografia de afinidade.

- 14ª -

Processo de acordo com qualquer das reivin



dicações 1 a 13, caracterizado por o interveniente de ligação (II) ser um ligando natural ou sintético de uma fracção de uma proteína de fusão de acordo com qualquer das reivindicações 2 a 9.

- 15ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 14, caracterizado por o interveniente de ligação (II) ter uma marcação radioactiva e poder ser detectado por meio dessa marcação.

- 16ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 14, caracterizado por o interveniente de ligação (II) ser acoplado a um ligando de baixa massa molecular (por exemplo biotina) e em consequência poder ser detectado por meio de uma fase de reacção complementar.

- 17ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 14, caracterizado por o interveniente de ligação (II) ser acoplado a uma proteína dotada de actividade enzimática (por exemplo peroxidase, fosfatase alcalina ou luciferase) e poder ser detectado por meio dessa actividade enzimática.

- 18ª -

Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por se utilizar para a fase de reacção complementar estreptavidina acoplada a peroxidase.

- 19ª -

Processo para a identificação de agonistas ou antagonistas naturais ou sintéticos de cada acção recíproca



- caracterizado por se utilizar um ensaio de ligação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 18 para a selecção de receptores.

- 20ª -

Processo para a caracterização de anticorpos dirigidos contra um dos dois intervenientes de ligação caracterizado por se utilizar um ensaio de ligação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 18.

- 21ª -

Processo para a detecção de actividade biológica de receptores celulares solúveis caracterizado por se utilizar um ensaio de ligação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 18.

- 22ª -

Processo para a detecção de actividade biológica de ligandos caracterizado por se utilizar um ensaio de ligação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 18.

- 23ª -

Processo para a análise funcional de ligandos modificados dirigidos ou de fracções destes caracterizado por se utilizar um ensaio de ligação de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 18.

- 24ª -

Processo para a identificação de substâncias relevantes para diagnóstico ou terapia caracterizado por se utilizar um ensaio de ligação de acordo com qualquer das

reivindicações 1 a 18.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 28 de Novembro de 1990, sob o número de série P 40 37 837.3.

Lisboa, 27 de Novembro de 1991
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

= R E S U M O =

"PROCESSO PARA A REALIZAÇÃO DE UM ENSAIO DE LIGAÇÃO A RECEPTORES CELULARES ISENTOS DE CÉLULAS E DE IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS POR MEIO DESSE ENSAIO"

A invenção refere-se a um processo para a realização de um ensaio de ligação que compreende:

- (1) acoplar a uma fase sólida apropriada uma proteína de fusão recombinante (interveniente na ligação I) dum proteína de suporte por meio de um agente apropriado, de preferência um anti-soro ou um anticorpo monoclonal, com conservação da actividade de ligação da fracção fundida na proteína de fusão, e
- (2) marcar o outro interveniente de ligação II de modo apropriado para a medição da ligação.

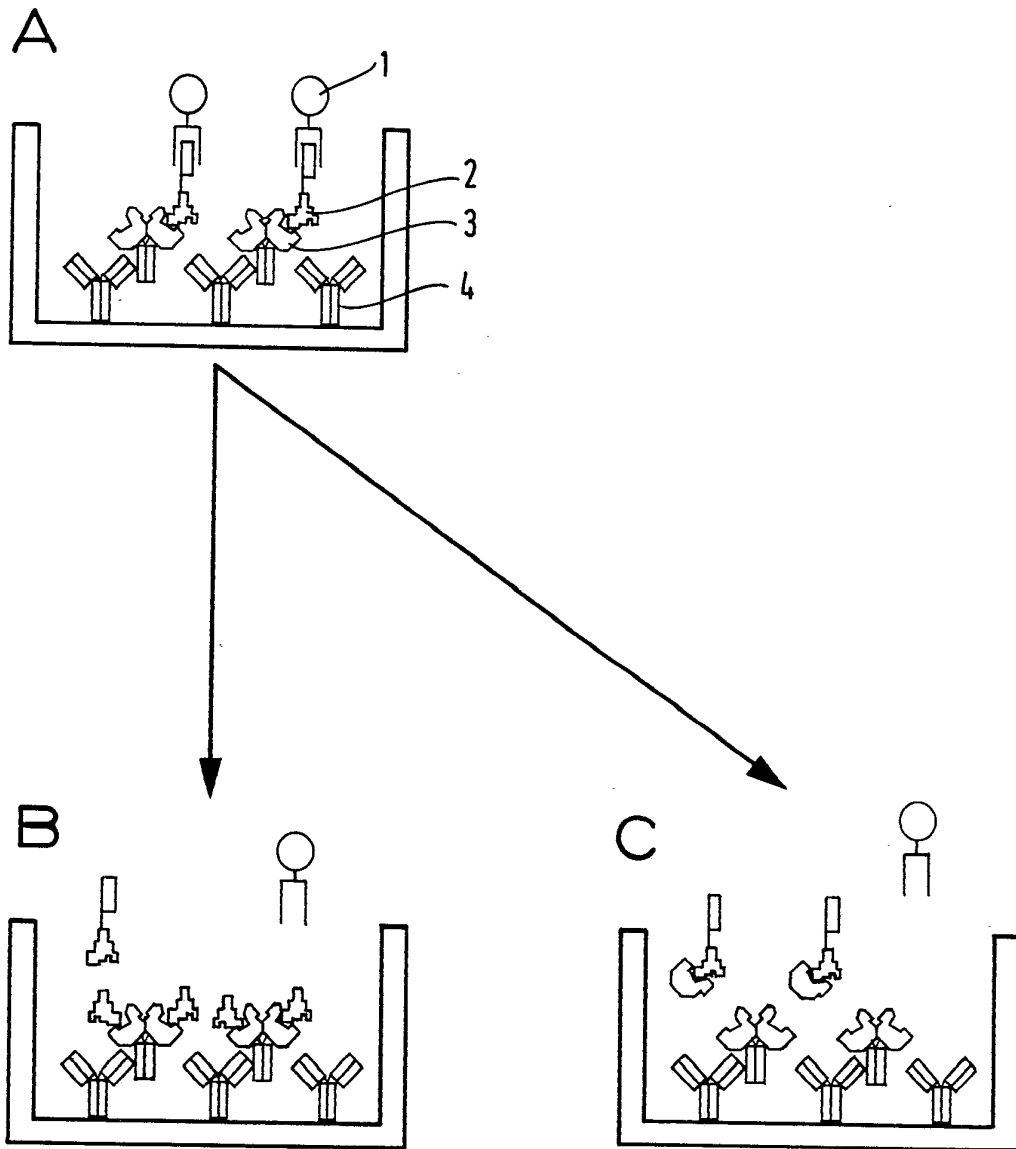
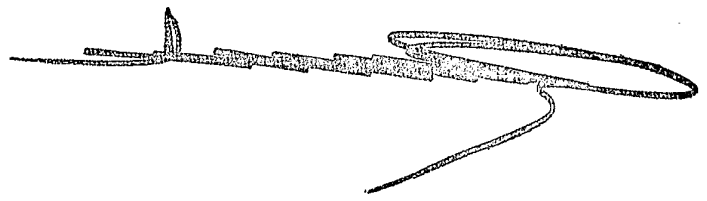


Fig. 1

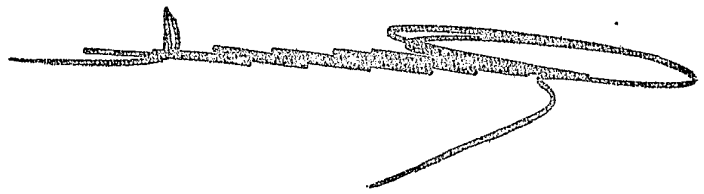
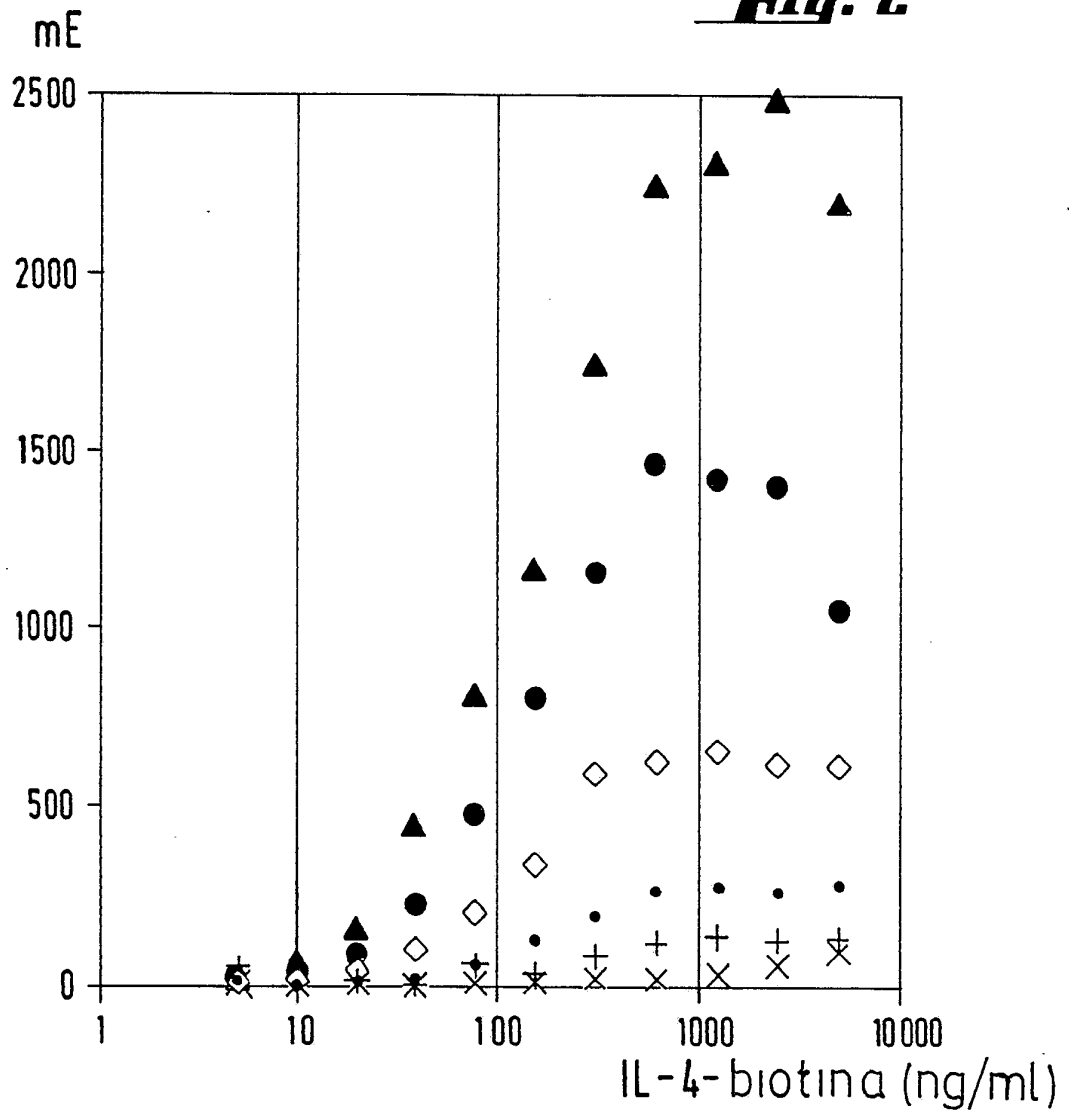


Fig. 2



IL-4RfC na placa

- ▲ 300ng/ml
- 150ng/ml
- ◇ 75ng/ml
- 37,5ng/ml
- + 19ng/ml
- × 9,4ng/ml

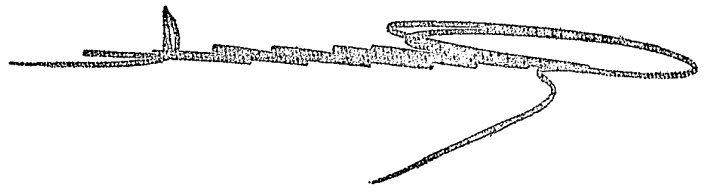
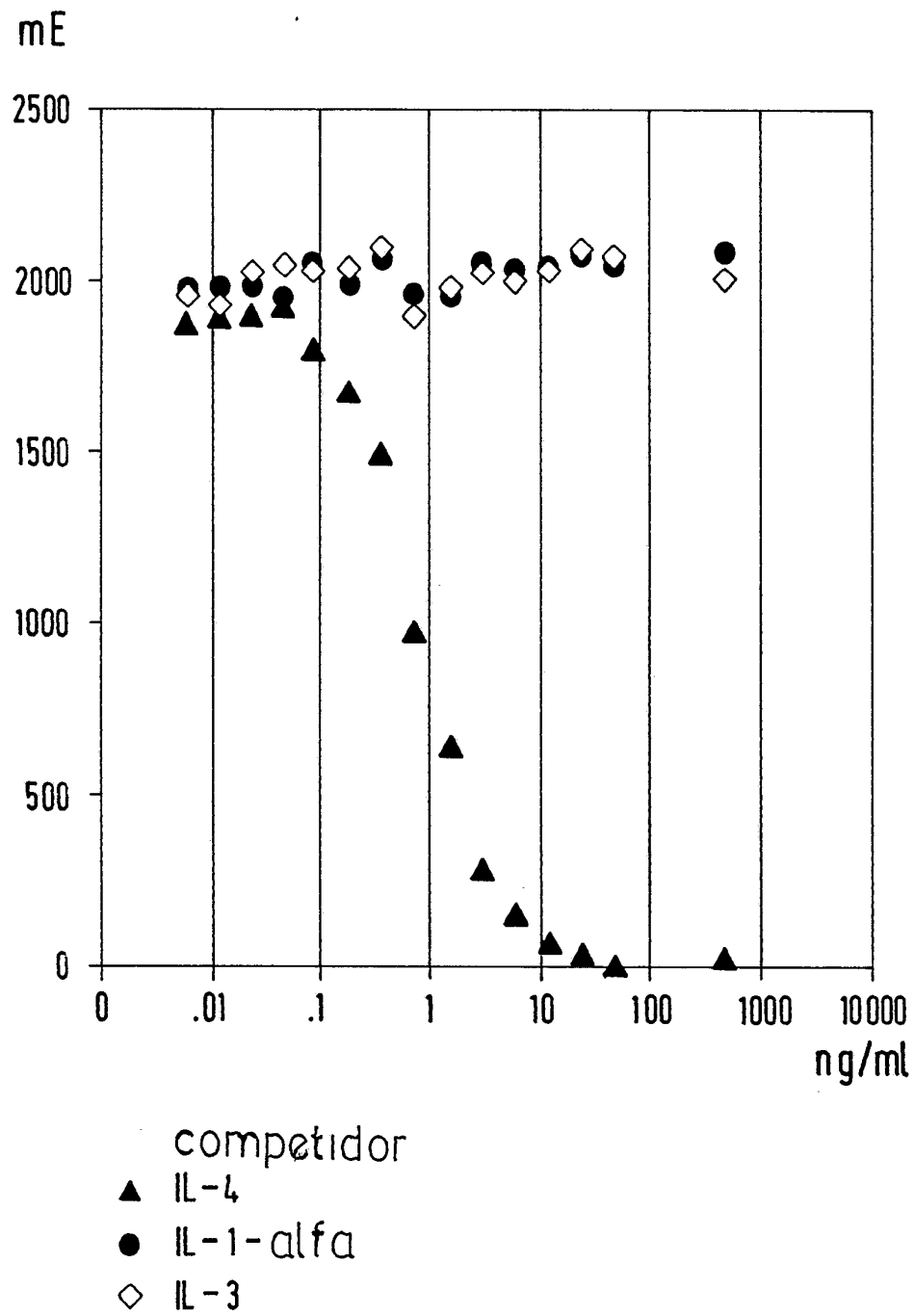


Fig: 3



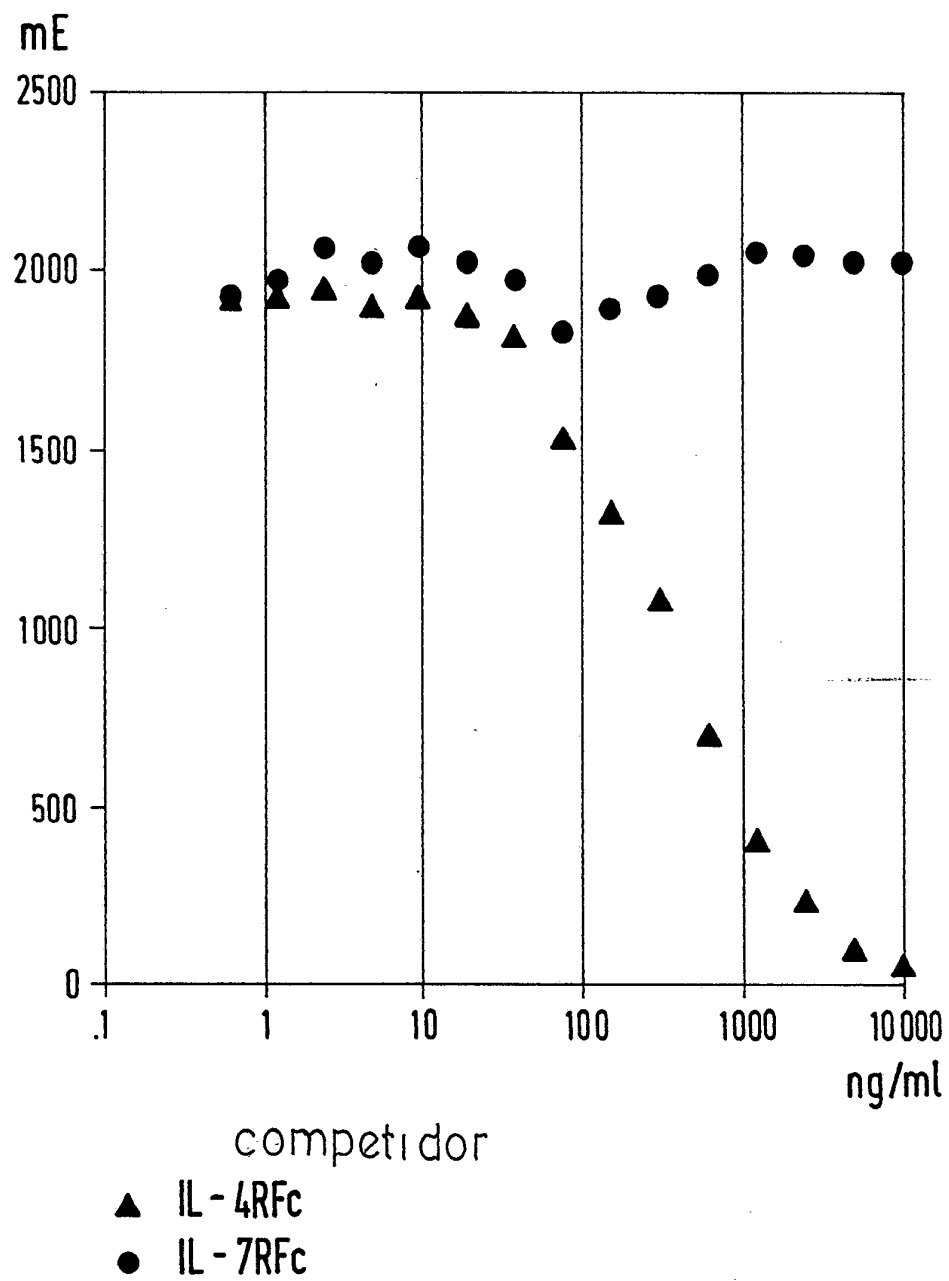
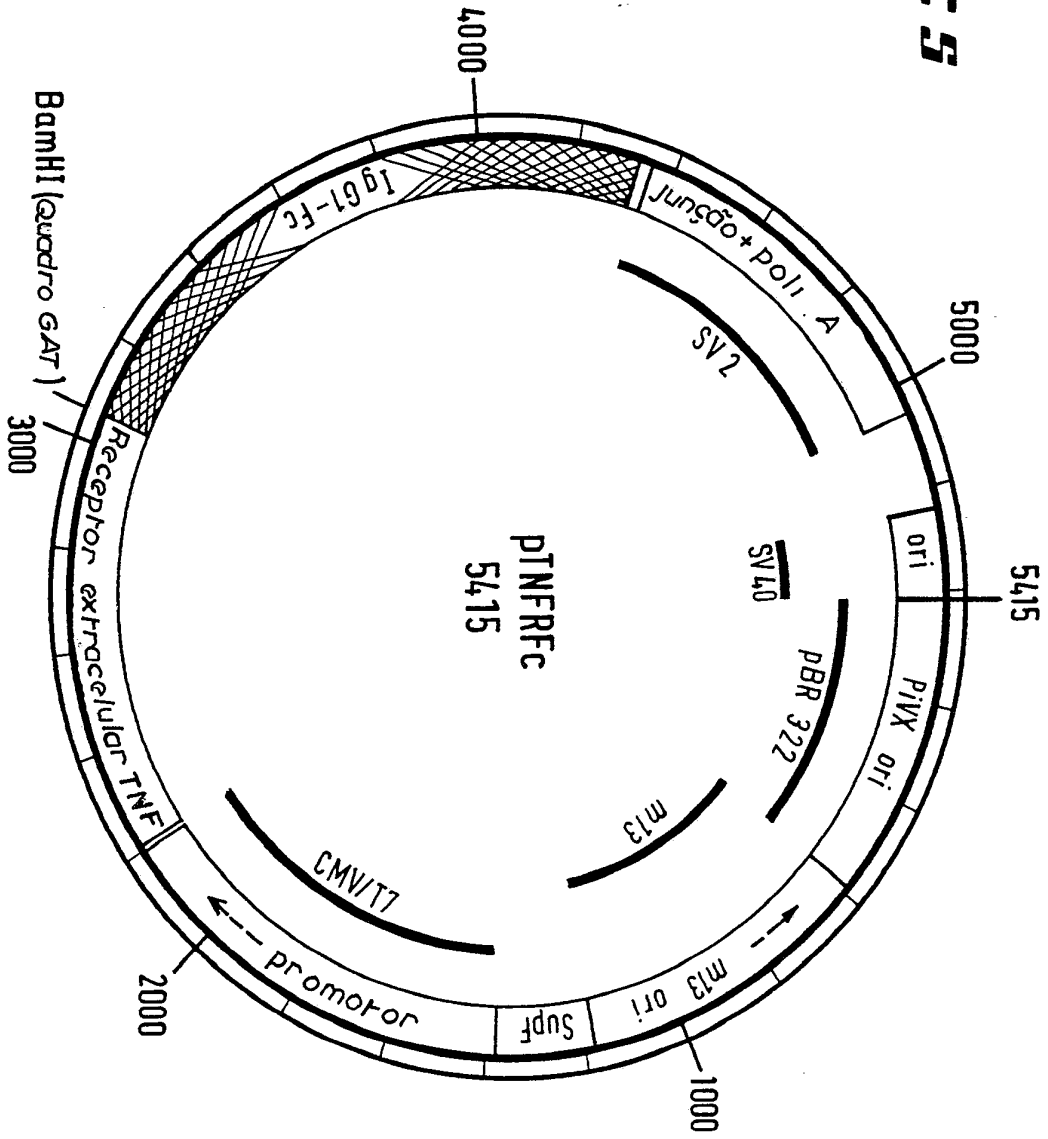
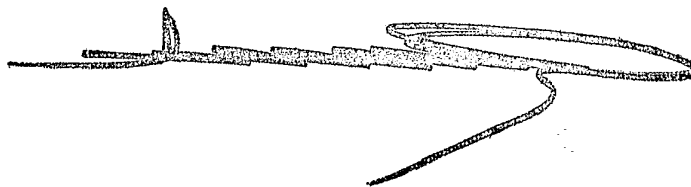


Fig. 4

[Handwritten signature]

Fig. 5





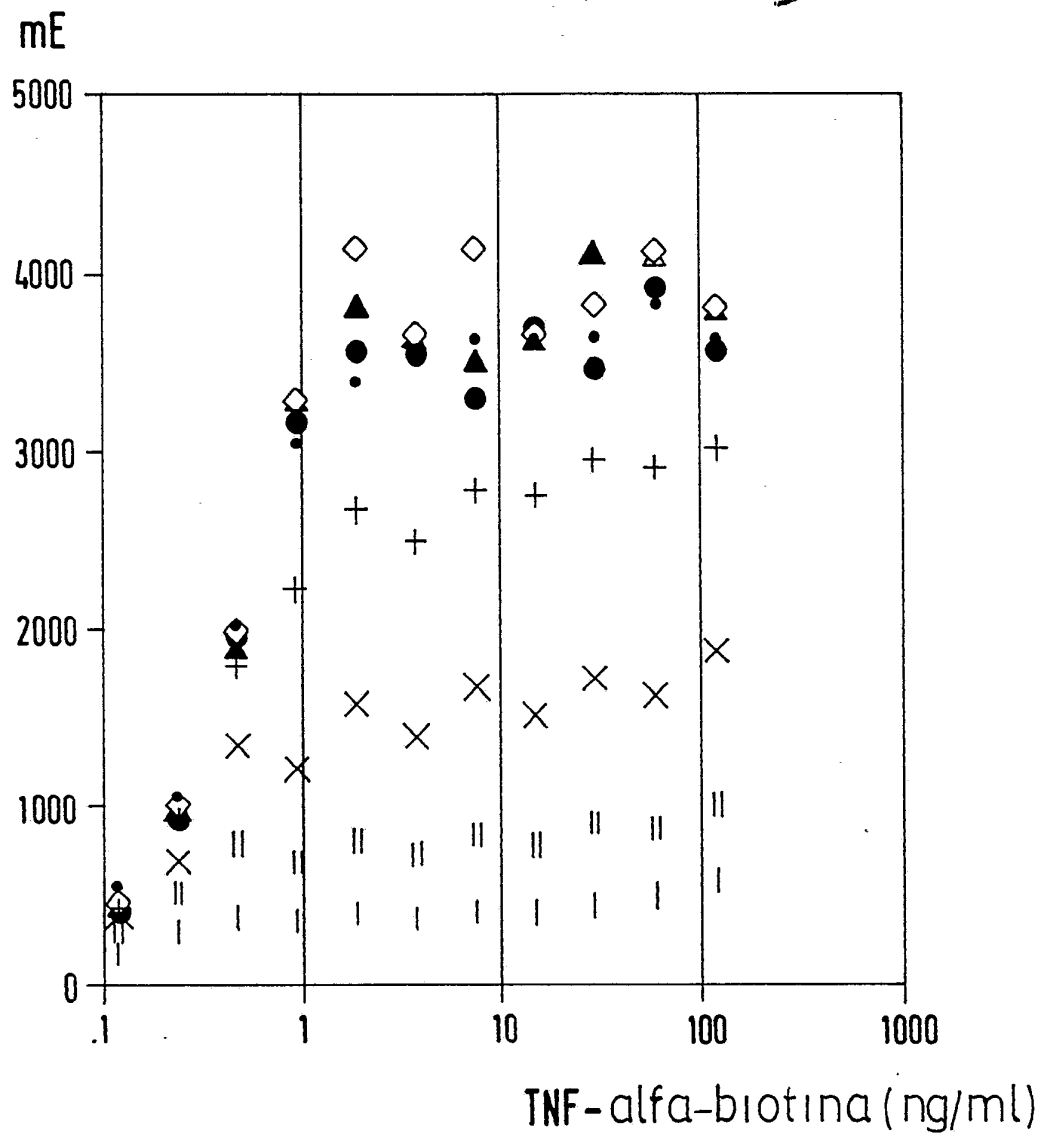
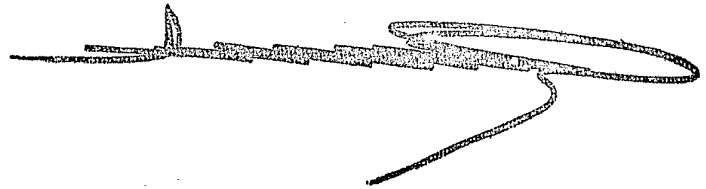
Estrutura primária de TNFRFc

1 MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA
|-----
51 QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC
-----receptor humano de TNF-----
101 SSDQVETQAC TREQNRICITC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
----- (extracelular) -----
151 RPGTETSDVV CKPCAPGTFS NTTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASMDAVC

201 TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTOPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSP

251 AEDPEEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT
-||- adaptador e charneira | |-----
301 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
-----CH2-----
351 QWLNGKEYKC KVSINKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
----- | |-----
401 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT
-----CH3-----
451 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Fig. 6



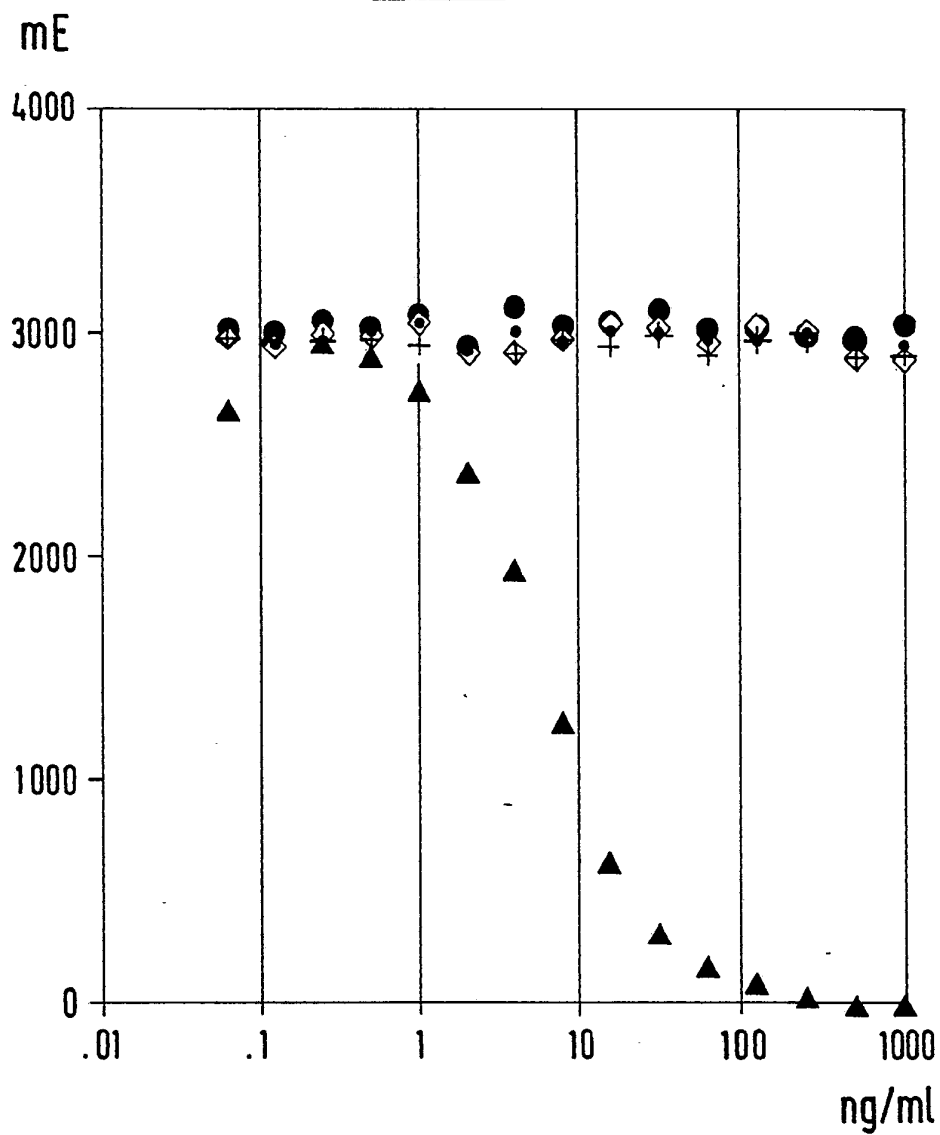
TNFRFc na placa

- ▲ 2000 ng/ml
- 1000 ng/ml
- ◇ 500 ng/ml
- 250 ng/ml
- + 125 ng/ml
- × 62.5 ng/ml
- || 31.25 ng/ml
- | 15.6 ng/ml

Fig. 7

[Handwritten signature]

Fig. 8



competidor

- ▲ TNF-alfa
- IL-4
- ◇ IL-1-alfa
- IL-3
- + GM-CSF

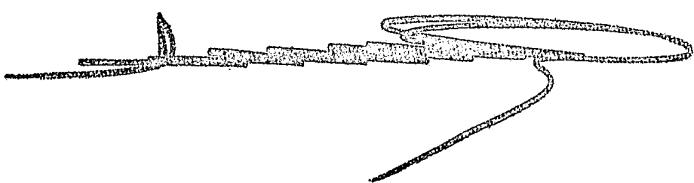


Fig. 9

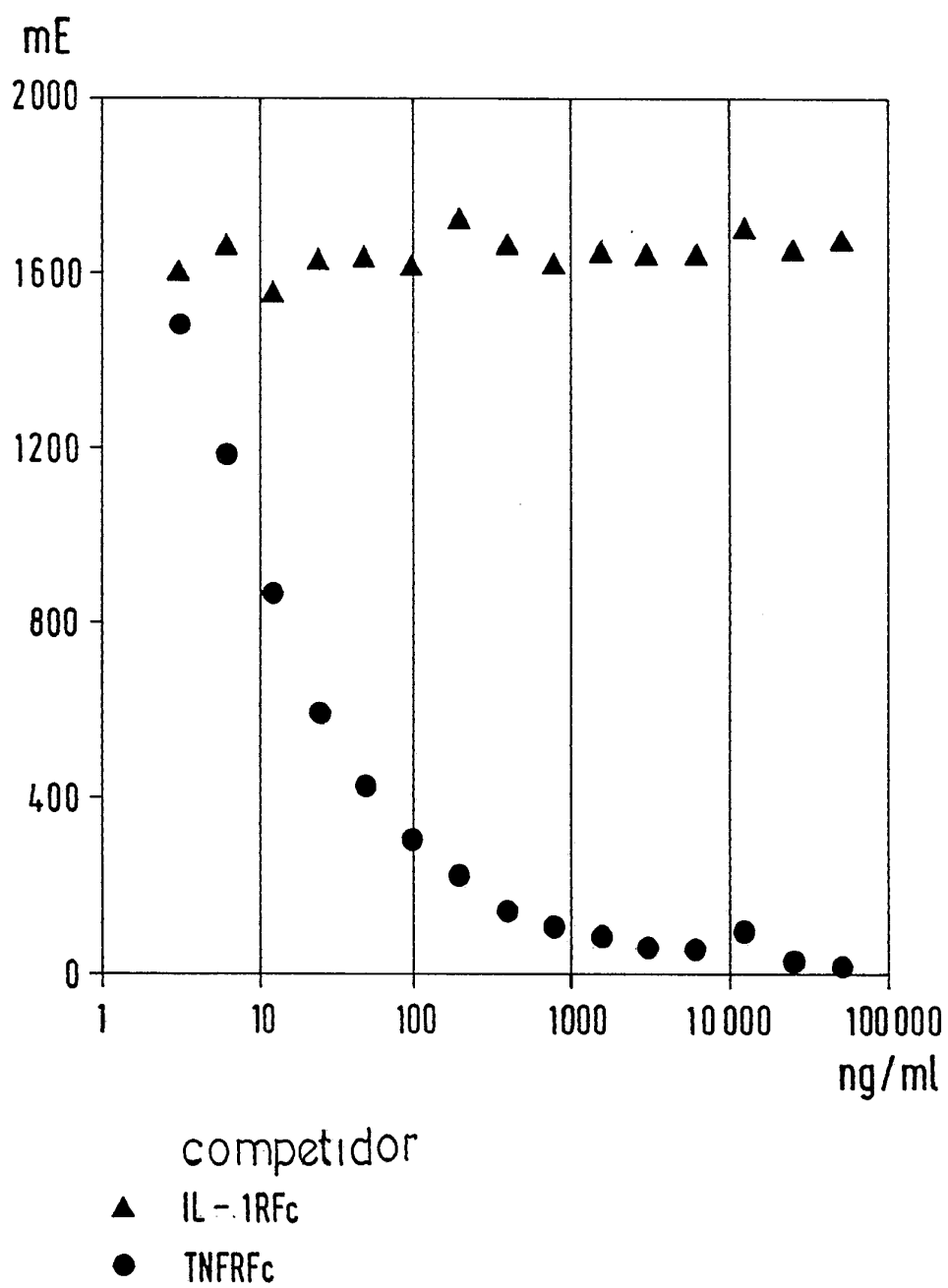
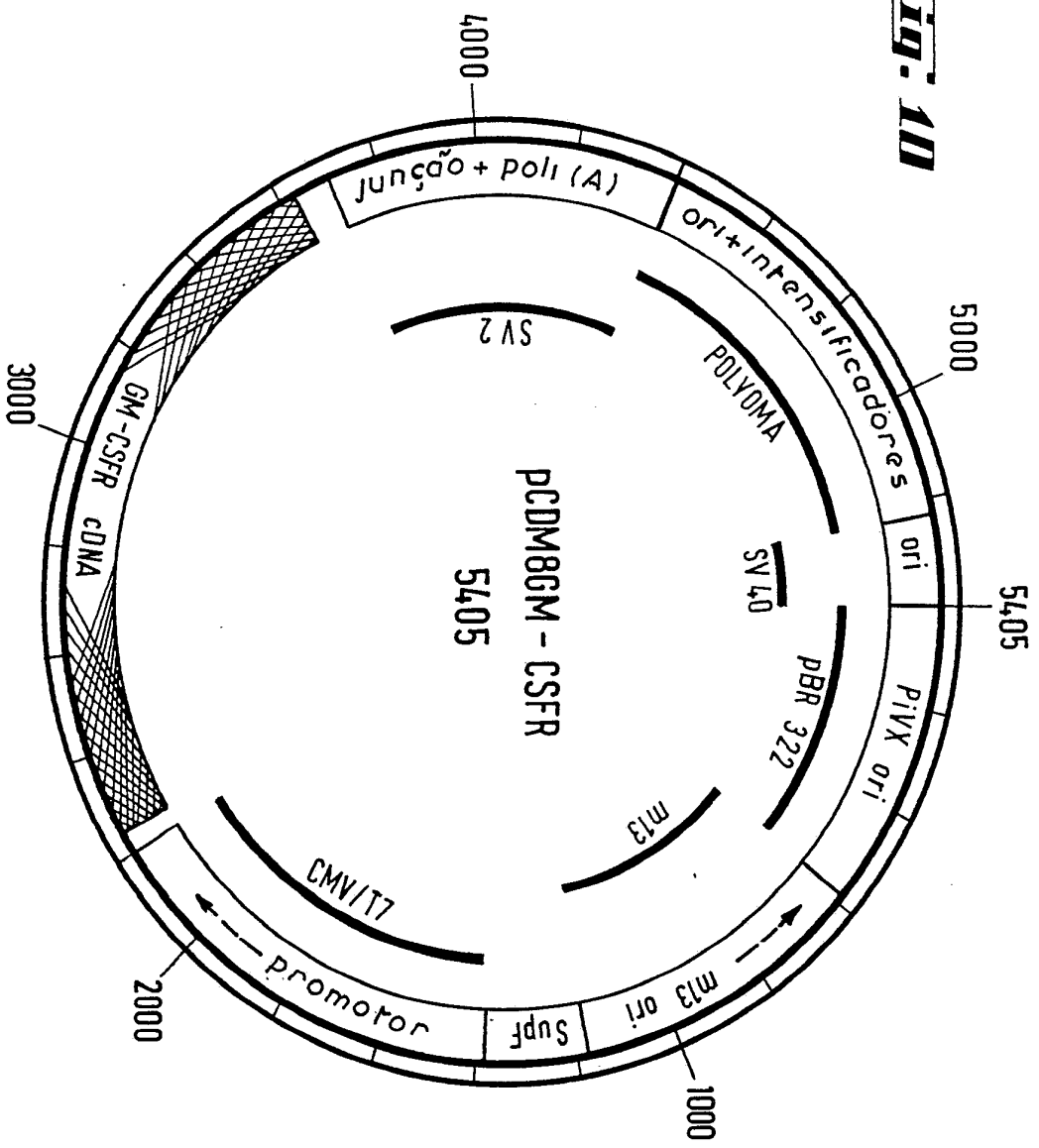


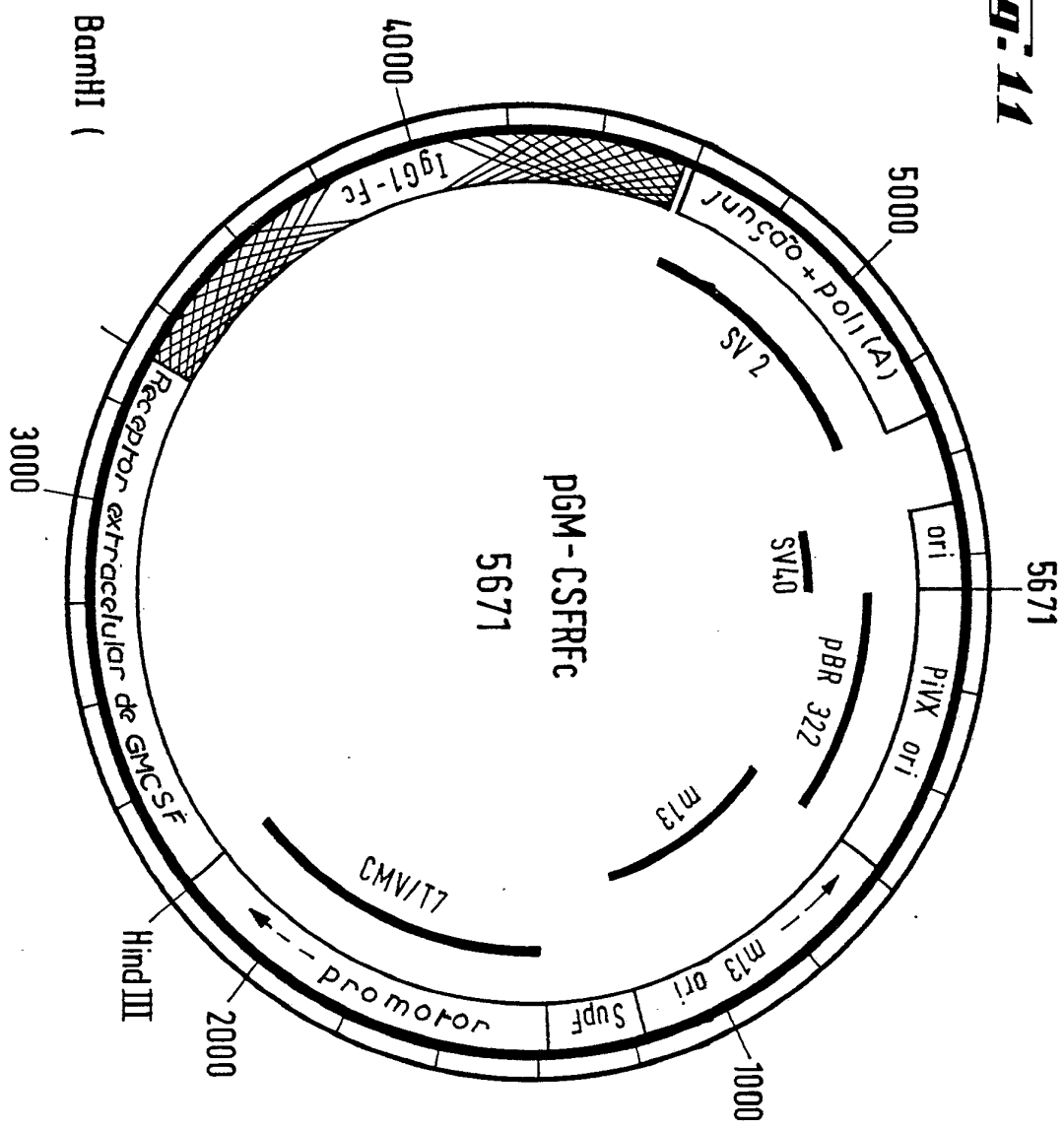
Fig. 10

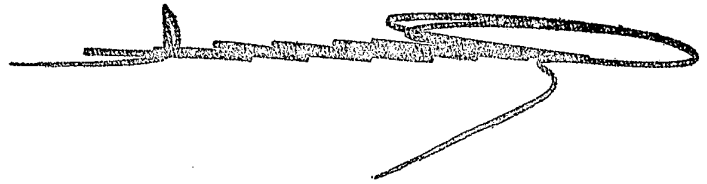


[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Fig. 11





Estrutura primária de GM CSFRFc

1 MLLLVTSLLL CELPHPAFLI IPEKSDLRTV APASSLNVRV DSRTMNLSWD
|-----
51 CQENTTFSKC FLTDKKNRVV EPRLSNNECS CTFREICLHE GVTFEVHVNT
-----receptor humano de GM-CSF-----
101 SQRGFQQKLL YPNSGREGTA AQNFSCFIYN ADLMNCTWAR GPTAPRDVQY
----- (extracelular)-----
151 FLYIRNSKRR REIRCPYIQ DSGTHVGCHL DNLSGLTSRN YFLVNGTSRE

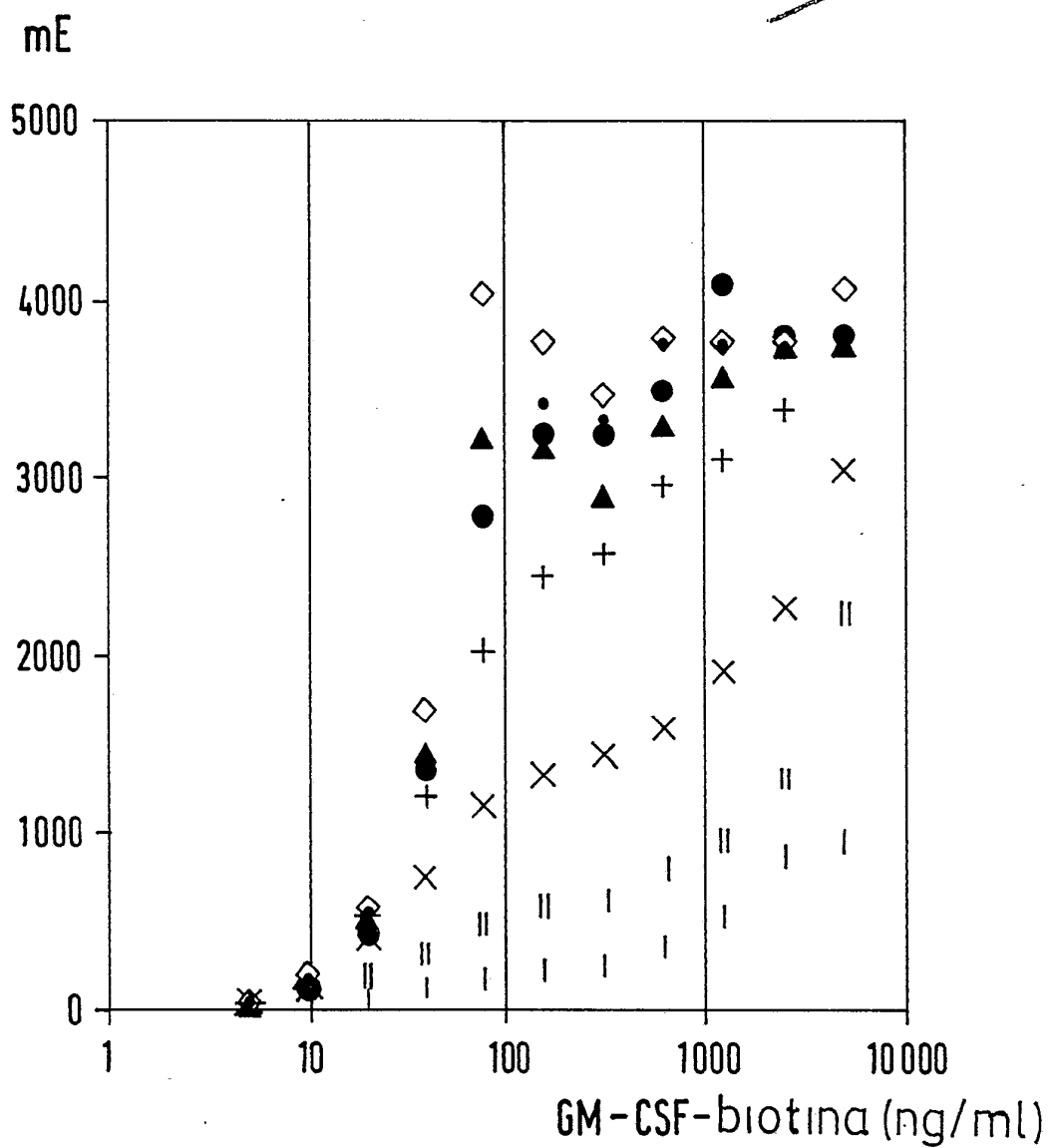
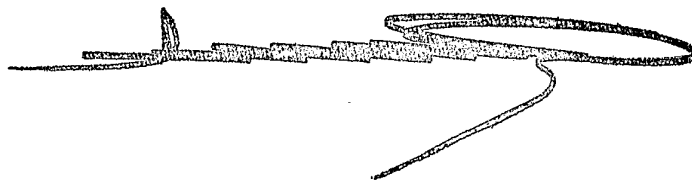
201 IGIQFFDSL L DTKKIERFNP PSNVTVRCNT THCLVRWKQP STYQKLSYLD

251 FQYQLDVHRK NTQPGTENLL INVSGDLENR YNFPSSSEPR KHSV KIRAAD

301 VRILNWSSWS EAIEFGSEDP EEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
-----||-adaptador e charneira||-----
351 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
-----CH2-----
401 QYNSTYRVVS VLTVLHQWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
-----||-----
451 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
-----CH3-----
501 PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP

551 GK

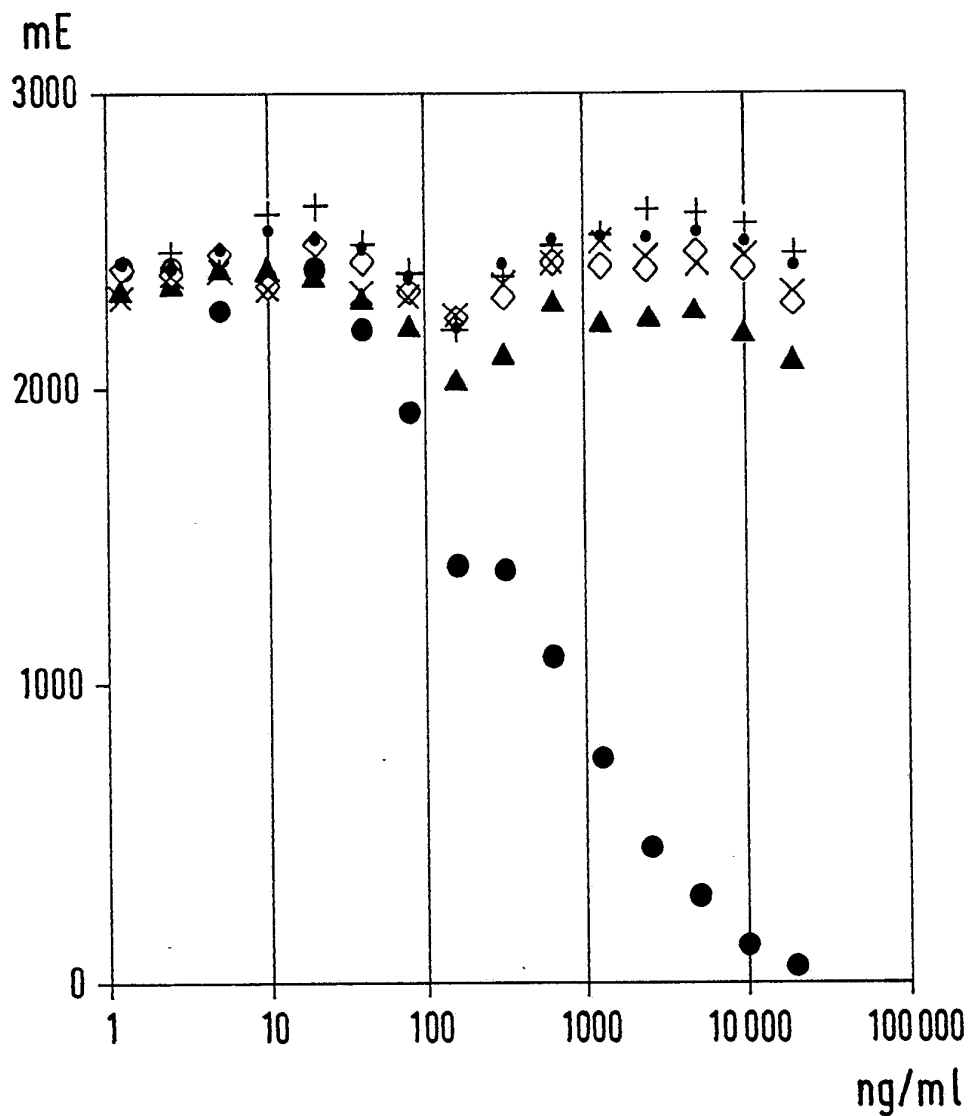
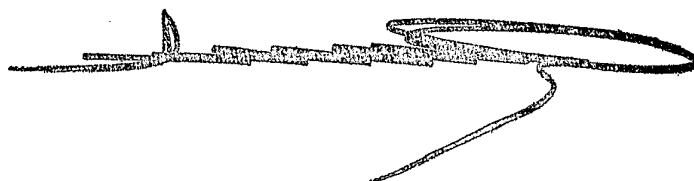
Fig. 12



GM-CSFRFc na placa

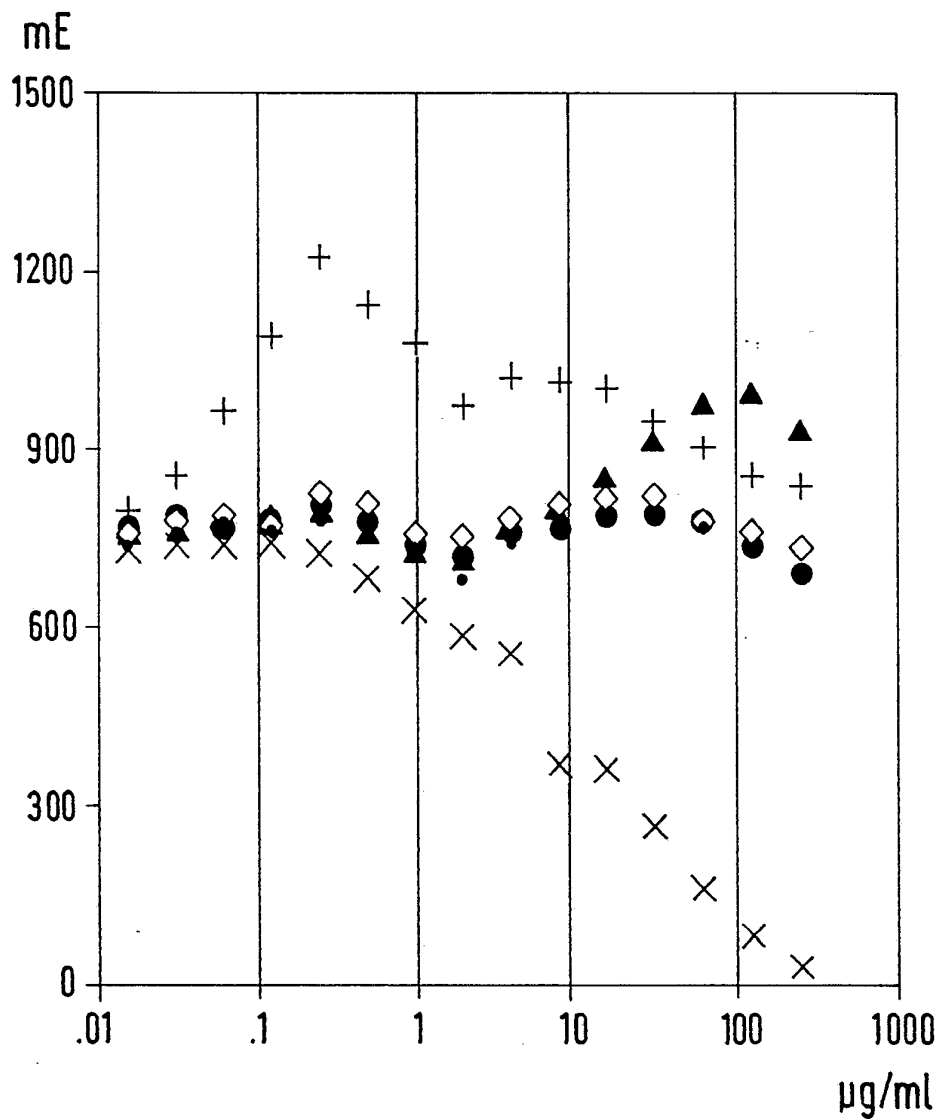
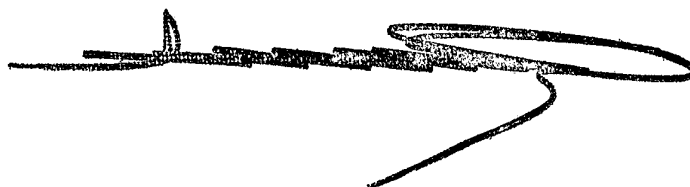
- ▲ 1400 ng/ml
- 700 ng/ml
- ◇ 350 ng/ml
- 175 ng/ml
- + 87.5 ng/ml
- × 43.8 ng/ml
- || 21.9 ng/ml
- | 11 ng/ml

Fig. 13



competidor
 ▲ TNF-alfa
 ● GM-CSF
 ◇ G-CSF
 • IL-3
 + IL-4
 × IL-1-alfa

Fig. 14



anticorpo monoclonal

- ▲ 691/A40
- BMA 031
- ◇ 799/3
- 3.6 11
- + 932/453
- x 699/779

Fig. 15