



"Processo para a determinação de
gonadotrofina coriônica humana"

para que

QUIDEL, pretende obter privilé
gio de invenção em Portugal.

R E S U M O

Processo para a detecção de gonadotrofina coriônica humana (GCH) através de imunoensaios enzimáticos ligando anticorpo biotinilado a um disco de papel ligado a avidina, reagindo o anticorpo no disco com a solução que se suspeita conter GCH, e determinando a quantidade de GCH no disco através de técnicas de detecção de ensaio enzimático.

Fig. 1

+	+	+	+	+
①	②	③	④	⑤
A	B	C	D	E



-2-

DESCRIÇÃO DO INVENTO

Este invento diz respeito de uma maneira geral a técnicas de imunoensaio enzimático (IEE) e em particular à determinação de gonadotrofina coriônica humana (GCH).

Os métodos de imunoensaio enzimático (IEE) foram já descritos, Guesdon J., Ternynck, T., Avrameas, S., "The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques", J. Histochem Cytochem 27:1131-1139, 1979. Guesdon et al testaram os efeitos da marcação de anticorpos, antigénios e enzimas com biotina em processos IEE. A interacção biotina-avidina é bem conhecida e tem sido estudada bastante exaustivamente, e tem sido utilizada na purificação de reagentes ligando a avidina a uma coluna cromatográfica de Sepharose, conjugando a biotina a uma proteína a ser purificada, ligando a proteína biotinilada à coluna, lavando a coluna, e depois eluindo o conjugado proteico purificado proteína-biotina da coluna. Liu, F., Zinnecker, M. Hamaoka, T. e Katz, D.H., J. Biochemistry 18:690, 1979.

A medição de GCH no soro ou urina é de interesse diagnóstico do início da gravidez, detecção de gravidez ectópica, e no controlo de diversos tumores. Walsh, P.R., Wang M., Gittermann, M.L., CLINICAL IMMUNOCHEMISTRY, American Association for Clinical Chemistry, 1978, Natelson, S. et al. Eds., pp. 306-328.

A utilização de papéis de filtro, geralmente sob a forma de pequenos discos, em diversos processos de ensaio é bem conhecida. Contudo, esforços para desenvolver um método de ensaio para GCH utilizando discos de papel de filtro não têm sido bem sucedidos. Após um trabalho considerável, descobriu-se que os métodos baseados na ligação anticorpo GCH a um disco e reagindo o disco com uma solução de que se suspeita conter GCH, p.e., urina, eram de baixa segurança e confiança. Além disso, dispositivos de discos e papel de filtro não podem ser fabricados através de técnicas conhecidas de uma forma satisfatória. O presente invento ultrapassa estas desvantagens e torna possível um imunoensaio enzimático rápido, seguro e simples para GCH na urina, ou outra solução.

Desenvolveu-se um método para a determinação de gonadotrofina coriônica (GCH) que é altamente sensível, extremamente simples de



-3-

efectuar, e pode ser adaptado para equipamento caseiro. O invento compreende o método e um equipamento ou sistema para efectuar esta detecção. O conceito deste invento tem uma aplicação mais larga para determinações de antigénio específicas, e pode também ser adaptado para a determinação de anticorpos utilizando o mesmo conceito, invertendo simplesmente o papel do antigénio e anticorpo.

O método deste invento, exemplificado pela determinação de gonadotrofina coriónica humana (GCH) compreende, na sua forma mais preferida: revestindo toda ou parte de um suporte de fase sólida com avidina, através de ligação química, absorção física ou qualquer outra técnica adequada, ligando anticorpo anti-GCH biotinilado ao suporte através da ligação avidina-biotina, expondo o suporte assim preparado a uma amostra, p.e., uma solução, que se suspeita conter GCH e a anticorpo anti-GCH marcado. O resultado é um suporte de fase sólida tendo ligado a ele GCH e um marcador detectável que está presente em proporção à quantidade substrato GCH ou revelados para o marcador, ou contado se o marcador é radioactivo, como uma medida da concentração de GCH na amostra. Alternativamente, a espécie marcada pode ser removida do suporte e detectada de qualquer forma convencional. A marcação enzimática, p.e., com β -galactosidase, e uma abordagem preferida, mas podem-se utilizar outros enzimas e radiomarcadores.

O invento pode também ser utilizado na técnica para determinar a presença ou ausência, e medindo a quantidade de anticorpos. Neste caso, um antigénio para o anticorpo específico é biotinilado e ligado através da avidina a um suporte, e como antigénio é marcado e a reacção é efectuada da mesma forma, excepto que o anticorpo é a espécie a ser determinada.

A Figura 1 representa um suporte de fase sólido, o qual está revestido total ou parcialmente com avidina, e sobre o qual o anticorpo biotinilado é revestido em áreas seleccionadas, representando alguns padrões exemplares que podem ser formados imprimindo ou aplicando o anticorpo biotinilado em áreas predeterminadas.

Os suportes de fase sólida no ensaio são, neste exemplo, discos de papel de aproximadamente 0,7 cm de diâmetro, Whatman (Trademark) grau 541. Os discos de papel são activados em primeiro lugar



-4-

com CNBr de acordo com o processo descrito por R. Axen et al. (Nature, 214:1302, 1967). Os discos activados são deixados reagir com avidina a 4°C durante a noite. Após a reacção, a solução foi removida e os discos foram bloqueados com 50 mM de etanolamina, pH=8,0 à temperatura ambiente durante 2 horas. Os discos foram então lavados extensivamente com 0,1 M de NaOAC, 0,5 M NaCl tampão, pH=4,0 e 0,1M de NaHCO₃, 0,5M NaCl tampão, pH=8,3, alternativamente, 3 vezes.

A biotinilação de anticorpo anti-GCH de coelho purificado por afinidade foi conseguida por incubação do anticorpo com N-hidroxi-succinimidilo-biotina em borato tamponado salino (BTS) a pH=8,3 à temperatura ambiente durante 2 horas. O excesso de N-hidroxisuccinimidilo-biotina foi então removido por diálise ou filtração gel.

Anticorpo ligado a β -galactosidase foi preparado reagindo anticorpo monoclonal anti-GCH de rato purificado por afinidade com β -galactosidase através de um reagente de ligação cruzada N-Maleimidobenzol-N-Hidroxisuccinimida (MBS) de acordo com o processo publicado por F.T. Liu et al., J. Biochemistry 18:690 (1979).

O imunoensaio é conseguido através das interacções dos componentes de ensaio como abaixo descritas:

Num exemplo Disco-Avidina Biotina-Ab-GCH-Ab- β -Galactosidase (GCH-EIA) típico, o disco reside numa câmara com uma bolinha liofilizada de Anti-GCH- β -Galactosidase, e utilizam-se 250 μ l de amostra de urina para dissolver a bolinha e re-hidratar o disco. O disco-avidina-biotina-Anti-GCH (BAD), a anti-GCH- β -Galactosidase, e a amostra de urina são incubados simultâneamente à temperatura ambiente durante 10 minutos. O disco é então removido e lavado extensivamente com uma solução tampão ou sob um fluxo de água tépida. O disco é finalmente incubado com O-nitrofenilo-galactopiranosido (ONPG), um substrato sintético para β -Galactosidase. A actividade enzimática está relacionada com a quantidade de GCH presente na amostra de urina.

A curva dose-resposta foi demonstrada utilizando o protocolo acima. Para ensaios qualitativos, uma amostra de urina com 400 mIU/ml GCH pode ser facilmente detectada a olho nu. Este nível de GCH corresponde a aproximadamente a 3 dias após o período em



-5-

falta.

Um aspecto do invento é a aplicação do método e protocolo a um equipamento que pode ser utilizado por um indivíduo não treinado na privacidade da sua própria casa para detectar a presença ou ausência de GCH como um indicador de gravidez possível. Como indica o protocolo acima, esta detecção pode ser feita tão precocemente como três dias após faltar o período menstrual. Um período que falta pode indicar gravidez, e pode também indicar uma complicação possível, e nalguns indivíduos uma indicação precoce da gravidez é importante. Há muito que é necessário um equipamento que possa ser utilizado sem a necessidade de um laboratório ou técnicos habilitados. Os equipamentos podem também ser utilizados dentro ou fora da clínica ou laboratório para controlar diversos tumores.

Os equipamentos incluem todos os reagentes necessários para completar uma determinação qualitativa ou semi-quantitativa da GCH na urina. Os constituintes básicos de um equipamento são:

- (1) Suporte de fase sólida, tipicamente discos de papel de filtro, tratados com avidina, sendo a avidina ligada ao papel para fornecer locais que reagem com anticorpo anti-GCH biotinilado;
- (2) anticorpo anti-GCH marcado;
- (3) reagentes de lavagem; e
- (4) reagente revelador. No caso dado como uma concretização preferida, a qual é exemplo e não limitativa, o reagente revelador é 0-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG). A revelação de uma espécie anticorpo-GCH β -galactosido marcado deu uma mudança de cor visível a olho nu. Podem-se aplicar outras combinações de revelador ou marcador produzindo efeito visível ou de cor; contudo, o sistema descrito é presentemente preferido. Tampões, reagentes salinos, etc. podem também ser incluídos mas é preferível incorporar estes nos diversos reagentes acima descritos. Equipamentos de acordo com este invento incluiriam tipicamente um recipiente possuindo uma indicação de volume predeterminada, instruções para uso, e acessórios que possam ser convenientes para o utilizador.

A Figura 1 representa um exemplo de um artigo de fabrico, tal como componente de um equipamento, que incorpora um princípio deste invento. O dispositivo representado na Figura 1 compreende o su-



-6-

porte de fase sólida, uma camada de avidina, e uma camada anticorpo biotinilado (ou antigénio se for para detectar um anticorpo). É claro, estas camadas não precisam de ser perfeitamente congruentes umas sobre as outras e, se o substrato fosse poroso, não seriam camadas fisicamente discretas mas teriam a estrutura descrita. O substrato pode ser poroso ou não-poroso. Por exemplo, papel de filtro e polistireno podem ambos servir muito bem.

Qualquer material de fase sólida que seja inerte nas reacções, e ao qual se possa ligar a avidina, quer por reacção química quer por ligação física, pode ser utilizado. Discos ou folhas de papel de filtro são um material de suporte de fase sólida comum, como são os discos ou placas de polistireno.

O componente seguinte é anticorpo biotinilado (ou antigénio) o qual é revestido sobre toda a superfície, como foi o caso nos exemplos anteriormente descritos. De preferência o anticorpo biotinilado (ou antigénio) é "impresso" somente em áreas seleccionadas da superfície revestida por avidina, em qualquer padrão desejado. O termo "impresso" é utilizado para descrever a técnica melhor conhecida para fabricar o substrato indicador múltiplo deste invento, e a capacidade de "imprimir" o anticorpo em áreas seleccionadas, constitui um facto muito importante deste invento. Tem sido extremamente difícil fornecer qualquer padrão seguro em papel de filtro ou outros substratos porque o reagente migra através ou ao longo do substrato. O presente invento obvia todo este problema. O anticorpo biotinilado liga-se imediatamente à avidina, fixando assim a área no suporte revestido com avidina onde se encontra um antibiótico particular. Esta ligação impede a migração durante ou depois da impressão, e durante a reacção, do anticorpo (ou antigénio). Assim, aquando da revelação do substrato indicador múltiplo, o anticorpo, e qualquer antigénio ao qual está ligado, será encontrado exactamente no local em que foi impresso. A impressão pode ser conseguida da mesma forma que a tinta é impressa em papel, por exemplo, através da aplicação de modelos ou outros meios padronizados revestidos com o anticorpo biotinilado, no suporte revestido de avidina. Isto permite uma produção muito eficiente de elevado volume de suportes indicadores múltiplos,



-7-

os quais podem ter neles diversos anticorpos diferentes. O substrato pode incluir indicações formadas por tinta ou outro material bem como as indicações formadas de anticorpo (ou antigénio). Na Figura 1, por exemplo, as linhas superior e central indicam respectivamente áreas quadradas ou redondas possuindo nelas outra indicação sobre a qual o anticorpo biotinilado é impresso, enquanto a linha inferior indica anticorpo biotinilado impresso sob a forma de letras. Obviamente, pode-se utilizar qualquer símbolo, forma ou indicação alfanumérica.

Estes substratos indicadores múltiplos podem ser utilizados no laboratório clínico ou de investigação, ou podem ser incluídos num equipamento para utilização do consumidor. Diversos anticorpos diferentes (ou antigénios), e anticorpos de actividade diferente podem ser impressos no substrato, permitindo assim, com um tal substrato indicador múltiplo, diversos testes de diagnóstico para serem efectuados ao mesmo tempo, ou dar resultados semi-quantitativos respeitando um antigénio ou anticorpo particular.

Esforços para fornecer um processo e equipamento no qual a GCH era ligada a um substrato fibroso sólido, tal como papel de filtro (o qual se pode adquirir com elevada pureza e tamanhos convencionais) não foram bem sucedidos. Dois problemas afligiam o método ao ponto da abordagem estar a ser considerada impraticável. Em primeiro lugar, a baixa sensibilidade era uma preocupação séria. Em segundo lugar, e ainda mais sério, era a fraca reprodutibilidade. Após esforço considerável e consideração do problema, os inventores determinaram que os problemas estavam de algum modo envolvidos na ligação dos reagentes ao papel de filtro. Não se sabe ao certo qual é fundamentalmente o problema e nenhum problema semelhante foi considerado visto que é relativamente fácil ligar antigénio ao papel de filtro, ou membros porosos equivalentes. Está postulado, somente como uma explicação possível, que não foi ainda provada com dados firmes, que ocorre algum tipo de obstáculo estérico, quando o anticorpo é ligado ao papel, que impede uma reacção completa, quantitativa e reprodutível do papel de filtro tratado com o anticorpo. Em qualquer caso, à parte do fenómeno molecular actual que ocorria, o resultado era de baixa

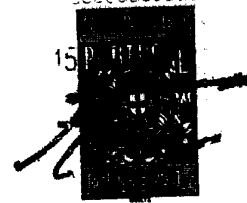


-8-

sensibilidade e uma estreita variação de ensaio. Esta variação de imunoensaio não pareceu vantajosa de continuar. Em adição, as necessidades de ligação individual, manuseamento e armazenamento de antibióticos de fase sólida para diferentes imunoensaios foi considerada proibitivamente demorada e dispendiosa.

Após consideração do problema, e diversas avaliações de abordagens alternativas, e após experimentação, a técnica acima indicada foi desenvolvida pelos inventores, e mostrou ser um método viável, simples, seguro e reprodutível de elevada sensibilidade que encontra aplicação directa na determinação de GCH na urina, e tem uma maior aplicabilidade para outras reacções do tipo anticorpo-antigénio. Como acima indicado, o mesmo processo, invertido para ligar o antigénio ao papel através da ligação biotina-avidina, em vez da ligação de anticorpo acima descrita, pode ser utilizado para detectar a presença de um anticorpo. Assim, os termos antigénio e anticorpo podem ser substancialmente invertidos na especificação e reivindicações para dar o inverso completamente equivalente dos termos específicos utilizados acima e daqui para a frente.

A aplicabilidade geral do presente invento foi já estabelecida. Por exemplo, um substrato coberto de avidina, foi revestido com IgG- anti-DNP - biotinilada. Este substrato coberto de avidina -IgG-AntiDNP-biotinilado foi então reagido com DNP₄₉-BSA e finalmente com Anti-DNP- β -galactosidase. A presença de DNP₄₉-BSA foi determinada na reacção final, através da produção de cor na área revestida do substrato. Os resultados podem ser quantitativamente determinados tendo a absorção da cor a 420 nm da forma convencional. Noutro exemplo, a porção de substrato revestida de avidina foi revestida com alergeno de Ambrósia biotinilado, depois incubado simultâneamente com soro humano contendo IgE-Anti-Alergeno de Ambrósia e com β -galactosidase-Anti-IgE humana-de cabra. A presença de IgE Anti-Ambrósia é determinada através da cor produzida na área revestida como descrito, e pode ser medida fotometricamente da forma acima descrita.



-9-

Entender-se-á que ao dar a concretização preferida e aplicação do invento, o conceito e objectivo do invento são exemplificados através dele sem ser limitado aos reagentes específicos, marcas, reveladores ou aplicações.

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1ª. - Processo para a determinação de gonadotrofina coriônica humana (GCH) o qual compreende reagir uma solução que se suspeita conter GCH com anticorpo anti-GCH marcado e determinando a presença de GCH ligada ao anticorpo, compreendendo:

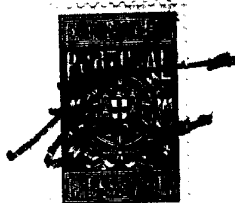
- (a) cobertura de suporte de fase sólida com avidina para fornecer na sua superfície locais de ligação para a biotina;
- (b) biotinilando o anticorpo anti-GCH;
- (c) reagindo o anticorpo anti-GCH biotinilado com o suporte revestido de avidina;
- (d) reagindo anticorpo anti-GCH com a porção indicadora que pode ser detectada;
- (e) reagindo o anticorpo biotinilado da etapa (c) e o anticorpo ligado da etapa (d) com uma solução de teste que se suspeita conter GCH; e
- (f) medindo o indicador de anticorpo ligado unido através de GCH ao suporte para mostrar a presença ou ausência de gonadotrofina coriônica humana na solução de teste.

2ª. - Processo para a determinação de GCH, gonadotrofina coriônica humana, o qual compreende tratar o suporte de fase sólida com avidina para fornecer no dito membro poroso com avidina, locais de ligação capazes de ligar a biotina ao dito membro poroso;

biotinilar o anticorpo anti-GCH;

reagir uma solução de que se suspeite conter GCH com um reagente indicador o qual se ligará à GCH e com o dito anticorpo anti-GCH biotinilado;

reagir o anticorpo anti-GCH biotinilado com o dito suporte para ligar a GCH ao membro poroso através da união avidina-biotina, e medindo através da porção indicadora do reagente indicador



-10-

a presença ou ausência de GCH no dito membro poroso.

3ª. - Processo para detectar a presença ou ausência de um antígeno específico numa solução de teste que se suspeita conter tal antígeno específico, compreendendo as etapas de:

(a) reagir um suporte de fase sólida com avidina para ligar a avidina ao suporte para fornecer locais no dito membro de filtro capazes de se ligarem com a biotina para ligar moléculas biotiniladas ao dito membro de filtro;

(b) biotinilar anticorpo para o antígeno específico para fornecer uma molécula capaz de se ligar aos locais avidina no membro de filtro;

(c) reagir a espécie da etapa (b) com o suporte tratado com avidina da etapa (a) para assim ligar a dita espécie ao dito membro de filtro;

(d) marcar o anticorpo para o antígeno específico com uma porção capaz de ser detectada;

(e) reagir a solução de teste que se suspeita conter o antígeno específico com o suporte tratado resultante da etapa (c) e o reagente da etapa (d) para formar uma espécie que inclui antígeno específico, o anticorpo biotinilado no suporte, e o anticorpo marcado; e

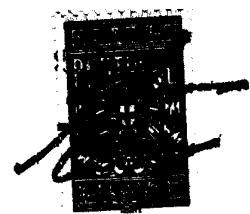
(f) detectar a porção marcada do anticorpo para determinar assim a presença ou ausência do antígeno específico na solução de teste.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo facto do antígeno específico a ser determinado é gonadotrofina coriônica humana.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto da porção capaz de ser detectada ser β -galactosidase.

6ª. - Equipamento para utilização na determinação da presença ou ausência de GCH, gonadotrofina coriônica humana, na urina, compreendendo:

(a) anticorpo anti-GCH biotinilado ligado a um suporte tratado com avidina tendo nele locais de ligação avidina capazes de se ligarem com anticorpo anti-GCH biotinilado;



-11-

- (b) anticorpo anti-GCH marcado; e
- (c) reagente revelador capaz de reagir com o anticorpo anti-GCH marcado para dar uma indicação visual da presença ou ausência de GCH.

7ª. - Equipamento de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo facto do anticorpo anti-GCH marcado conter β -galactosidase como uma etiqueta detectável.

8ª. - Processo de produzir um suporte indicador múltiplo compreendendo as etapas de:

- (a) revestir pelo menos uma porção de um suporte de fase sólida com avidina; e
- (b) revestir somente porções predeterminadas de suporte coberto de avidina da etapa (a) com anticorpo ou antigénio biotinilado, deixando assim porções do substrato sem cobertura, formando assim um padrão predeterminado de áreas de suporte revestido com anticorpo ou antigénio biotinilado.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 8, no qual:

a etapa (a) compreende revestir substancialmente uma superfície de um suporte geralmente plano com avidina, e

a etapa (b) compreende a impressão de um padrão predeterminado de anticorpo ou antigénio biotinilado na dita superfície.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 9 no qual:

a etapa (a) compreende revestir um papel de filtro com avidina.

11ª. - Processo para a obtenção de um artigo de fabrico com um suporte de fase sólida possuindo uma superfície, uma cobertura de avidina em pelo menos porções substanciais na dita superfície, e anticorpo ou antigénio biotinilado impresso só no padrão predeterminado na superfície revestida de avidina.

12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 11, no qual a superfície de suporte é substancialmente toda revestida de avidina, e na qual o padrão de antigénio ou anticorpo biotinilado ocupa substancialmente menos que a superfície total.

-12-

13ª. - Processo de acordo com a reivindicação 11 ou 12, no qual o padrão de antigénio ou anticorpo biotinilado está sob a forma de símbolos, números ou letras legíveis, ou uma sua combinação.

14ª. - Processo para a determinação de espécies antigenicamente activas, utilizando-se as etapas de:

- (a) revestir uma superfície de um suporte de fase sólida com avidina;
- (b) imprimir um antigénio ou anticorpo biotinilado no dito suporte de avidina num padrão predeterminado;
- (c) reagir a superfície revestida com antigénio ou anticorpo biotinilado com uma solução que se suspeita conter a espécie antigenicamente activa e com uma porção marcadora, e
- (d) reagir a porção marcadora com um reagente revelador.

15ª. - Equipamento para utilização na detecção de antigénio, compreendendo:

- (a) um suporte de fase sólida possuindo revestido nele uma camada de avidina, e reagido sobre essa camada de avidina, anticorpo biotinilado para o antigénio a ser detectado, e
- (b) anticorpo para o antigénio a ser detectado marcado com uma porção capaz de ser detectada.

16ª. - Equipamento da reivindicação 15, no qual o anticorpo marcado inclui uma porção enzimática e na qual o equipamento inclui ainda:

- (a) um substrato revelador que revela uma cor quando reagido com o enzima marcador.

Lisboa, 15. NOV. 1984

Pela QUIDEL

- O AGENTE OFICIAL -

A handwritten signature in black ink is written over a rectangular official stamp. The stamp contains the word "PORTUGAL" at the top and some illegible text below it. The signature is a cursive script that extends across the width of the stamp.

Uma folha.

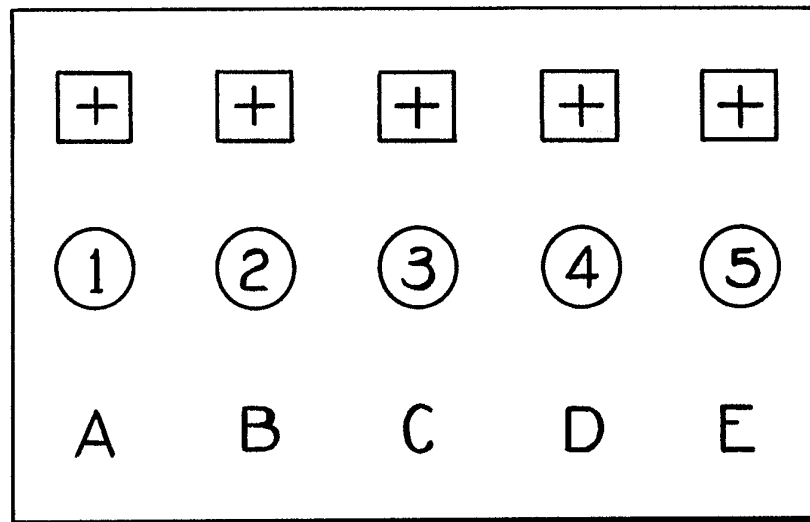


Fig. 1

QUIDEL.