

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.687

REQUERENTE: AMERICAN CYANAMID COMPANY., norte-americana,
industrial, em Wayne, New Jersey - USA

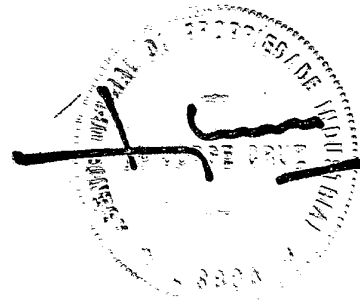
EPÍGRAFE: "METODO PARA POTENCIAR A ACTIVIDADE DE
SOMATOTROPINA PORCINA"

INVENTORES: BOSCO SHANG WANG; IAN C. HART; HONG-MING
SHIEH

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

Estados Unidos da América do Norte, em 27 de Outubro de
1989, sob o No.07/427,669

95.687



AMERICAN CYANAMID COMPANY

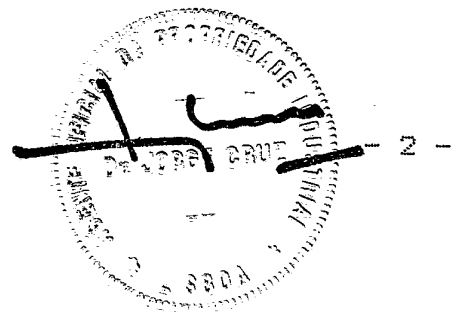
"MÉTODO PARA POTENCIAR A ACTIVIDADE DA SOMATOTROPINA PORCINA"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento é dirigido a um processo para a obtenção de fragmentos peptídicos de somatotropina porcina (pST) os quais são usados para gerar anticorpos anti-pST específicos de epítomos. Quando tais anticorpos são administrados com pST a animais de sangue quente, a actividade estimuladora do crescimento é aumentada.



CAMPO DO INVENTO

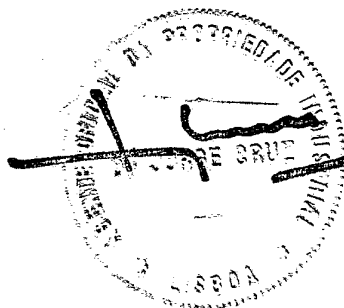
Este invento está relacionado com a identificação de três fragmentos peptídicos da somatotropina porcina (pST) que podem ser usados para gerar anticorpos anti-pST. Quando estes anticorpos são administrados juntamente com pST, o crescimento animal é aumentado relativamente ao conseguido com a administração de pST sózinha.

FUNDAMENTO DO INVENTO

A hormona de crescimento pST é nativa para porcos e é responsável pelo crescimento do animal, incluindo o aumento da velocidade de crescimento e a proporção de carne magra para gordura. As quantidades endógenas de pST são pequenas; assim concentraram-se esforços para a preparação de pST exógeno para usar em larga escala em agricultura.

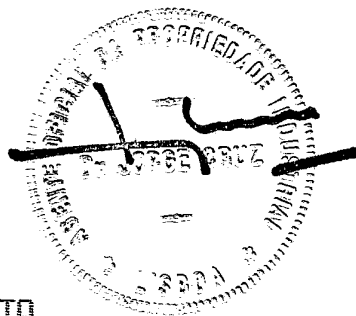
Um aspecto destes esforços foi a determinação da sequência de aminoácidos completa de pST. Encontrou-se que pST é um polipeptídeo de cadeia simples de 191 aminoácidos com duas pontes dissulfureto ligando os resíduos 53-164 e 181-189, respectivamente (Abdel-Meguid, S.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., B4, 6434-6437 (1987)).

Dirigiram-se esforços no sentido da identificação de peptídeos consistindo em pequenas fracções da sequência de aminoácidos da somatotropina de várias espécies tendo como objectivo aumentar a actividade destas hormonas de crescimento. O Pedido de Patente Europeia publicado 137,234 descreve a clivagem de um fragmento de 7 Kd do extremo C da hormona de crescimento humano (hGH). Injectaram-se ratinhos com o fragmento e os



ratinhos produziram anticorpos contra o fragmento. Aqueles anticorpos foram administrados a ratinhos em combinação com hGH.

O Pedido de Patente Europeia publicado 284,406 descreve a preparação de um fragmento correspondendo aos resíduos de aminoácidos 35-53 de pST. O fragmento pST foi administrado a porcos e gerados anticorpos anti-pST. Realizou-se uma experiência semelhante com um fragmento de somatotropina bovina (bST). Neste último caso, os anticorpos anti-bST gerados foram então administrados juntamente com bST intacta e observou-se aumentar a actividade de bST.



SUMARIO DO INVENTO

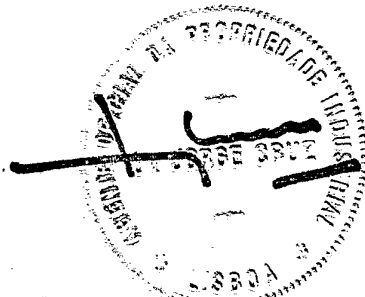
Se bem que trabalhos de outros autores descritos atrás proporcionem informação acerca de certas regiões da somatotropina de outras espécies, incluindo porcina, que aumentam a actividade promotora de crescimento de tais hormonas, estas trabalhos não proporcionam resultados acerca de outros possíveis fragmentos das hormonas que possam ter sítios eotópicos, nem foram apresentados dados comparativos comparando actividade promotora de crescimento de anticorpos contra tais fragmentos.

Assim, constitui um objectivo deste invento identificar fragmentos adicionais de pST que, quando administrados a animais e sangue quente gerem anticorpos contra pST. Tais fragmentos de pST incluem peptídeos tendo sequências de aminoácidos homólogas das seguintes fracções de pST: 98-110, 110-118 e 155-163.

É ainda um objectivo deste invento melhorar o crescimento através do tratamento de animais de sangue com anticorpos gerados por tais fragmentos de pST em combinação com pST. Tais anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais.

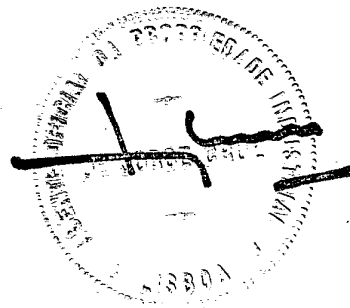
Constitui ainda um outro objectivo deste invento administrar anticorpos gerados por tais fragmentos de pST em animais de sangue quente e medir o crescimento quando aqueles animais são depois tratados com pST. Tal pST pode ter uma sequência de aminoácidos nativa ou modificada, desde que a sua função promotora do crescimento esteja presente.

É ainda um outro objectivo deste invento comparar o aumento de crescimento animal resultante da administração de pST juntamente com anticorpos de diferentes fragmentos de pST. O invento é também dirigido a sequências de aminoácidos que sejam



os equivalentes antigênicos destes fragmentos de PST, assim como
a anticorpos contra elas.

Estes objectivos foram conseguidos na descrição do
invento que se segue.



BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 descreve a sequência de aminoácidos de pST e sete fragmentos peptídicos de pST, incluindo os peptídeos designados 8, 9 e 11 os quais são o tema deste invento.

A Figura 2 descreve a pureza do peptídeo #8 conforme mostrado por cromatografia líquida de alta resolução analítica.

A Figura 3 descreve a purificação da fracção de imunoglobulina do soro por fraccionamento do soro numa coluna de afinidade com Proteína A.

A Figura 3A descreve a pureza da fracção de imunoglobulina conforme mostrado por electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE).

A Figura 4 descreve o efeito no crescimento de ratos, a que foi removida a hipófise, tratados com pST sózinha ou pST em combinação com anticorpos de porco contra peptídeos de pST. Soro normal de porco (NPS) que contém pequenas quantidades de pST endógeno, foi usado como testemunha negativa.

A Figura 5 descreve o efeito no crescimento de ratos aos quais foi retirada a hipófise tratados com pST em combinação com anticorpos de suíno contra peptídeos de pST numa experiência separada da descrita na Figura 4. Usou-se a mesma testemunha negativa usada na Figura 4.

A Figura 6A descreve a dose-resposta da administração do anticorpo de suíno contra o peptídeo #8 de pST (aminoácidos 98-110) mais pST no crescimento de ratos aos quais foi retirada a hipófise.



A Figura 6B descreve a dose-resposta da administração do anticorpo suíno contra o peptídeo #7 de pST (aminoácidos 110-118) mais pST no crescimento de ratos sem hipófise.

A Figura 6 C descreve a dose-resposta da administração do anticorpo de suíno contra o peptídeo pST #11 (aminoácidos 155-163) mais pST no crescimento de ratos sem hipófise.

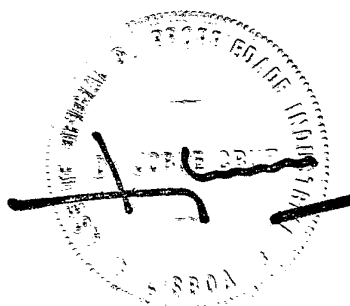
A Figura 7A descreve um estudo ao longo do tempo comparando o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi removida a hipófise, do tratamento com pST sózinha, pST em combinação com o anticorpo de suíno contra o peptídeo #8 de pST (aminoácidos 98-110) ou sem tratamento.

A Figura 7B descreve um estudo ao longo do tempo comparando o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi removida a hipófise, do tratamento com pST sózinha, pST em combinação com o anticorpo de suíno contra o peptídeo #9 de pST (aminoácidos 110-118) ou sem tratamento.

A Figura 7C descreve um estudo ao longo do tempo comparando o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi removida a hipófise, do tratamento com pST sózinha, pST em combinação com o anticorpo de suíno contra o peptídeo #11 de pST (aminoácidos 155-163) ou sem tratamento.

A Figura 8 descreve o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi retirada a hipófise, tratados com pST sózinha ou com anticorpos de suíno contra peptídeos de pST sózinhos (não combinados com pST).

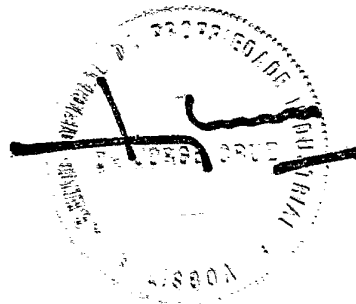
A Figura 9 descreve o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi retirada a hipófise, tratados com pST sózinha ou



em combinação com anticorpos de coelho contra peptídeos de pST.

A Figura 10 descreve o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi retirada a hipófise, tratados com pST sózinha ou em combinação com anticorpos de coelho contra peptídeos de pST numa experiência separada da descrita na Figura 9. Como testemunha negativa usou-se soro normal de coelho (NRS), o qual contém pequenas quantidades de somatotropina endógena de coelho.

A Figura 11 descreve o efeito no crescimento de ratos, aos quais foi retirada a hipófise, tratados com pST sózinha ou com anticorpos de coelho contra peptídeos de pST sózinhos (não combinados com pST).



DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Este invento é dirigido à identificação de epitopos antigênicos de pST, na forma de fragmentos peptídicos que são capazes de induzir respostas imunológicas em animais de sangue quente através da geração de anticorpos anti-pST específicos de epítipo. Tais anticorpos foram então administrados juntamente com pST a animais para aumentar o seu crescimento. Como alternativa, estes anticorpos são administrados a animais que são depois tratados com pST.

Os três peptídeos pST deste invento são designados por números e as suas sequências de aminoácidos (aa) são as seguintes:

- #8 (aa 98-110): Tre-Asn-Ser-Leu-Val-Pen-Gli-Tre-Ser-Asp-Arg-Val-Tir
- #9 (aa 110-118): Tir-Glu-Lis-Leu-Lis-Asp-Leu-Glu-Glu
- #11 (aa 155-163): Leu-Leu-Lis-Asn-Tir-Gli-Leu-Leu-Ser.

Estes três peptídeos têm sequências de aminoácidos que são homólogas das fracções correspondentes de pST.

Este invento também é dirigido a peptídeos tendo sequências de aminoácidos que são antigênicamente equivalentes às acabadas de descrever para os peptídeos # 8, 9 e 11. Tais peptídeos pode-se dizer que são antigênicamente equivalentes aos peptídeos tendo sequências de aminoácidos homólogas das correspondentes fracções de pST se as suas sequências de aminoácidos diferirem apenas em deleções mínimas ou tiverem substituições conservadas relativamente às sequências de pST de tal forma que



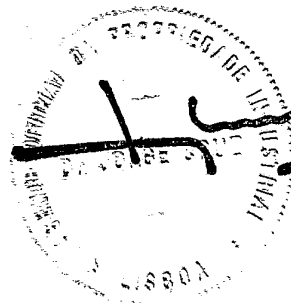
as configurações terciárias dos peptídeos permaneçam substancialmente inalteradas em relação às das frações de pST e possam ser gerados anticorpos contra aqueles peptídeos.

Para fins comparativos, construíram-se quatro outros peptídeos de pST com sequências de aminoácidos baseadas nas descritas no Pedido de Patente Europeia 294,406:

- #2 (aa 35-52): Ala-Tir-Ile-Pro-Glu-Gli-Gln-Arg-Tir-Ser-Ile-Gln-Asn-Ala-Gln-Ala-Ala-Fen
- #3 (aa 36-44): Tir-Ile-Pro-Glu-Gli-Gln-Arg-Tir-Ser
- #4 (aa 46-53): Gln-Asn-Ala-Gln-Ala-Ala-Fen-Cis
- #6 (aa 35-43): Ala-Tir-Ile-Pro-Glu-Gli-Gln-Arg-Tir

Estes sete peptídeos podem ser construídos por técnicas conhecidas incluindo, mas não estando limitados, síntese química, utilização de um sintetizador de peptídeos de fase sólida e expressão de uma sequência de nucleotídeos de DNA num hospedeiro adequado. Os peptídeos são então purificados por meios adequados tais como cromatografia de filtração em gel e cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (HPLC). A pureza dos peptídeos foi demonstrada pela análise da composição em aminoácidos.

Para aumentar a formação de anticorpos in vivo, um peptídeo deste invento é de preferência ligado a uma macromolécula que funciona como veículo para o peptídeo. Por exemplo, o peptídeo pode ser conjugado com uma proteína como seja a hemocianina de lapa (KLH). Outros veículos dentro do âmbito deste invento incluem os conhecidos tais como albumina sérica bovina,

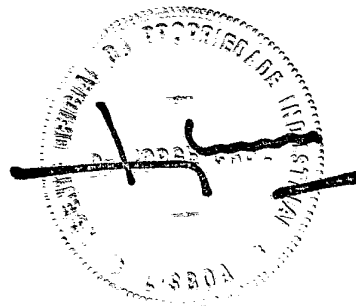


micoglobinas, β -galactosidase, penicilanase e toxinas bacterianas. Os veículos podem também ser moléculas sintéticas tais como multi-poli-DL-alanil-poli-L-lisina e poli-L-lisina.

Numa outra realização deste invento, anticorpos policlonais contra estes peptídeos são gerados e purificados a partir de animais de sangue quente, como sejam suínos ou coelhos, imunizados. Numa outra realização deste invento, anticorpos monoclonais contra estes peptídeos podem ser preparados usando técnicas convencionais.

Os anticorpos policlonais são gerados por imunização de animais com os peptídeos deste invento sózinhos ou na forma conjugada. Os peptídeos podem ser administrados por vias convencionais tais como injeção subcutânea, injeção intramuscular e intravenosa, assim como administração transdérmica e oral. Prefere-se administrar os peptídeos (ou seus conjugados) em associação com um veículo contendo um adjuvante, como seja adjuvante completo de Freund. É particularmente preferido usar um regime de dosagem em que uma administração inicial dos peptídeos é seguida de uma ou mais injeções de memória dos mesmos peptídeos em intervalos de tempo regulares.

Os anticorpos policlonais são recuperados obtendo primeiro uma amostra de sangue a partir de uma animal imunizado após decorrer um tempo suficiente desde a imunização que permita a formação de anticorpos. O soro (que contém os anticorpos) é isolado por meios convencionais tais como centrifugação. O soro é separado em fracções contendo imunoglobulina (Ig) e sem imunoglobulina (não-Ig) por exemplo por meio de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC). Apenas a fracção Ig contém anticorpos contra os peptídeos. Os anticorpos foram então isolados a partir da fracção de Ig por SDS-PAGE. A pureza dos anticorpos assim

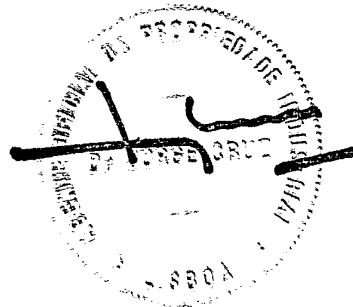


isolados é superior a 98% conforme determinado por SDS-PAGE. O nível do título de anticorpos foi testado usando um ensaio imunossorvent ligado a enzima (ELISA) de acordo com processos convencionais.

Os anticorpos monoclonais foram preparados através da imunização de ratinhos com um dos três novos peptídeos de pST, removendo os baços dos ratinhos, preparando suspensões de linfócitos, fundindo estes linfócitos com células de mieloma de ratinho, cultivando as células e colhendo os sobrenadantes dos hibridomas sobreviventes por despiste de anticorpos usando ELISA em fase sólida. Os hibridomas que produzem os anticorpos pretendidos foram ainda subclonados e injectados em ratinhos. Colheram-se então as ascites dos ratinhos e purificou-se Ig por precipitação com sulfato de amónio ou numa coluna de afinidade com proteína A em FPLC. Amostras de Ig assim purificadas foram testadas contra antígenos usando ELISA para identificar os anticorpos formados.

Estes anticorpos (policlonais e monoclonais) podem ser usados de duas formas para potenciar e aumentar a actividade promotora do crescimento de pST. Em primeiro lugar, um anticorpo é administrado a um animal de sangue quente juntamente com pST. Como alternativa o animal é tratado com uma ou mais doses de um anticorpo anti-pST e é subsequentemente tratado com pST. Em ambos os processos, pode ser usado mais do que um anticorpo. Assim, o invento também contempla a administração de combinações de anticorpos anti-pST #8, 9 e 11 ou seus equivalentes antigénicos.

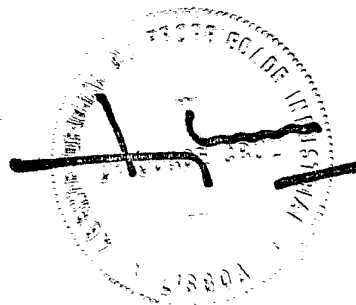
A actividade biológica destes anticorpos foi testada em ratos aos quais foi removida a hipófise (hipox). Os ratos hipox são deficientes no crescimento como resultado da remoção cirúrgica das suas glândulas da pituitária. Os ratos hipox servem como



um modelo útil para o estudo do efeito da somatotropina no crescimento (Groesbeck, M.D. e Parlow, A. F., Endocrinology, 120, 2582-2590 (1987)).

O tratamento destes ratos hipox com uma combinação de pST e anticorpos contra peptídeos do presente invento aumenta o efeito promotor do crescimento de pST. A pST usada pode ser isolada a partir de fontes naturais ou pode ser preparada usando técnicas de DNA recombinante tais como as descritas nos Pedidos de Patente Europeia publicados 104,920 ou 111,389. As fontes e o método de isolamento/preparação da própria pST não fazem parte deste invento. Os anticorpos podem também ser usados juntamente com pST recombinante em que a sequência de aminoácidos da pST nativa foi modificada usando uma técnica como a mutagênese dirigida, desde que se mantenha a função promotora do crescimento de pST. Ver, por exemplo, o Pedido de Patente Europeia publicado 303,972.

A imunoreactividade dos anticorpos contra peptídeos de pST foi examinada em porcos e coelhos. Como se mostra nas Tabelas 2 e 3 abaixo, encontrou-se que a maior parte dos anticorpos gerados por estes peptídeos são altamente específicos para os respectivos antigénios. No entanto, o anticorpo contra o peptídeo #2 (aa = 35-52) e #8 (aa = 98-110) em porcos e contra o peptídeo #3 (aa = 36-44) em coelhos parece possuir um espectro largo de imunoreactividade. Este efeito para os peptídeos #2 e #3 deve ser explicado pelas sobreposições das sequências de aminoácidos do peptídeo #2 (aa = 35-52) e #3 (aa = 36-44). A reactividade cruzada do anticorpo anti-peptídeo #6 (aa = 35-43) com o peptídeo #2 (aa = 35-52) em ambas as espécies deve ser devido à mesma possibilidade. Não é claro o motivo porque o peptídeo #8 (aa = 98-110) induz anticorpo com especificidades múltiplas em porcos, mas não dá origem a anticorpos que reconhecem todos os peptídeos

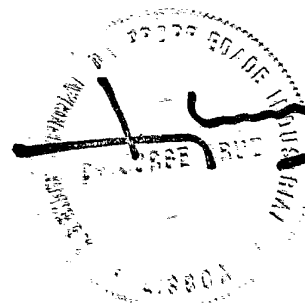


a serem testados em coelhos. é de salientar que todos os anticorpos induzidos por peptídeos reconhecem pST, enquanto o anticorpo anti-pST não é reactivo com peptídeos, exceptuando o peptídeo #2 em coelhos. Conforme esperado, os animais normais não produzem anticorpos contra pST e seus fragmentos.

O tratamento diário de ratos hipox com pST restaura marcadamente a sua capacidade de crescimento. O efeito somatogénico é potenciado quando pST é administrado juntamente com os anticorpos contra os peptídeos pST anteriormente descritos (ver Figuras 4 e 5). Tais anticorpos têm especificidade para epítopos de pST. Estes anticorpos não só potenciam o efeito como também aceleram a acção de pST (ver Figuras 7A, 7B e 7C).

Resultados de uma série de experiências (apresentados nas Figuras 4 e 5) demonstram que os anticorpos de suíno contra o peptídeo #2 (aa = 35-52), #8 (aa = 98-110), 9 (aa = 110-118) e #11 (aa = 155-163) potenciam a actividade promotora do crescimento de pST. No entanto, estes anticorpos não são eficazes quando administrados na ausência de pST. Ainda, Ig normal de suíno (NPS), anticorpo anti-pST e anticorpos contra os peptídeos #3 (aa = 36-44), #4 (aa = 46-53) e #6 (aa = 35-43) não têm efeito estatisticamente significativo. Os estudos de dose-resposta mostrados nas Figuras 6A, 6B e 6C indicam que a acção dos anticorpos contra peptídeos #8, 9 e 11 é rápida e apresenta uma curva de dose-resposta bi-fásica.

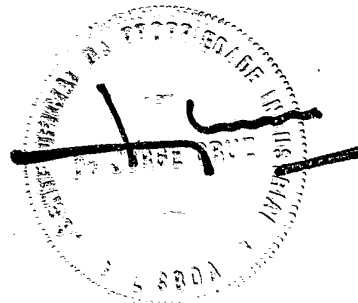
Os anticorpos de porco promotores do crescimento incluem os que respondem às sequências de aminoácidos de pST 35-52, 98-110, 110-118 e 155-163. Cada um destes anticorpos não é activo quando empregue na ausência de pST; eles necessitam de pST para aumento da actividade. A sua acção é muito rápida e também apresenta uma curva de dose-resposta bi-fásica.



Os anticorpos de coelho foram testados de modo semelhante (Figuras 9 e 10). Apenas o anticorpo que responde à sequência de aminoácidos de pST 110-118 (peptídeo #9) potencia significativamente o efeito de pST. Considerados em conjunto, os presentes resultados indicam que os anticorpos com certas especificidades para epítopos de pST são capazes de aumentar a somatogênese de pST. No entanto, os anticorpos anti-peptídeo #2 (aa = 35-52), #8 (aa = 98-110) e #11 (aa = 155-163) de coelhos não duplicam o efeito observado com anticorpos de porco.

Se bem que o mecanismo de acção destes anticorpos não seja claro, os requerentes sugerem vários mecanismos possíveis. Sem estar condicionado pela teoria, os mecanismos podem ser como se segue: 1) prolongamento do tempo de semi-vida da somatotropina em circulação, 2) melhoramento da libertação de somatotropina para as células do fígado, 3) aumento da eficácia de internalização de somatotropina por polimerização na superfície da célula alvo, 4) aumento do tempo de interacção da somatotropina com receptores por retardamento do processo de internalização (endocitose), 5) restrição dos efeitos da somatotropina na somatogénese e 6) alteração da configuração da somatotropina mais adequada à interacção com receptores relacionados com o crescimento.

Os resultados dos requerentes sugerem que as possibilidades 1-4 sejam os menos prováveis pois, apesar do facto de todos os anticorpos testados reagirem imunologicamente com pST, apenas alguns aumentam o efeito promotor do crescimento de pST. Ainda, outro apoio ao que foi dito atrás é proporcionado pelo facto de o anticorpo induzido contra a molécula de pST intacta ser altamente reactivo com pST, se bem que não mostre efeito promotor do crescimento. Por outro lado, a ligação de anticorpos a certas regiões da molécula de pST pode alterar a conformação e tal



reorientação pode fazer com ue seja melhor apresentada aos receptores adequados.

Este pedido apresenta uma abordagem para melhorar a actuação no crescimento animal na indústria de produção de carne. A imunização activa de animais com certos peptídeos de pST que contêm epítomos antigénicos, tais como aa = 98-110, aa = 110-118 e aa = 155-163, conduz à geração de anticorpos nos animais hospedeiros. Estes anticorpos amplificam a actividade somatogénica de somatotropina endógena e exógena. Como alternativa, estes novos peptídeos e anticorpos podem também ser usados para induzir anticorpos anti-idiotípicos por meio de técnicas convencionais. Tais anticorpos anti-idiotípicos podem mostrar-se úteis como potenciais vacinas.

Para que este invento possa ser melhor compreendido, são estabelecidos os exemplos que se seguem. O exemplo tem apenas fins ilustrativos e não deve ser considerado como limitante do âmbito do invento.



EXEMPLO 1

1. Preparação de Peptídeos pET

Os peptídeos foram sintetizados manualmente ou usando um sintetizador de peptídeos em fase sólida Biosearch 9600 (Miligen Biosearch, Burlington, MA). Os aminoácidos ligados a um grupo protector N-t-butiloxicarbonilo (Boc), nomeadamente Boc-Ala, Boc-Gli, Boc-Val, Boc-Leu, Boc-Pro, Boc-Ser (OBzl), Boc-Tre (OBzl), Boc-Asp (OBzl), Boc-Tir (2-Brz), Boc-Arg (Tos), Boc-Lis (2-Clz), Boc-Asn (Xan), Boc-Gln (Xan) e Boc-Cis (4-MeBzl) foram adquiridos à Advanced Chemtech, Louisville, KY, e empregues para síntese. Como suporte sólido usou-se uma resina Merrifield (1% de divinilbenzeno-estireno interligados, Bachem Bioscience Inc., Philadelphia, PA). O peptídeo montado foi clivado da resina usando ácido hidrofúrico a 95% e 5% de anisole a 0°C durante uma hora. Todos os peptídeos foram purificados numa coluna de filtração com gel G-25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) e HPLC preparativa em fase reversa (coluna C₁₈, acetonitrilo/água contendo 0,1% de TFA, usando um gradiente de 0 a 90% de acetonitrilo durante 45 min).

A pureza destes peptídeos foi determinada por HPLC analítica e um analisador de aminoácidos. Um exemplo da análise por HPLC está apresentado para o peptídeo #8 (aa = 98-110) na Figura 2. O pico principal na Figura 2 sugere claramente que a pureza do peptídeo #8 é superior a 95%. A qualidade dos peptídeos deste invento foi ainda apoiada pela análise da composição em aminoácidos como indicado na Tabela 1:

TABELA 1

ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DOS PEPTÍDEOS PST

Aminoácido	Peptídeo #8 (98-110) ^a		Peptídeo #9 (110-118)		Peptídeo #11 (155-163)	
	v. Teor ^c	V. exp. ^b	V. Teor	V. Exp.	V. Teor	V. Exp.
Arg	1	1.00	NA	NA	NA	NA
Asp	2 ^e	1.86 ^e	1	1.00	1	1.01
Glu	NA		3	3.10	NA	
Gly	1	1.08	NA		1	1.04
Leu	1	1.03	2	1.92	4	3.86
Lys	NA		2	2.00	1	1.00
Phe	1	0.88	NA		NA	
Ser	2	2.00	NA		1	0.92
Thr	2	1.99	NA		NA	
Tyr	1	0.85	1	0.92	1	0.98
Val	2	1.73	NA		NA	

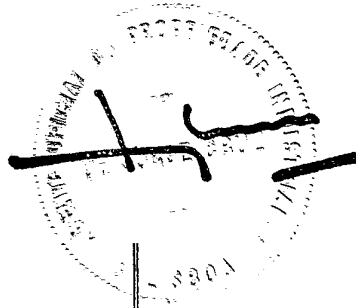
a Valores teóricos

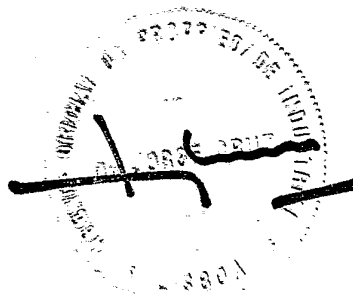
b Valores experimentais

c mol/ml peptídeo

d Não aplicável

e O valor para o ácido aspártico inclui ácido aspártico presente no peptídeo, assim como asparagina que é hidrolizada para dar ácido aspártico no decurso da análise de aminoácidos.





Os peptídeos foram então liofilizados e guardados a -20°C num excicador até serem usados.

2. Conjugação dos peptídeos de pST com Hemocianina de Lapa Buraco de Fechadura (KHL)

Os peptídeos foram dissolvidos em tampão de fosfatos salino (PBS) (GIBCO, Grand Island, NY) e misturados com KHL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) numa proporção molar aproximada de 25 para 1. Adicionou-se glutaraldeído (=,5%) como agente de acoplamento e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 15 a 60 minutos. Adicionou-se subsequentemente NaBH_4 e a mistura de conjugação foi extensivamente dialisada contra PBS. Os agrgados foram removidos por centrifugação a alta velocidade (10 000 g) e a concentração foi determinada num espectrofotómetro de UV num comprimento de onda de 280 nm.

3. Imunização de Animais com Peptídeos pST

Conjugados de peptídeos pST-KLH (1 mg) foram emulsionados com um volume igual de adjuvante completo de Freund (CFA, GIBCO) antes da administração porcos e coelhos. Porcos fêmea (Duroc X Yorkshire X Hampshire), com 3-5 meses de idade, pesando 30-50 Kg, foram obtidos de colónias de cruzamento da American Cyanamid Company, Princeton, N.J. Os porcos foram injectados subcutâneamente com 0,5 mg de conjugados de peptídeo-KLH em dois sítios diferentes na área do pescoço atrás das orelhas. Coelhos brancos fêmeas e machos New Zealand, com 10-15 semanas de idade, pesando 2-3 kg, foram adquiridos à Skippack Farm, Skippack, PA. Os coelhos foram imunizados de modo semelhante por injeccção dos conjugados nas pernas traseiras. A todos os animais foram dadas repetitivamente injeccções de memória contendo os mesmos antigénios de quatro em quatro semanas.



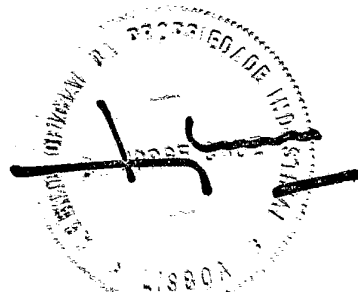
4. Preparação de Anticorpo Policlonal

Colheu-se sangue dos animais 7-14 dias após cada injeção de memória com antígeno. O sangue foi colhido da veia jugular do porco e da veia da orelha dos coelhos. Após coagulação, o soro foi isolado por centrifugação. Todas as amostras de soro foram diluídas para 50% com tampão de ligação (3M NaCl, 1,5M glicina, pH 8,9) e aplicado numa coluna preparativa de Proteína A Superose HR 16/3 num sistema de FPLC (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar Ig do soro. A fracção sem Ig foi eluída por lavagem da coluna com o tampão de ligação (Figura 3). A fracção de Ig ligada foi subsequentemente colhida por lavagem da coluna com ácido cítrico 0,1M, pH 3. Neutralizou-se imediatamente para pH 7-8 com tampão Tris 2 M, pH 8,2 e concentrou-se por ultrafiltração (Amicon, Danvers, MA). A fracção de Ig geralmente contribui com aproximadamente 30% da proteína total do soro. A pureza da fracção de Ig é superior a 95% conforme determinado por SDS-PAGE (Figura 3A) como se segue.

As amostras de Ig foram aplicadas num gel de 10% de SDS-PAGE e a electroforese efectuada a 8 mA durante a noite. O gel foi corado com azul Coomassie e as bandas de proteína foram analisadas num varridor de géis após descoloração. Os marcadores de peso molecular incluem fosforilase B (97,4 kd), albumina do soro bovina (69 kd), ovalbumina (43 kd) e α -quimotripsinogénio (25,7 kd). Após diálise extensiva contra PBS, o anticorpo foi dividido em amostras e guardado a -20°C até ser usado.

5. Ensaio Imuno-sorvente Ligado a Enzima (ELISA) em Fase Sólida

Preparou-se o antígeno em PBS e adicionou-se um μ g em 100 μ l a cada cavidade de uma placa de 96 cavidades de fundo plano



em polistireno. Após ser incubada durante uma hora, a placa foi lavada três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 usando um sistema de lavagem de placas automático (Dynatech Wash II, Chantilly, VA) e distribuiu-se por cada cavidade 200µl de 2% BSA (Sigma). A placa foi incubada novamente durante mais uma hora. As amostras de soro foram adicionadas e testadas numa concentração final de 5% nas cavidades. A placa foi incubada durante 30 minutos, lavada seis vezes com PBS e adicionado 100 µl de soro de coelho anti-IgG de porco ou soro de cabra anti-IgG F(ab')₂ de coelho conjugados com fosfatase alcalina (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) numa diluição de 1/1000. A placa foi lavada novamente após 30 minutos de incubação e adicionou-se 100 µl de p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml, Sigma) em 0,1M dietanolamina, pH 10,3, como substrato para o desenvolvimento de cor. Finalmente, a resposta colorimétrica foi registada como densidade óptica (DO) num leitor de placas de ELISA num comprimento de onda de 405 nm. O processo de incubação é sempre realizado a 37°C.

6. Imuno-reatividade de Anticorpos contra pST e seus Peptídeos

Induziram-se anticorpos contra peptídeos pST em porcos e coelhos e a imuno-reatividade destes anticorpos foi examinada usando pST e os sete peptídeos como antígenos alvo. O bioensaio para a imuno-reatividade foi realizado com ratos hipox (ratos Sprague-Dawley, 21 dias de idade, pesando 50-64 gramas cada, adquiridos à Taconic Farm, Germantown, N.Y.). Após entrega, estes ratos foram mantidos em observação durante 7-10 dias para assegurar hipófisectomia completa. Usando um programa de computador, os animais foram escolhidos ao acaso e formados grupos de oito ratos. Dois grupos de testemunhas foram sempre incluídos em todas as experiências. O primeiro grupo consiste em ratos hipox não tratados que servem como testemunha negativa. O outro grupo testemunha consiste em ratos hipox que receberam uma dose mínima



eficaz de pST (5 μ g) em injeções diárias e servem assim como testemunhas positivas. O anticorpo (0.5 a 1 mg) foi misturado com 5 μ g de pST à temperatura ambiente durante uma hora e administrado a cada um dos ratos da experiência. Todos os ratos foram injectados com 0,2 ml dos materiais a testar subcutâneamente na região do pescoço. O crescimento destes animais foi controlado e registado como ganho de peso durante a experiência.

A avaliação estatística foi realizada pela análise dos mínimos quadrados de variância para distribuições ao acaso usando o processo dos Modelos Lineares Gerais do Sistema de Análise Estatística. Os resultados dos testes de imuno-reactividade usando anticorpos gerados em porcos estão apresentados na Tabela 2:



TABELA 2
 IMUNO-REACTIVIDADE DE ANTICORPOS DE SUINO
 ANTICORPO CONTRA;^a

	pST	#2	#3	#4	#6	#8	#9	#11	Normal ^b
(Antigénio) ^c									
pST	+++ ^d	+	+	+	++	+	++	+	-
#2 (aa 35-52):	-	+	-	-	+	+	-	-	-
#3 (aa 36-44)	-	+	+	-	-	+	-	-	-
#4 (aa 46-53)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
#6 (aa 35-43):	-	+	-	-	+	+	-	-	-
#8 (aa 98-110):	-	-	-	-	-	+	-	-	-
#9 (aa 110-118):	-	+	-	-	-	+	+	-	-
#11 (aa 155-163):	-	+	-	-	-	+	-	+	-

- a Testado numa dose de 5 ug de Ig
- b De suínos normais não tratados
- c 1 ug/cavidade
- d Leituras de DO: "+++" 1,0; "++" 0,5; "+" 0,2; "-" 0,2



Os resultados na Tabela 2 indicam que os anticorpos de porco induzidos contra vários peptídeos reagem com os respectivos antigénios, exceptuando o anticorpo anti-peptídeo #4 (aa = 46-53). Os anticorpos contra os peptídeos #2 (aa = 35-52) e #8 (aa = 98-110) reagem de forma cruzada com quase todos os antigénios examinados, enquanto os restantes anticorpos são específicos. Se bem que todos os anticorpos induzidos contra peptídeos reconheçam p5T intacta, anticorpo contra p5T não reage com qualquer um dos seus peptídeos. Ig de porco normal não reage de todo.

Os anticorpos de coelho foram testados de forma semelhante quanto à sua reactividade e os resultados estão apresentados na Tabela 3:

TABELA 3
 IMUNO-REACTIVIDADE DE ANTICORPOS DE COELHO
 ANTICORPO CONTRA;^a

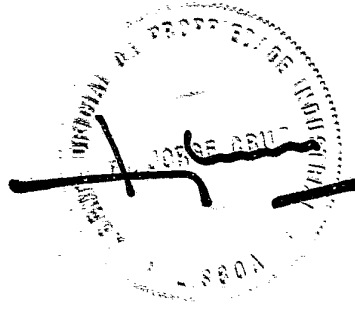
	pST	#2	#3	#4	#6	#8	#9	#11 Normal ^b
(Antigenénio) ^c								
pST	+++ ^d	++	+	++	+++	++	+	-
#2 (aa 35-52):	+	++	++	-	+	-	-	-
#3 (aa 36-44):	-	-	++	-	-	-	-	-
#4 (aa 46-53):	-	-	-	-	-	-	-	-
#6 (aa 35-43):	-	-	++	-	+++	-	-	-
#8 (aa 98-110):	-	-	++	-	-	-	-	-
#9 (aa 110-118):	-	-	-	-	-	-	+++	-
#11 (aa 155-163):	-	-	-	-	-	-	-	+++

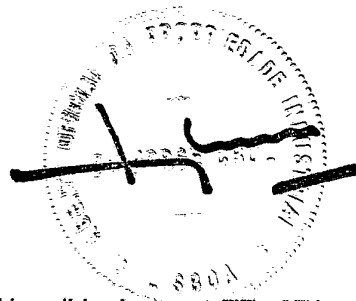
a Testado numa concentração final de 0,5%

b De coelhos normais não testados

c 1 ug/cavidade

d Leituras de DO "+++" 3,0; "++" 1,0; "+" 0,5; "-" 0,5





Os peptídeos #2 (aa = 35-52), #6 (aa = 35-43), #9 (aa = 110-118) e #11 (aa = 5-163) induzem anticorpos que reconhecem os respectivos antígenos. Os anticorpos de coelhos imunizados com o peptídeo #6 dão reação cruzada fraca com o peptídeo #2. Os anticorpos gerados pelo peptídeo #3 (aa = 36-44) expressam um espectro largo de reactividade cruzada com os peptídeos #2, #6 e #8. Os peptídeos #4 (aa = 46-53) e #8 (aa = 98-110) não induzem qualquer título de anticorpo detectável contra eles próprios. Se bem que todos os anticorpos reconheçam a molécula de pST intacta, o anticorpo induzido por pST reage apenas com pST, fracamente com o peptídeo #2, mas não com outros peptídeos.

7. Aumento do Crescimento pelos Anticorpos de Suíno

O efeito promotor do crescimento de anticorpos conjuntamente com pST foi avaliado em ratos hipox. Todos os animais foram tratados com 5 µg de pST ou 5 µg de pST juntamente com 1 mg de anticorpo de suíno durante 10 consecutivos. O peso do corpo foi medido e o efeito do anticorpo na actividade de pST foi calculado como a percentagem de ganho de peso relativamente às testemunhas que receberam pST sózinho. Os resultados na Figura 4 demonstram que os anticorpos contra os peptídeos #2 (aa = 35-52), #8 (aa = 98-110), #9 (aa = 110-118) e #11 (aa = 5-163) aumentam significativamente o efeito de pST. Os restantes anticorpos, incluindo Ig normal de suíno, anticorpo anti-pST e anticorpos contra os outros peptídeos, não são significativamente eficazes.

O efeito dos anticorpos contra alguns destes peptídeos foi novamente testado numa experiência separada e os resultados estão apresentados na Figura 5. Os ratos hipox receberam tratamentos com 5 µg de pST juntamente com anticorpo contra peptídeos #8 (0,5 mg), #9 (1 mg) e #11 (1 mg) durante quatro dias

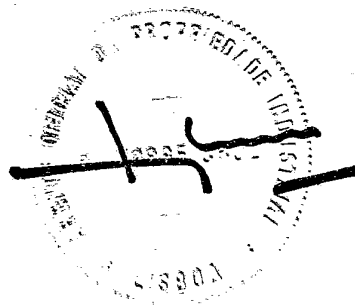


consecutivos. O crescimento destes ratos foi medido e, novamente, os três anticorpos aumentaram significativamente o efeito da actividade de pST. Ig de porcos normais numa dose de 1 mg/dia não o conseguiu.

Realizou-se um estudo de dose-resposta por tratamento de ratos hipox com várias doses do anticorpo anti-peptídeo #8 juntamente com 5 µg de pST durante quatro dias. Os dados na Figura 6A demonstram que o efeito de pico do anticorpo anti-peptídeo #8 para aumentar a actividade de pST é de 0,25 mg/dia. Ele diminui em doses de 0,5 a 2 mg/dia, mas o efeito máximo torna a aparecer às 4 mg/dia. A curva de dose-resposta bifásica foi também observada com o anticorpo anti-peptídeos #9 e 11. As doses óptimas são 0,5 e 2 mg/dia para o anti-peptídeo #9 e são de 0,25 e 1 mg/dia para o anti-peptídeo #11 (Figuras 6B e 6C, respectivamente).

Foi também realizado um estudo cinético da imunização passiva com anticorpos contra os peptídeos. Ele indicou que os ratos hipox têm defeitos no processo normal de crescimento (ver Figuras 7A, 7B e 7C; linha designada «Sem tratamento»). No entanto, as injecções diárias com 5 µg de pST durante 10 dias restaura marcadamente a sua capacidade de ganhar peso. Uma combinação de pST com o anticorpo anti-peptídeo #8 (0,5 mg/dia) melhora ainda o aumento de crescimento (Figura 7A). O aumento significativo pelo anticorpo torna-se detectável dois dias após o tratamento, sugerindo uma acção rápida. Observações semelhantes foram também obtidas com anticorpos contra peptídeos #9 e #11 (ver Figuras 7B e 7C, respectivamente).

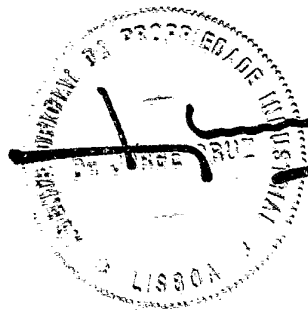
Este efeito de aumento dos anticorpos de suíno observado atrás resulta apenas em conjugação com pST, porque estes anticorpos não estimulam o crescimento de ratos hipox quando



linfócitos. Estes linfócitos foram fundidos com células de mieloma de ratinho PS2/O sem hipoxantina-fosforribosil-transferase (HPRT-negativa) com 50% de polietilenoglicol, suspensas em meio mínimo essencial de Dulbecco contendo 20% de soro fetal de vitela, 0,175 mg/ml de aminopterin, 13,6 mg/ml de hipoxantina, 3,68 mg/ml de timidina e 50 mg/ml de gentamicina e finalmente distribuído em placas de cultura de 96 cavidades. Após cultura durante 10-14 dias, os sobrenadantes dos hibridomas que sobreviveram devido ao fenótipo HPRT-positivo dos linfócitos foram colhidos para despiste de anticorpos numa ELISA de fase sólida. Os encontrados a produzir os anticorpos pretendidos foram posteriormente subclonados pelo processo de diluição limite. Os clones assim seleccionados foram injectados intraperitonealmente em ratinhos Balb/C que foram previamente injectados com pristano para a produção de ascites contendo anticorpos.

2. Preparação de Anticorpos Monoclonais

Colheram-se ascites das cavidades peritoneais de ratinhos e purificou-se Ig pela técnica de precipitação com sulfato de amónio a 50%. Como alternativa, as amostras foram diluídas para 50% com tampão de ligação (3M NaCl, 1,5M glicina, pH 8,9) e aplicadas numa coluna preparativa de Protein A Superose HR 16/5 num sistema de FPLC (Pharmacia, Piscataway, N.J.). A fracção sem Ig foi eluída da coluna com o tampão de ligação. A Ig ligada foi subseqüentemente colhida por lavagem da coluna com ácido cítrico 0,1 M, pH 3. A Ig ligada foi imediatamente neutralizada para pH 7-8 com tampão Tris 2M, pH 8,2. O anticorpo preparado por ambos os processos foi extensivamente dializado contra tampão de fosfatos salino (PBS), concentrado por ultrafiltração (Amicon, Danvers, MA), distribuído em pequenas porções e finalmente guardado a -20°C até ser usado.



REIVINDICAÇÕES

1ª. - Processo para a obtenção de um peptídeo, caracterizado por se incorporar no referido peptídeo uma sequência de aminoácidos homóloga de uma fracção de somatotropina porcina (pST) seleccionada de entre as seguintes sequências:

(a) pST 98-110,

(b) pST 110-118,

(c) pST 155-163,

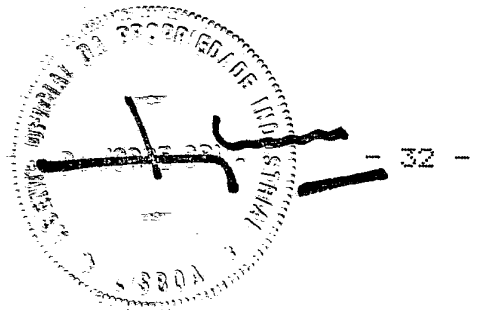
ou suas sequências antigenicamente equivalentes.

2ª. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por obter um peptídeo que tem a sequência de aminoácidos Tre-Asn-Ser-Leu-Val-Phe-Gli-Tre-Ser-Asp-Arg-Val-Tir, Tir-Glu-Lis-Leu-Lis-Asp-Leu-Glu-Glu ou Leu-Leu-Lis-Asn-Tir-Gli-Leu-Leu-Ser ou uma sua sequência antigenicamente equivalente.

3ª. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por se obter um peptídeo que está ligado a um veículo.

4ª. - Anticorpo caracterizado por ser contra um peptídeo em que o peptídeo tem uma sequência de aminoácidos homóloga de uma fracção da somatotropina porcina (pST) seleccionada entre as seguintes sequências:

(a) pST 98-110,



(b) pST 110-118,

(c) pST 155-163,

ou suas sequências antigenicamente equivalentes.

5a. - Anticorpo de acordo com a Reivindicação 4, caracterizado por ser um anticorpo policlonal.

6a. - Anticorpo de acordo com a Reivindicação 4, caracterizado por ser um anticorpo monoclonal.

7a. - Anticorpo contra um peptídeo de acordo com a Reivindicação 6, caracterizado por o peptídeo ter a sequência de aminoácidos

Tre-Asn-Ser-Leu-Val-Phe-Gli-Tre-Ser-Arg-Val-Tir,

Tir-Glu-Lis-Leu-Lis-Asp-Leu-Glu-Glu ou

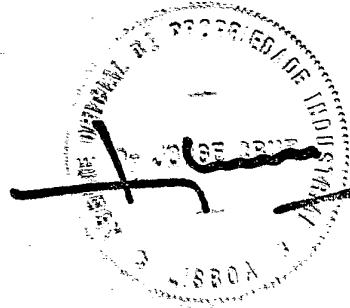
Leu-Leu-Lis-Asn-Tir-Gli-Leu-Leu-Ser ou uma sua sequência antigenicamente equivalente.

8a. - Método para a potenciação da actividade de pST, caracterizado por compreender a administração, a um animal de sangue quente, de uma quantidade eficaz de pST e uma quantidade eficaz de de um ou mais anticorpos contra um peptídeo em que o peptídeo tem uma sequência de aminoácidos homóloga de uma fracção de somatotropina porcina (pST) seleccionada de entre as seguintes sequências:

(a) pST 98-110,

(b) pST 110-118,

(c) pST 155-163,



ou suas sequências antigenicamente equivalentes.

9a. - Método de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado por (a) um ou mais anticorpos serem administrados juntamente com pST; ou (b) um ou mais anticorpos serem administrados antes da administração de pST.

10a. - Método de acordo com a Reivindicação 8, caracterizado por a pST usada ter uma sequência de aminoácidos que difere da sequência nativa.

Lisboa, 25 de Outubro de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA

SEQUENCIA DE AMINOACIDOS DA SOMATOTROPINA PORCINA

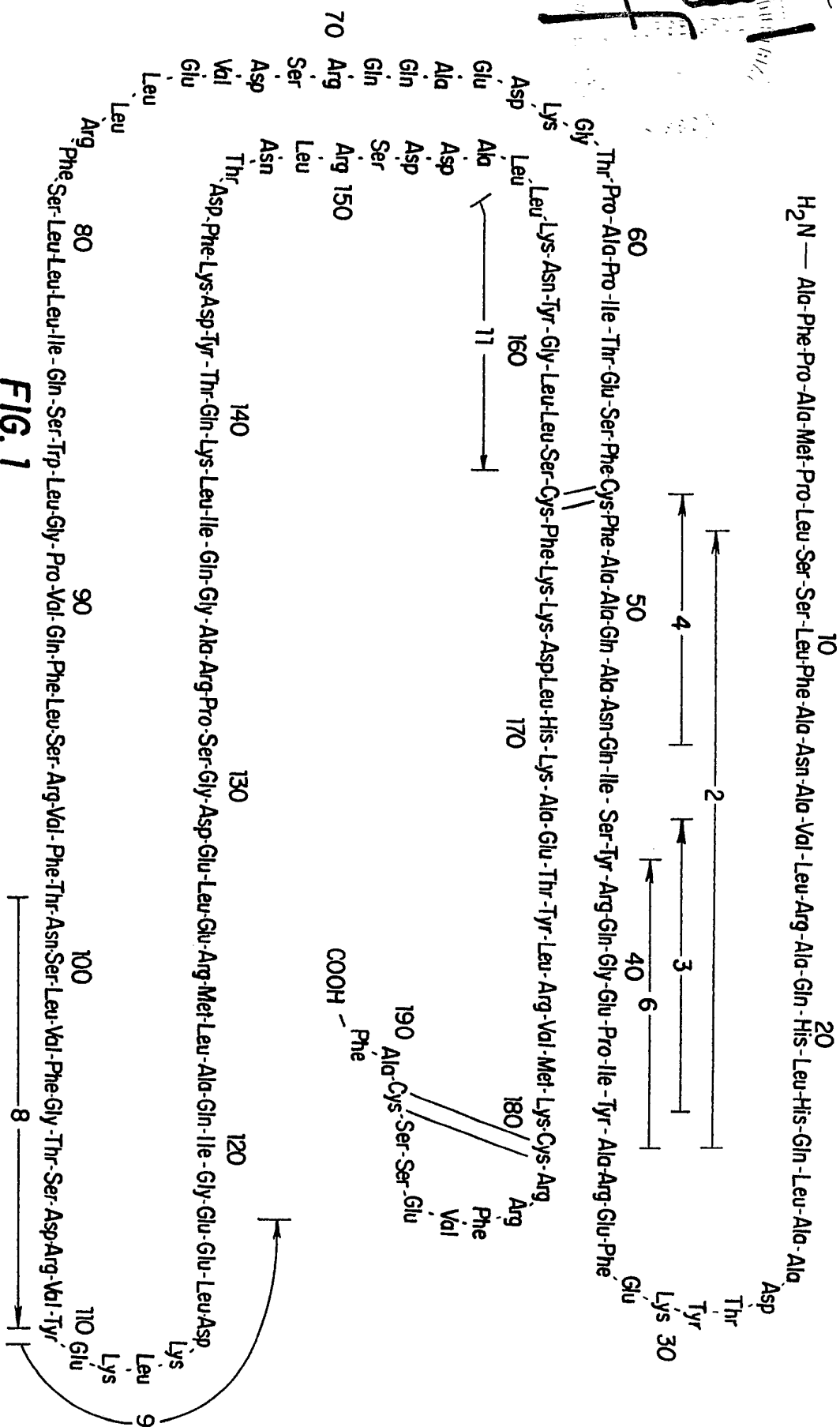


FIG. 1

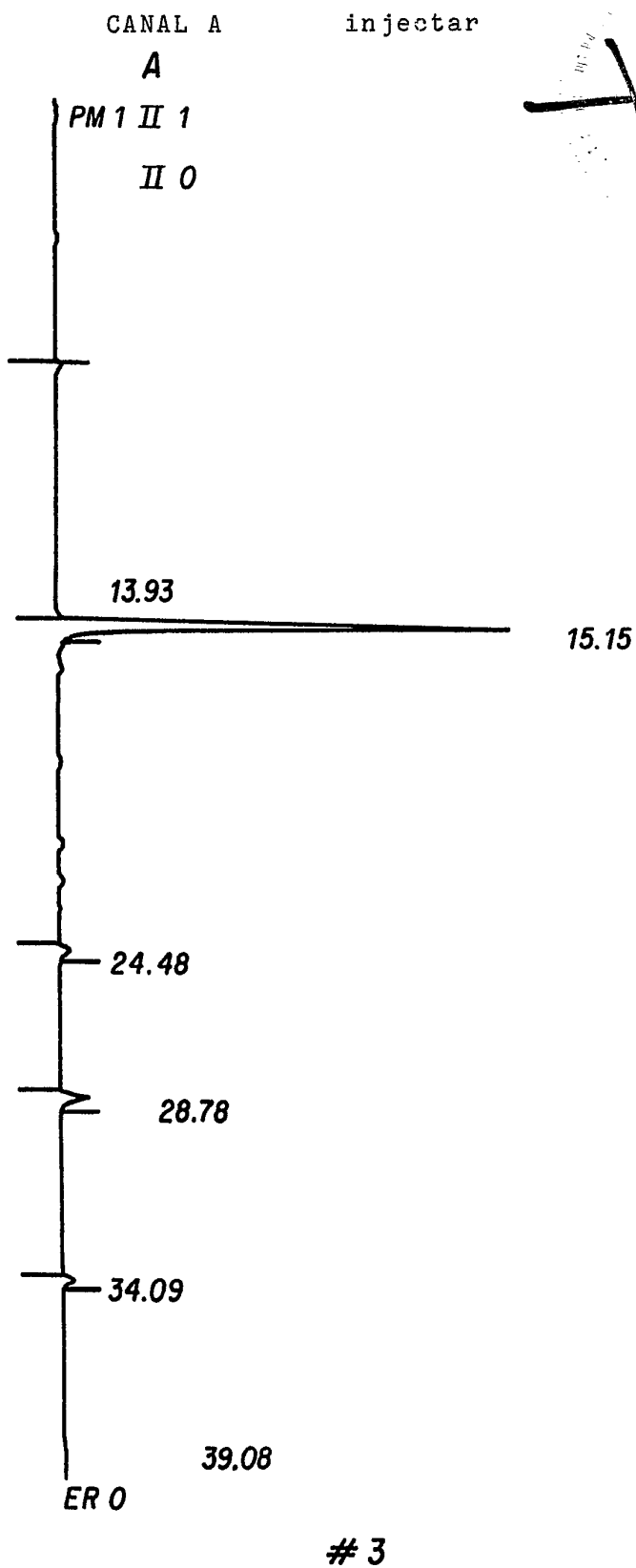


FIG. 2

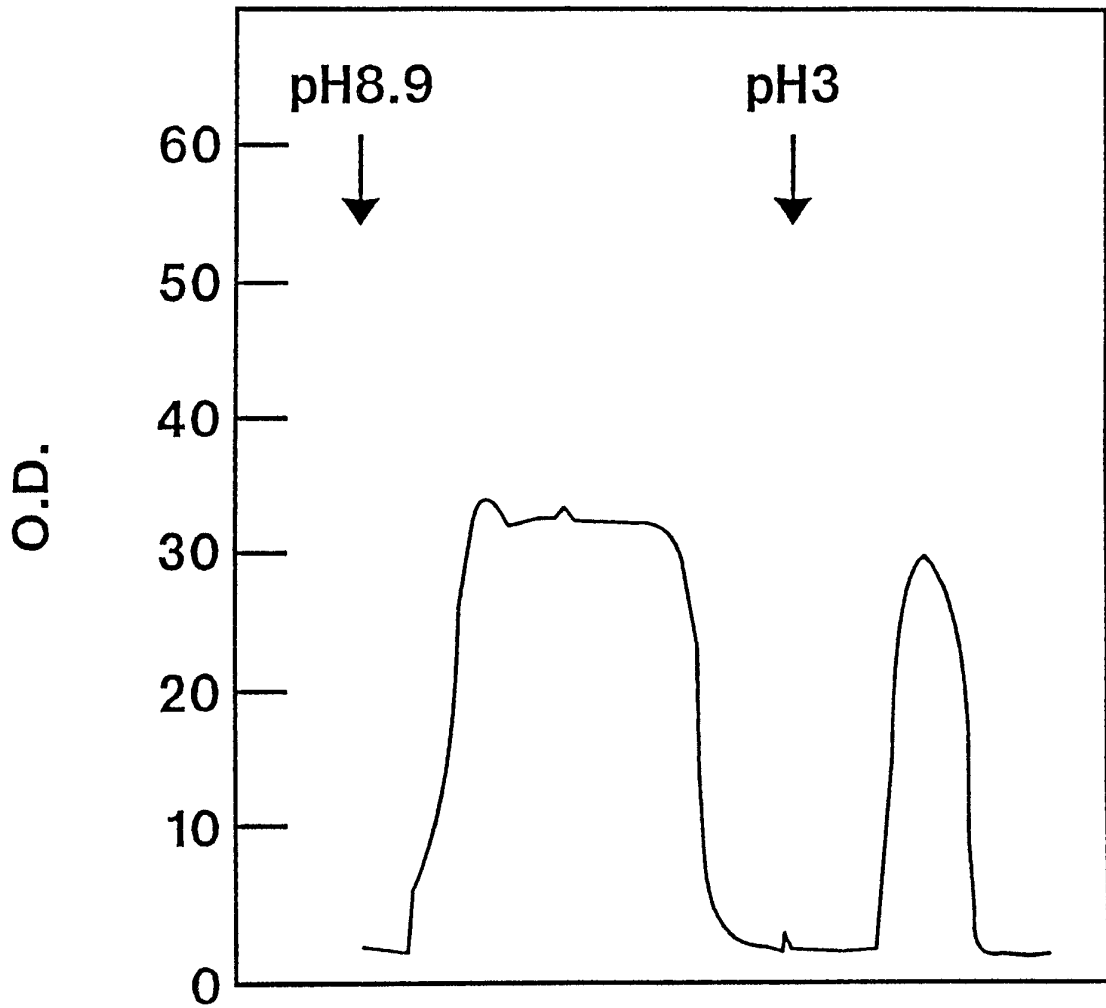
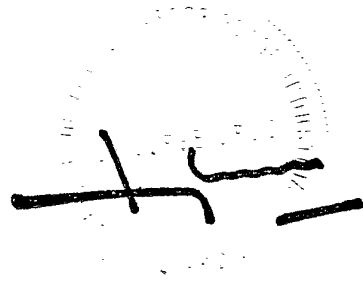


FIG. 3

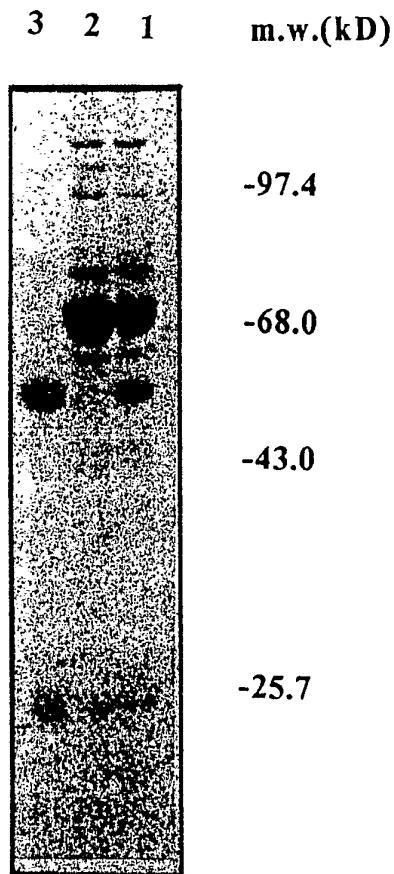
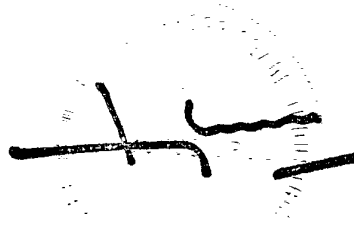


FIG.3A

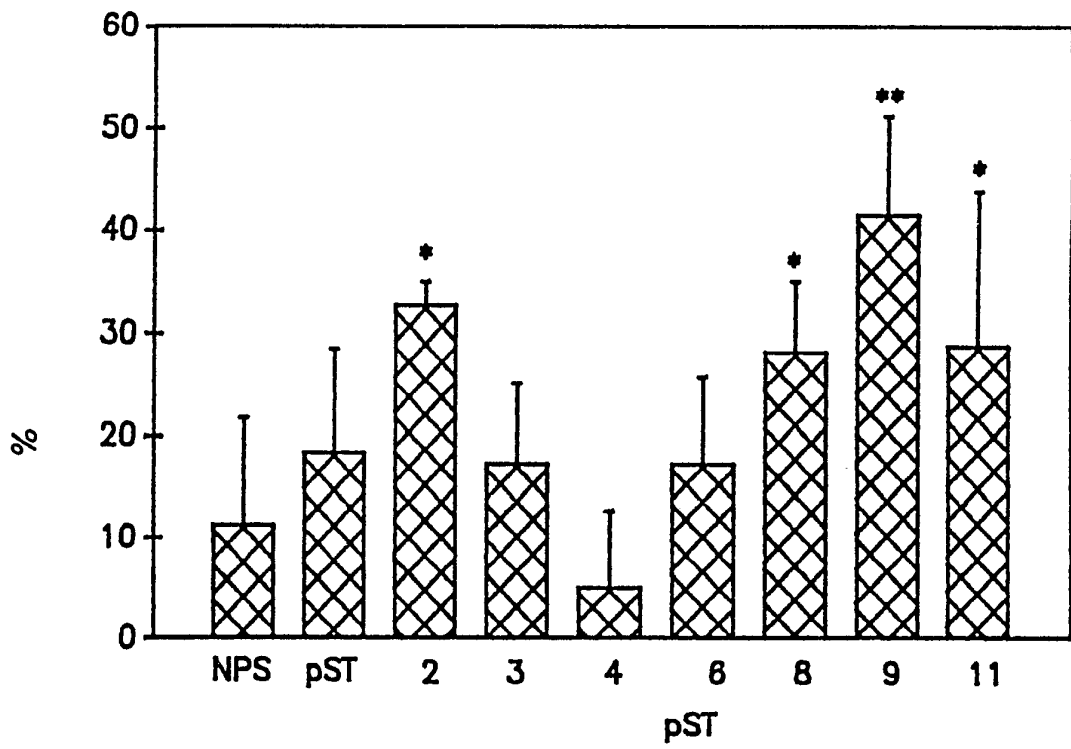
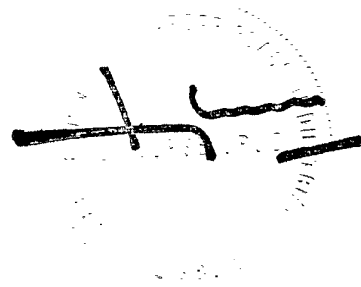


FIG. 4

74

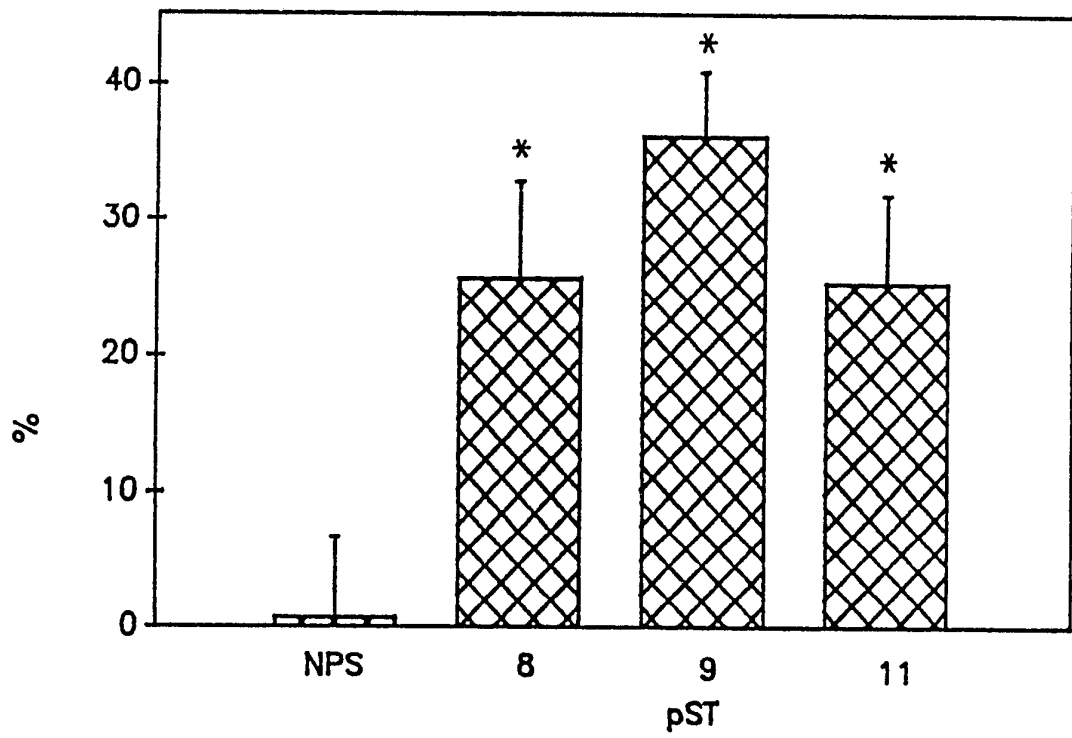
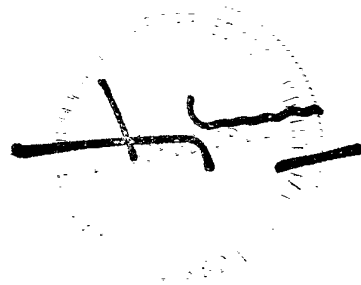
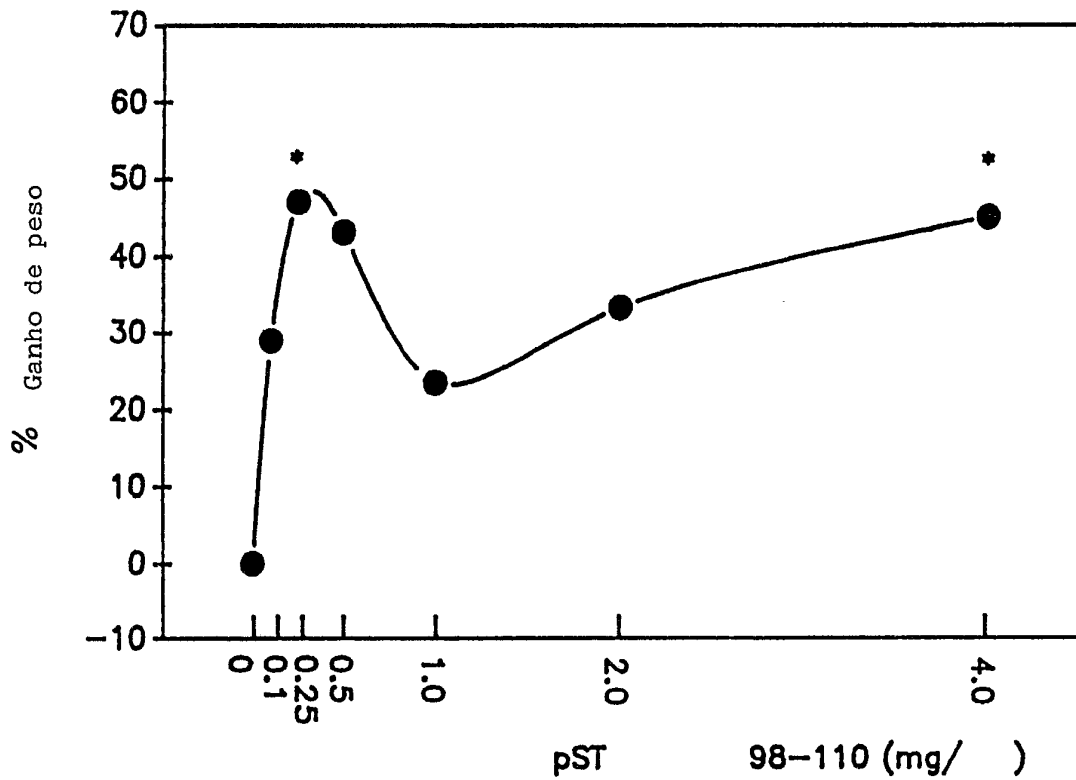


FIG. 5



Dose-resposta do anticorpo de suino contra pST155-163(#11)
no crescimento de ratos lipofissectonizados

pST 98-110 (#8)



Dose de anticorpo contra o peptideo pST 155-163 (mg/dia)

FIG. 6A

Handwritten signature or initials

pST 110-118 (#9)

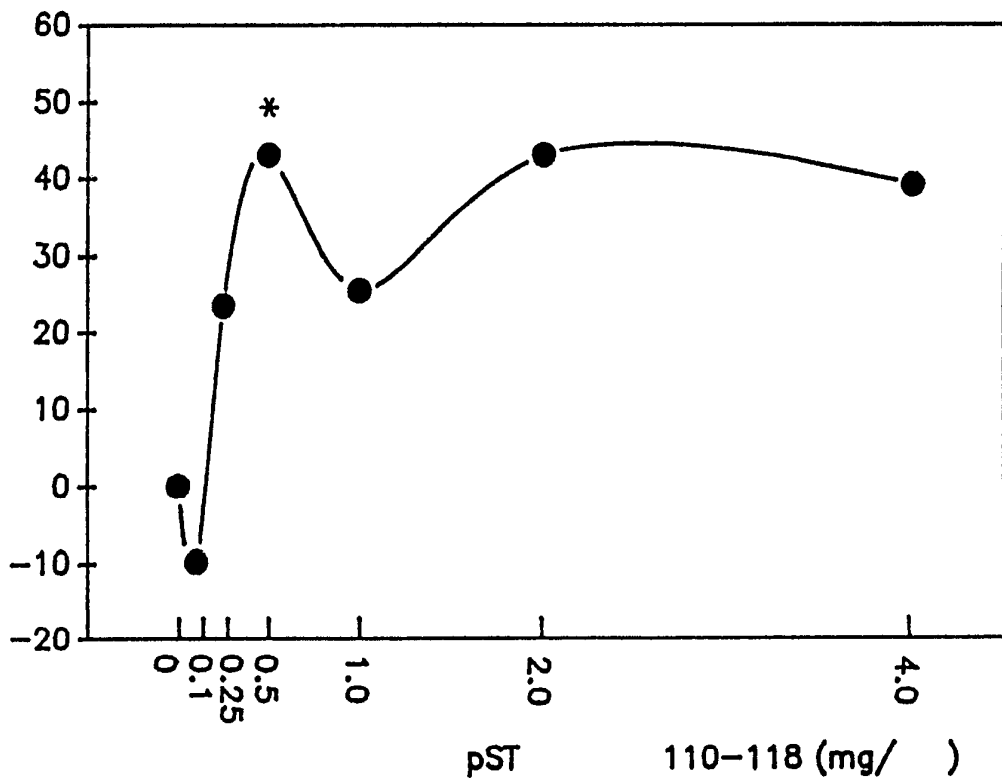
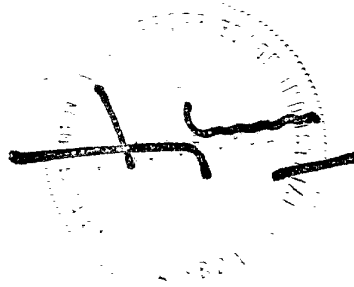
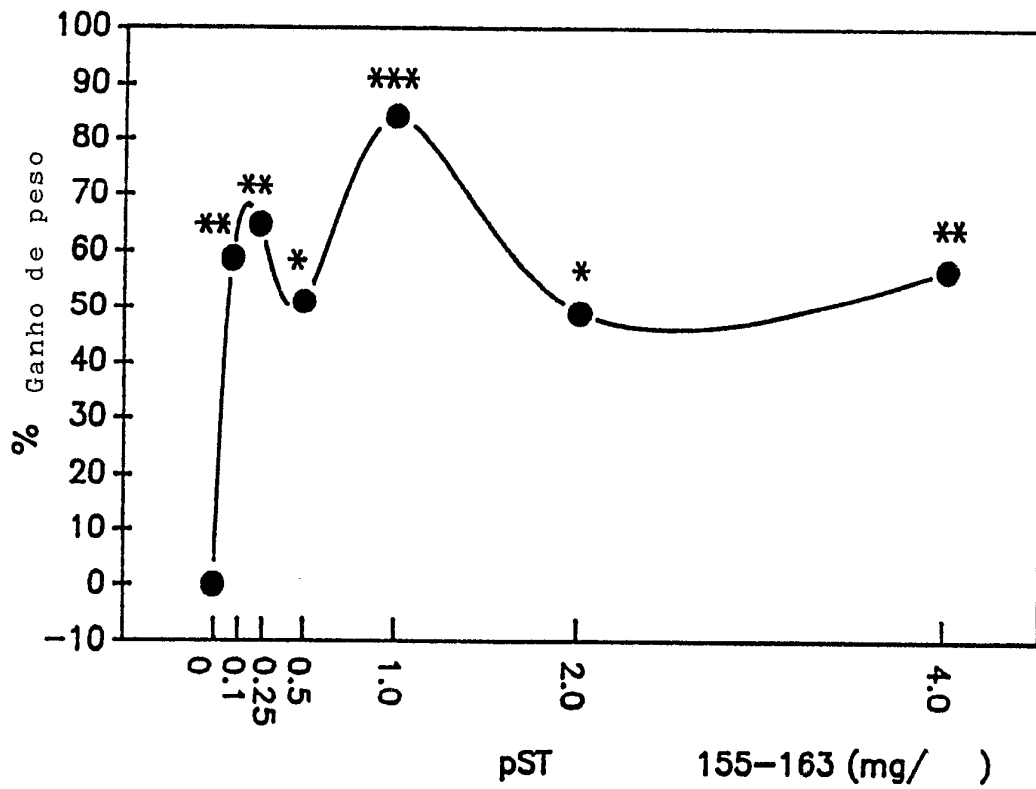


FIG. 6B



Dose-resposta de anticorpo de suino contra pST 155-163(≠)
no crescimento de ratos lipofissectonizados

pST 155-163 (#11)



Dose de anticorpo contra o peptideo pST 155-163(mg/dia)

FIG. 6C



Efeito do anticorpo de suino contra pST98-110(= # 8) no crescimento de ratos hipofissectonizados

pST 98-110 (#8)

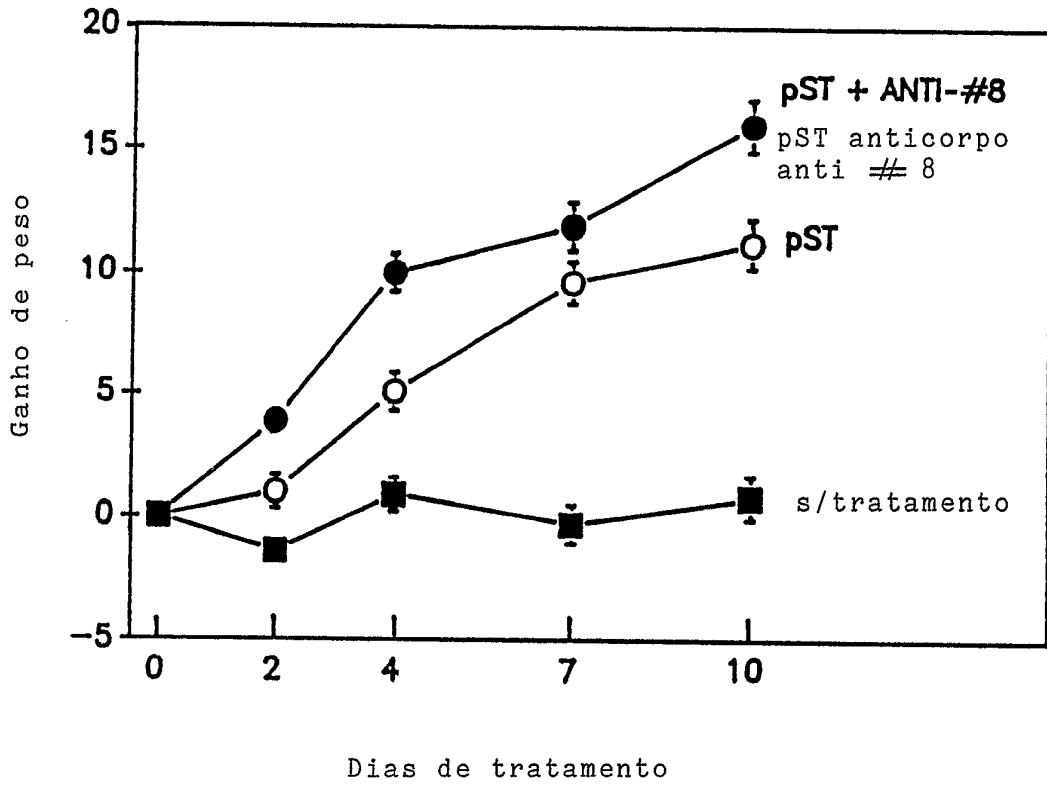
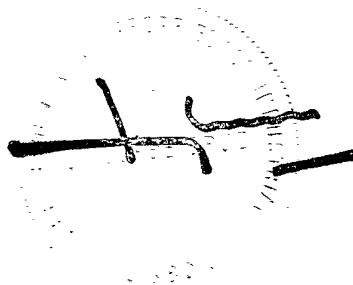


FIG. 7A



Efeito do anticorpo de suino contra pST 110-118 (#9)
no crescimento de ratos hipofissectonizados

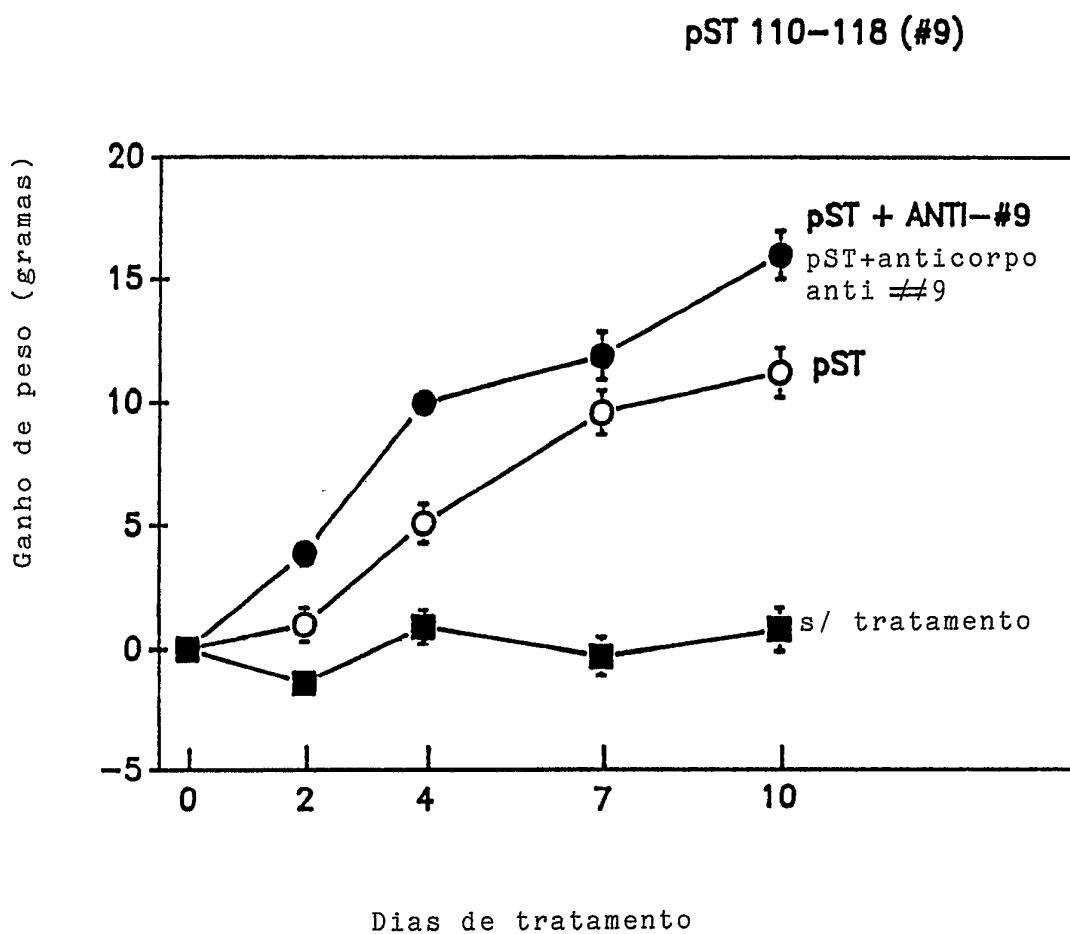
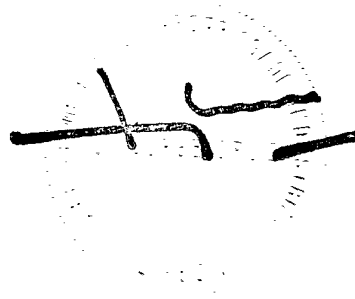


FIG. 7B



Efeito de anticorpo de suino

pST 155-163 (#11)

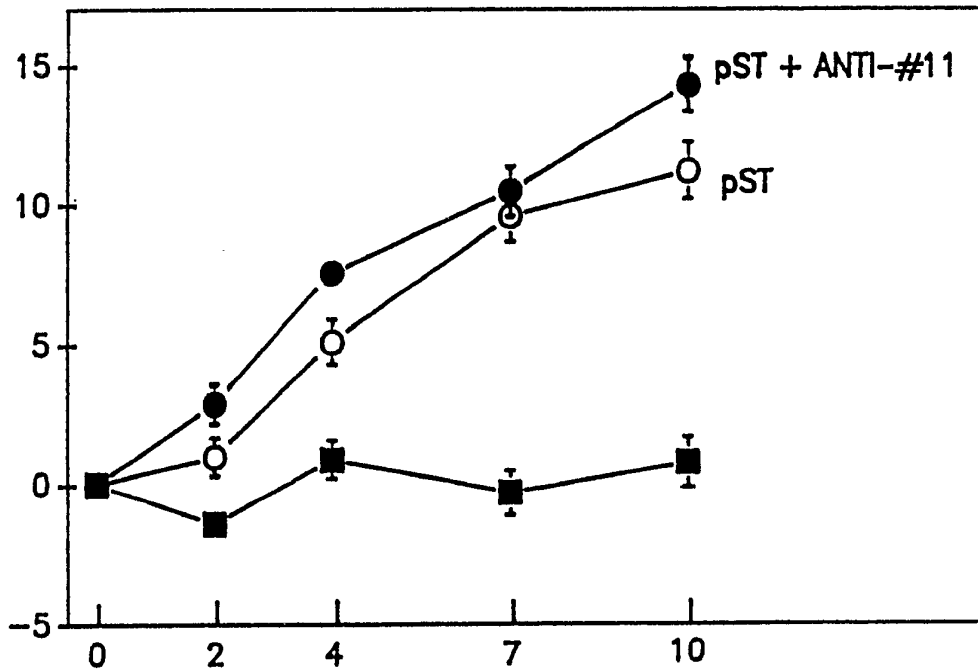
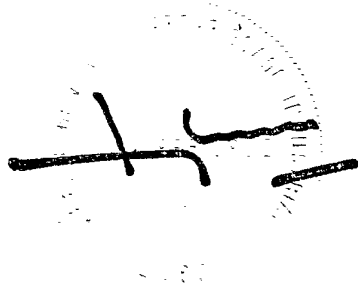


FIG. 7C



Efeito do anticorpo de suino no crescimento de ratos hipofissectonizados

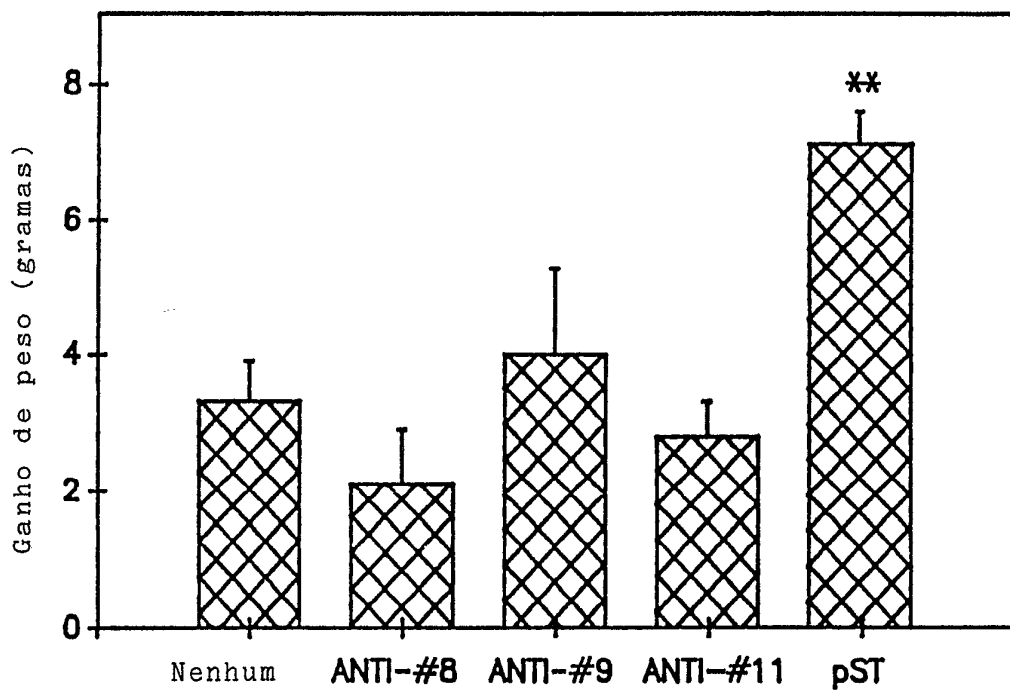
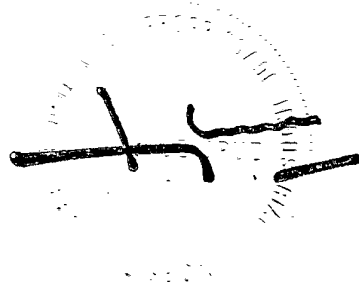
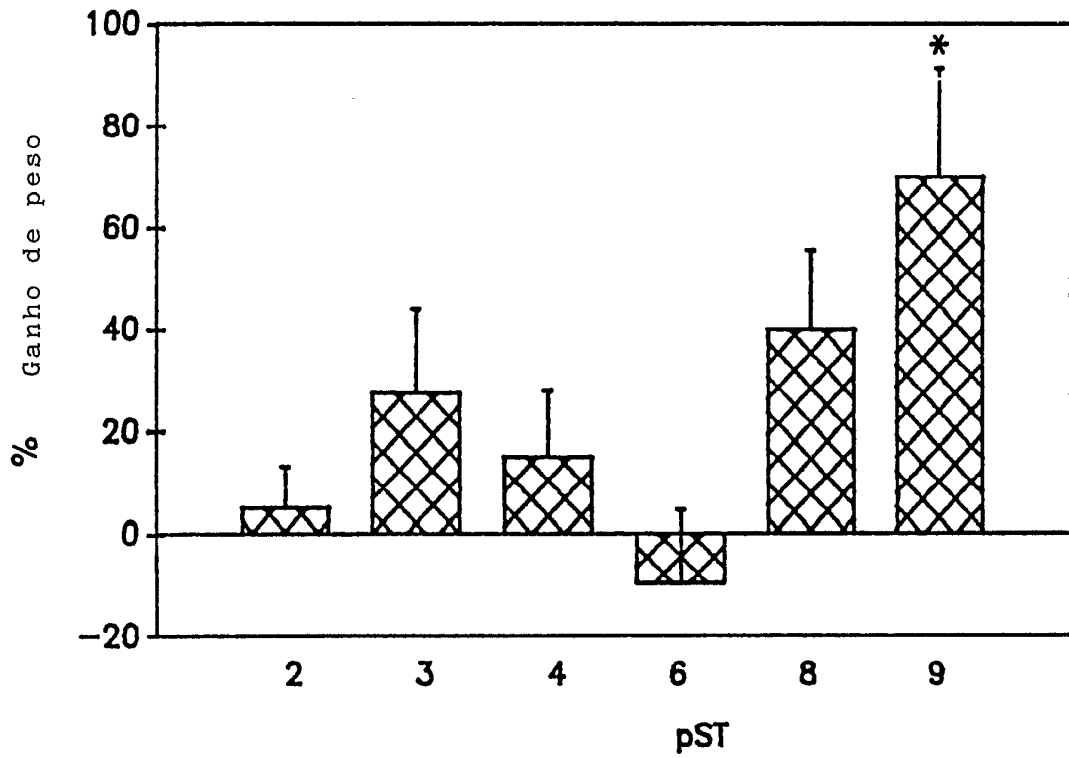


FIG. 8



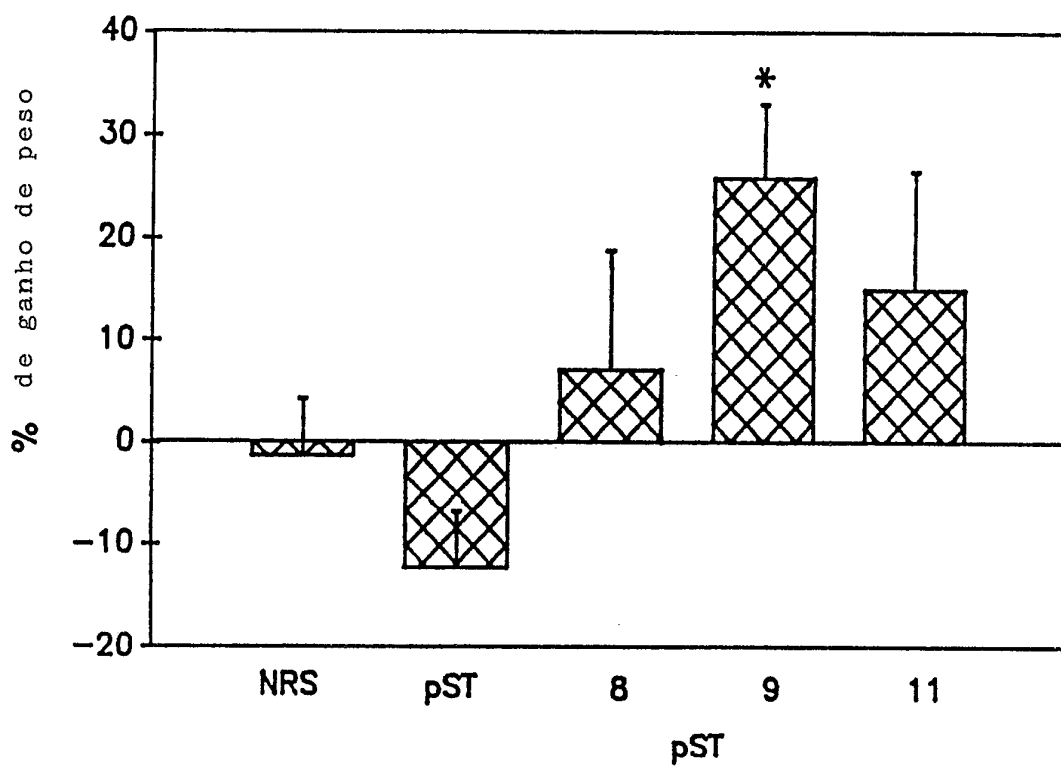
Efeito de anticorpo de coelho n o crescimento
de ratos hipofisectonizados



Anticorpo do coelho contra peptídeo pST

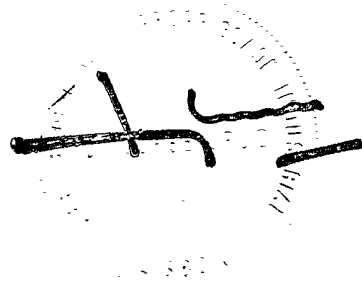
FIG. 9

Efeito de anticorpo de coelho no crescimento
de ratos hipofissectonizados



Anticorpo de coelho contra o peptídeo pST

FIG. 10



Efeito de anticorpo de coelho no
crescimento de ratos hipofissectonizados

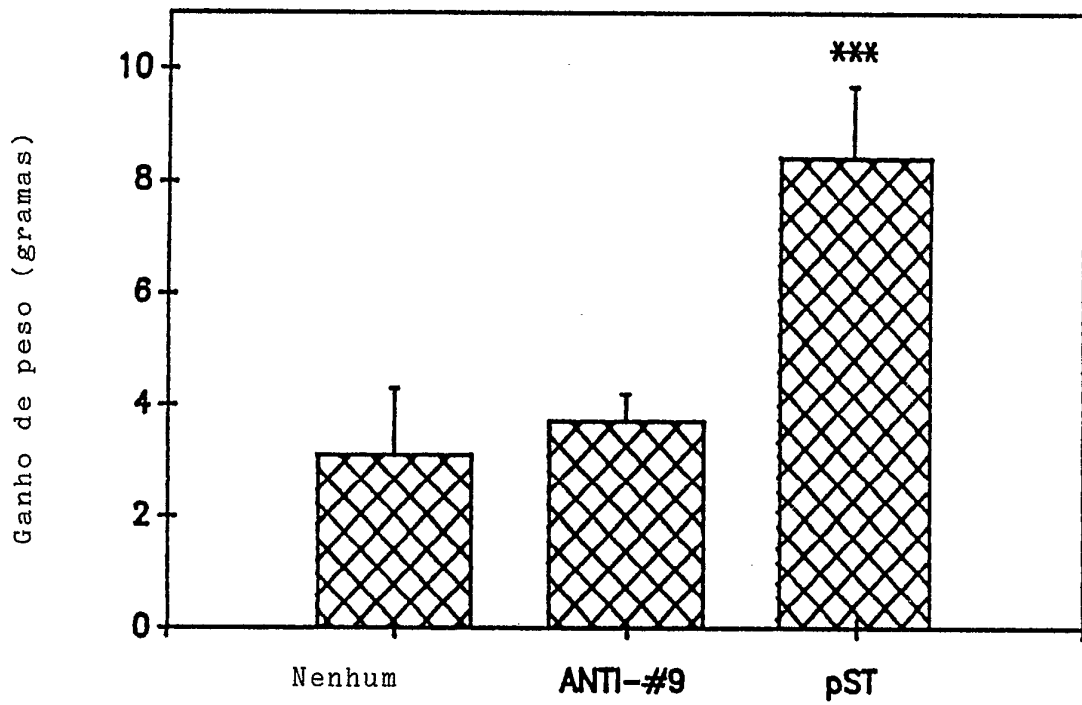


FIG. 11