

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 98.106

REQUERENTE: CIBA-GEIGY AG., suíça, industrial, com
sede em Klybeckstrasse 141, 4002 Basel - SUIÇA

EPÍGRAFE: ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ESPÉCIES
DE MYCOSPHAERELLA E LINHAS CELULARES DE HIBRIDOMA QUE OS
PRODUZEM"

INVENTORES: FRANK PETER PETERSEN; MARCK DANIEL CLYMER;
SALLY ANN MILLER; JAMES HARLEY RITTENBURG e GARY DAVID
GROTHAUS

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883. 29 de Junho de 1990 sob o No.
546.341 nos E.U.A.

95.106


CIBA-GEIGY AG

"ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ESPÉCIES DE MYCOSPHAERELLA E
LINHAS CELULARES DE HIBRIDOMA QUE OS PRODUZEM"

=====

MEMORIA DESCRITIVA

RESUMO

O presente invento diz respeito a anticorpos monoclonais que reagem especificamente com membros do género Mycosphaerella e hibridomas que produzem tais anticorpos. O invento é ainda dirigido a um método para produzir uma linha celular de hibridoma que produz anticorpos monoclonais que reagem especificamente com pelo menos uma espécie de Mycosphaerella e um método para obtenção de anticorpos monoclonais a partir dela. Estão também dentro do âmbito do invento métodos e equipamentos ("kits") para o diagnóstico de infecções por Mycosphaerella em material vegetal usando tais anticorpos monoclonais.

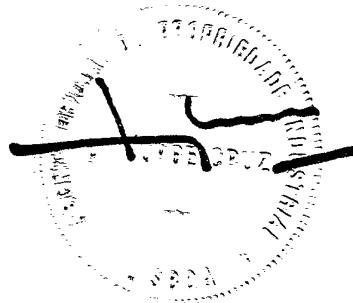
O presente invento está relacionado com o campo do diagnóstico da patologia vegetal. Mais especificamente, o invento está relacionado com anticorpos monoclonais úteis na detecção de espécies do gênero de fungos patogênicos Mycosphaerella. Uma das espécies de Mycosphaerella contra a qual foram feitos anticorpos monoclonais, nomeadamente M. graminicola, é mais vulgarmente conhecido pelo nome do seu anamorfo (fase assexuada) Septoria tritici.

Fungos patogênicos

Os fungos como um grupo podem causar muitas doenças em plantas. Para fins de discussão os fungos podem ser classificados como pertencentes a uma das três classes taxonômicas principais: Basidiomicetes, Ficomicetes ou Ascomicetes.

Basidiomicetes

Os membros desta classe são identificados pela presença de uma estrutura sexuada formadora de esporos conhecida como um basídio. As formas patogênicas incluem ferrugens, fuligens e espécies carnudas tais como cogumelos. Exemplos incluem ferrugem do trigo, pústulas do pinheiro branco, ferrugem da pinha do cedro e fuligens causadoras de doenças em milho, cevada, aveia, cebolas e trigo.



Ficomicetes

Os membros desta classe são considerados mais primitivos do que os membros dos Ascomicetes ou dos Basidiomicetes, a característica morfológica que os distingue sendo a ausência de septos no micélio. Exemplos de doenças causadas por membros da classe incluem mildios radicular da videira e outros hospedeiros, podridão da raiz e emurchecimento da batateira e do tomateiro.

Ascomicetes

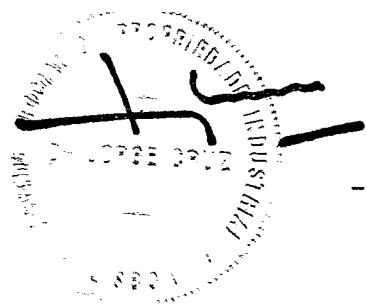
Os membros desta classe possuem uma estrutura reprodutora especializada (um asco) em que a meiose e a formação sexuada de esporos têm lugar. Exemplos das doenças de plantas mais comuns em que os Ascomicetes foram identificados como o agente etiológico incluem: mildios pulverulentos nos cereais, frutos e muitos cultivares; doença do ulmeiro holandês; cravagem das sementes; podridão castanha do pessegueiro e da ameixeira; manchas negras das roseiras assim como pedrado da maçã.

Patogénios Mycosphaerella

Relativamente ao presente invento são de particular interesse os membros da família Dothidiaceae e particularmente o género Mycosphaerella. O género é constituído por cerca de 1000 espécies, muitas das quais são patogénios para as plantas de grande importância económica. Uma compilação recente dos fungos patogénicos para as plantas na U.S enumera 258 espécies de

Mycosphaerella como patogênicos de plantas [Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P. & Rossman, A. 1989, Fungi on Plant and Plant Products in the United States, APS Press, Minneapolis: 1252 pp.]. O corpo de frutificação de Mycosphaerella é um pseudotécio ostiolado periticióide contendo oito ascósporos de duas células contidos em ascos bitunicados. Em muitos casos os ascósporos são o mecanismo primário da sobrevivência das espécies patogênicas de Mycosphaerella na ausência de uma planta hospedeira susceptível ou em condições ambientais desfavoráveis. Os ascósporos muitas vezes também servem como fonte primária de inóculo num cultivar hospedeiro. Muitas das espécies de Mycosphaerella também produzem fases assexuadas conidiais (anamorfos); os conídios podem ser transportados dentro de picnidios, acérvulos ou em conidióforos livres. Em muitos casos a fase de conídios é muitas vezes encontrada na natureza. A fase de conídios é geralmente classificada separadamente da fase sexuada com base na morfologia. Assim, as espécies no gênero Mycosphaerella têm fases conidiais classificadas como uma série de diferentes gêneros dos Fungos Imperfeitos. Por exemplo, a fase conidial de M. graminicola é Septoria tritici, enquanto que a fase conidial de uma outra espécie de Mycosphaerella, M. fijiensis, é Paracercospora fijiensis. Vários outros exemplos incluem: M. musicola (Pseudocercospora musae); M. fragariae (Ramularia brunnea); M. pinodes (Ascochyta pinodes); M. tabifica (Phoma betae); M. tassiana (Cladosporium herbarum).

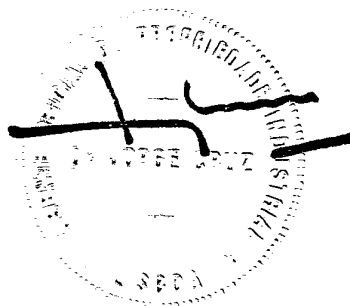
O sistema de classificação das fases assexuadas dos fungos ascomicetes é geralmente considerada como artificial mas continua por razões práticas, uma vez que as fases sexuadas são muitas vezes difíceis de induzir em cultura pura. No entanto, o grau de relacionamento das espécies umas com as outras está reflectido na classificação sexuada; i.e. é mais provável que duas espécies de Mycosphaerella estejam mais estreitamente



relacionadas geneticamente uma com a outra do que duas espécies de Septoria, as quais se baseiam nas semelhanças morfológicas da fase assexuada.

As espécies patogénicas de Mycosphaerella provocam doença nas partes das plantas situadas acima do solo, a maior parte das vezes nas folhas. Os sintomas são lesões que podem englobar uma grande fracção da área da folha em padrões irregulares ou regulares, dependendo do cultivar. Algumas das doenças mais graves e economicamente mais importantes a nível mundial são causadas por espécies de Mycosphaerella e requiere a utilização de variedades resistentes e/ou fungicidas para o controle. Mycosphaerella fijiensis e M. fijiensis var. difformis, os agentes causadores da doença Black Sigatoka (Listagem Preta das Folhas) estão espalhados por áreas de plantações de banana e de crescimento de tanchagem da América Central, provocando consequências económicas significativas como resultado da perda de rendimento ou gastos devido ao controle com fungicidas. Mycosphaerella graminicola, mais vulgarmente conhecida pela sua fase assexuada, Septoria tritici, provoca perdas de rendimento significativas no trigo a nível mundial a menos que seja controlada por fungicidas ou variedades resistentes.

As espécies de Mycosphaerella podem apresentar um período de latência de vários dias a várias semanas após a infecção, durante as quais o patógeno cresce no tecido mas não se produzem os sintomas. Os fungicidas são mais eficazes no controle destas doenças se aplicados durante o período da latência, antes de ocorrer prejuízos significativos são produzidos inóculos que permitirão que a doença se espalhe. No entanto, os tratamentos fungicidas preventivos de rotina não são geralmente justificados economicamente ou em termos ambientais e um sistema que permitisse uma detecção muito precoce destes patógenos, de



preferência durante a fase de latência do desenvolvimento da doença, seria muito útil para assegurar que os fungicidas sejam usados adequadamente e proporcionar benefícios económicos máximos. O presente invento permite que tal sistema seja colocado em prática ao proporcionar anticorpos monoclonais que são capazes de detectar a presença de antigénios Mycosphaerella, permitindo assim o diagnóstico precoce da doença e a prevenção possível das perdas devastadoras na cultura afectada.

Uma série de anticorpos monoclonais foi agora produzida que são capazes de identificar vários patogénios de plantas. Por exemplo, a Patente U.S. Nº 4,845,197 descreve anticorpos monoclonais que são capazes de diagnosticar infecções causadas por fungos na família Pythiaceae. A Patente U.S. Nº 4,803,155 descreve os anticorpos monoclonais que são específicos para fungos membros do género Sclerotinia Patente U.S. Nº 4,879,217 descreve anticorpos monoclonais que são específicos para espécies do género Rhizoctonia.

Até agora não foram descritos anticorpos tendo especificidade para espécies de Mycosphaerella. No entanto, são aqui divulgados anticorpos monoclonais que reagem especificamente com M. fijiensis ou M. graminicola ou que reagem com mais de uma espécie de Mycosphaerella, mas não com outros géneros; estes monoclonais são particularmente úteis para a detecção específica de Mycosphaerella em banana e trigo nas fases iniciais da infecção antes dos sintomas da doença aparecerem.

Assim, o presente invento proporciona hibridomas que produzem anticorpos monoclonais que reagem especificamente com membros do género Mycosphaerella. Numa realização preferida, estes anticorpos reagem com membros da espécie Mycosphaerella fijiensis e/ou Mycosphaerella graminicola. Deverá também notar-se



que os anticorpos monoclonais que reagem com Mycosphaerella são também capazes de reagir com antigénios das fases assexuadas das respectivas espécies, e.g., Septoria tritici (M. graminicola) ou Paracercospora fijiensis (M. fijiensis); e os nomes das fases são usados indiferentemente ao longo do texto e das reivindicações. O invento também engloba hibridomas específicos, os quais têm as características de HB 10413 e 10414, os quais reagem com mais de uma espécie de Mycosphaerella e de HB 10186, que reage especificamente com membros do género Mycosphaerella. Numa realização preferida, estes anticorpos reagem com membros das espécies Mycosphaerella fijiensis e/ou Mycosphaerella graminicola. Deve-se notar que os anticorpos monoclonais que reagem com Mycosphaerella são também capazes de reagir com antigénios da fase assexuada das respectivas espécies, e.g., Septoria tritici (M. graminicola) ou Paracercospora fijiensis (M. fijiensis); e os nomes das fases são usados indofrerentemente através do texto e reivindicações. O invento também engloba hibridomas específicos, os quais têm as características específicas de HB 10413 e 10414, os quais reagem com mais de uma espécie de Mycosphaerella, e de HB 10186 que reage especificamente com Mycosphaerella graminicola, assim como clones e subclones seus.

Por clones e subclones de linhas celulares de hibridomas pretende-se significar hibridomas que resultam da clonagem repetida do clone inicial e que ainda possuem as características do clone inicial que são essenciais para o invento.

São igualmente englobados pelo presente invento mutantes e variantes de cada uma destas linhas celulares que surgem espontaneamente ou ainda que podem ser preparadas artificialmente por métodos conhecidos e que têm ainda as propriedades características do material de partida, ou seja ainda são capazes de



produzir e, de preferência, secretar para o meio os anticorpos de acordo com o invento ou seus derivados.

São também incluídos no presente invento anticorpos monoclonais e seus derivados, que reagem especificamente com membros do género Mycosphaerella. Numa realização preferida estes anticorpos e/ou seus derivados reagem com membros da espécie Mycosphaerella fijiensis e/ou Mycosphaerella graminicola. Deve-se notar também que os anticorpos monoclonais que reagem com Mycosphaerella são também capazes de reagir com antigénios das fases assexuadas específicas de espécie, e.g. Septoria trici (M. graminicola) ou Paracercospora fijiensis (M. fijiensis).

Por derivados de anticorpos monoclonais deve-se entender dentro do âmbito do presente invento, por exemplo, fragmentos de anticorpos que ainda têm uma elevada especificidade e afinidade para membros do género Mycosphaerella, também anticorpos monoclonais que são marcados, por exemplo com iodo radioactivo (^{125}I , ^{131}I), carbono radioactivo (^{14}C), enxofre radioactivo (^{35}S), trício (^3H) ou similares, os conjugados dos anticorpos monoclonais com biotina ou avidina, com enzimas tais como peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, 8-D-galactosidase, glucose-oxidase, glucoamilase, anidrase carbónica, acetilcolinesterase, lisozima, malato-desidrogenase ou glucose-6-fosfato-desidrogenase, ainda conjugados de anticorpos monoclonais agentes bioluminescentes (por exemplo luciferase), quimioluminescente (por exemplo ésteres de acrídínio) ou fluorescentes (por exemplo ficobiliproteínas). Também estão incluídos no presente pedido os anticorpos bi-específicos e os chamados anticorpos ligados de forma cruzada. Esta lista de exemplos de possíveis derivados de anticorpos serve apenas para ilustrar o presente invento e não se destina a limitar de forma alguma o invento.



A disponibilidade destes anticorpos monoclonais proporciona um meio para o diagnóstico de infecções por Mycosphaerella em material vegetal. Assim, é proporcionado um método de diagnóstico de infecções que se caracteriza por pôr uma amostra de planta suspeita de conter antígenos do patógeno com interesse em contacto com um anticorpo tendo especificidade para o patógeno e observação da presença ou ausência de uma reacção entre o anticorpo e o antígeno presente na amostra. Numa realização preferida, o ensaio é realizado como uma sanduíche ou em ensaio com dois anticorpos: um primeiro anticorpo que reage com o patógeno de interesse é colocado em contacto com a amostra vegetal e depois o segundo anticorpo que também reage com o patógeno de interesse é adicionado para formar um complexo anticorpo-antígeno-anticorpo, se o antígeno estiver presente na amostra.

São também proporcionadas composições para a detecção de Mycosphaerella na forma de um kit de diagnóstico que compreende um anticorpo, de preferência imobilizado, o qual reage com a espécie de interesse e um anticorpo marcado de forma detectável que reage com a espécie de interesse. Pelo menos um dos anticorpos deverá ser um anticorpo monoclonal do presente invento e em certas realizações, ambos os anticorpos podem ser monoclonais do presente invento.

O invento proporciona ainda um método para a obtenção de uma linha celular de hibridoma que produz anticorpos monoclonais os quais reagem especificamente com pelo menos uma espécie de Mycosphaerella e um método para a obtenção de anticorpos monoclonais a partir dela.

Os anticorpos monoclonais de acordo com o invento são preparados usando métodos conhecidos per se, os quais baseiam-se



essencialmente nos métodos desenvolvidos por Kohler e Milstein (1975). Os referidos métodos para a produção de anticorpos monoclonais de acordo com o invento também estão incluídos no presente invento.

Os anticorpos produzidos são muito diferentes dos recuperados a partir do anti-soro derivado de animais imunizados convencionalmente. Cada uma das linhas celulares híbridas sintetiza uma imunoglobulina homogênea que representa apenas um da miríada de tipos de anticorpos que um animal pode sintetizar como resposta a um antígeno in vivo. Uma vez que cada um dos clones produtores de imunoglobulina é caracterizado por um único tipo de anticorpo que produz, foi adoptado o termo anticorpo monoclonal.

As vantagens dos anticorpos monoclonais são numerosas:

- a) anticorpos monoclonais podem ser obtidos em grande quantidade e com elevada pureza;
- b) a preparação de anticorpos monoclonais é homogênea relativamente à reactividade do antígeno e permanece assim ao longo do tempo;
- c) os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais podem ser guardados durante anos e décadas sem perderem as suas propriedades específicas, i.e. a produção de anticorpos monoclonais específicos;
- d) os anticorpos monoclonais são mais adequados para usar como reagentes padrão do que os anti-soros policlonais, pois estes últimos são adversamente afectados por uma larga gama de variações relativamente, por exemplo a:

α) a colheita de sangue dos animais imunizados para obtenção do anti-soro,

B) uma disponibilidade constante do material para imunizações adicionais,

Γ) o tempo de vida limitado do animal dador.

O princípio da tecnologia de hibridoma/monoclonal baseia-se na observação de que quando duas células somáticas são fundidas o híbrido resultante apresenta características de ambos os tipos de células parentais. No caso da produção de anticorpos monoclonais, a capacidade para sintetizar o anticorpo particular deriva de uma célula imunocompetente (geralmente uma célula do baço ou um linfócito do sangue periférico) retirada de um animal dador imunizado, enquanto que a capacidade para se dividir continuamente em cultura de tecidos é contribuída pelo outro parceiro de fusão, uma linha de células tumorais (muitas vezes um mieloma). As primeiras fusões foram complicadas pelo facto da linha celular de mieloma também produzir um anticorpo monoclonal; assim o híbrido muitas vezes produzia dois tipos de anticorpo monoclonal, um derivado de mieloma e outro dirigido pela informação genética da célula imunocompetente. Subsequentemente, foram usadas linhas de células tumorais incapazes de produzir o seu próprio monoclonal, e.g., SP2/O-Ag14 ou X63-Ag8.653, simplificando assim a análise dos produtos de fusão resultantes.

Uma outra consideração técnica envolve a selecção de casos de fusão frutuosa (células híbridas) a partir dos dois tipos de células parentais. De rotina um milhão ou mais de células de cada tipo são usados no protocolo de fusão e uma vez que a fusão não ocorre com uma frequência de 100%, o trabalho de tentar recuperar os produtos de fusão a partir do fundo alto de

células parentais não fundidas ou auto-fundidas pode ser enorme. Conforme referido os hibridomas são formados pela fusão de células produtoras de anticorpos de vida curta (baço) e células de mieloma de vida longa. O resultado pretendido é uma linha celular de vida longa que produz anticorpo. Uma vez que as células do baço têm um tempo de vida limitado em cultura pode-se simplesmente esperar um período de tempo adequado até que todas as células do baço não fundidas e auto-fundidas morram; no entanto deve-se recuperar as células imortalizadas produtoras de anticorpos de entre a população resultante contendo células imortais não produtoras de anticorpos. Um meio trivial para a selecção de células híbridas é o chamado sistema de selecção com HAT. Este sistema envolve a utilização da enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase (HGPRT). Esta enzima funciona na via alternativa das purinas nas células de mamífero. Estas células são também capazes de sintetizar purinas de novo. Na maior parte das condições ambas as vias operam provavelmente até certo ponto. Se uma célula não tiver HGPRT, a via alternativa é bloqueada e as purinas devem ser produzidas a partir de materiais que não sejam purinas.

O composto 8-azaguanina é um antimetabolito que é capaz de simular a purina guanina e substituí-la nalgumas das suas reacções normais. Azaguanina é incorporada no DNA, interferindo com o padrão de crescimento normal e conduzindo à morte celular. Uma vez que a azaguanina deve ser salva, qualquer célula que não possua actividade de HGPRT não pode utilizar azaguanina e crescerá na sua presença.

Um sistema selectivo que opera na mesma enzima mas no sentido oposto em que células HGPRT positivas são seleccionadas está descrito por J.W. Littlefield (1964). É chamado HAT e contém hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT). A aminopterina

é um antimetabolito que evita a síntese de novo de purinas e a metilação de desoxiurilato para formar timidilato. A hipoxantina pode servir como uma purina de salvamento no caso da aminopterina bloquear a biossíntese de novo de purinas enquanto a timidina ultrapassa a necessidade da metilação do timidilato. Assim, na presença de aminopterina, qualquer célula com actividade positiva de HGPRT proliferará enquanto as células com actividade negativa de HGPRT morrerão.

Uma alternativa ao sistema HAT é a utilização de meio HMT em vez de HAT. HMT usa ametopterina (metotrexato) em vez de aminopterina. Este método funciona com base nos mesmos princípios, no entanto o meio HMT é menos tóxico para o crescimento de hibridomas e portanto as células podem ser deixadas no meio durante mais tempo.

No sistema híbrido usado para a selecção de acordo com os presentes exemplos, as células de mieloma são resistentes à azaguanina e susceptíveis à ametopterina, ou seja, elas são HGPRT negativas. Assim, elas morrerão na presença de ametopterina. As células produtoras de anticorpos são HGPRT positivas. Ao fundir-se as células e fazendo-as crescer em meio HMT sem azaguanina (meio HT), as células fundidas são seleccionadas pois as células de mieloma que constituem a linha proliferativa podem crescer apenas quando a actividade de HGPRT está presente e esta actividade deve ser fornecida pela linha de células HGPRT positivas. A linha celular HGPRT positiva produtora de anticorpos não é morta neste meio. Elas viverão mais tempo mas não se replicam neste meio.

Assim ao fundir-se as células em meio HAT ou em meio HMT, são produzidos sistemas em que as células de mieloma e as células produtoras de anticorpos podem crescer tempo suficiente

para produzir células híbridas mas em que apenas as células híbridas podem sobreviver e proliferar. Após selecção cada um dos clones de hibridomas é testado relativamente à sua capacidade para produzir o anticorpo particular com interesse.

Numa realização preferida do presente invento Mycosphaerella fijiensis é usada para a preparação de extractos de fungosúteis na produção de anticorpos monoclonais. Em particular pode ser empregue como antigénio micélio finamente cortado (ou um mistura de micélio e conídios cortados) de uma espécie de Mycosphaerella. Os métodos de preparação de tais extractos estão discutidos detalhadamente no Exemplo 1.1.

Os extractos de esporos são também capazes de dar antigénios que induzem anticorpos que reagem com uma ou mais espécies de Mycosphaerella. Tais extractos podem ser feitos a partir de Mycosphaerella graminicola, esporos germinados ou não germinados, se bem que sejam preferidos esporos germinados. Os detalhes do processo de extracção são dados no Exemplo 1.2.

A distinção entre os anticorpos assim produzidos é feita através de um método de rastreio adequado conforme descrito detalhadamente abaixo. Para completar a formulação para inoculação, o extracto de antigénio é preferencialmente combinado com um adjuvante adequado. Os adjuvantes podem ser quaisquer uns dos normalmente usados para esta finalidade; no entanto, foram conseguidos bons resultados usando o adjuvante completo de Freund para a primeira injeccção e adjuvante incompleto para quaisquer injeccções subsequentes.

Os anticorpos descritos nos presentes exemplos foram feitos usando um organismo hospedeiro adequado como seja ratinho como fonte de anticorpo. No entanto, a identidade do animal

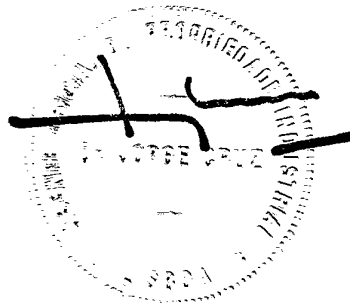
experimental não é crítica e pode ser seleccionado a partir de qualquer um dos animais experimentais normalmente usados com este fim, tais como ratos, coelhos ou cabras.

O programa para a inoculação não é crítico e pode ser qualquer um normalmente usado com esta finalidade no campo. Tais processo estão descritos, por exemplo, em Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, New York, 1983.

Um programa útil é aquele em que é dada uma primeira imunização intraperitonealmente, do antigénio combinado com um adjuvante adequado. São dadas injeções de reforço com intervalos de duas semanas. Podem ser administradas duas ou mais injeções de reforço. Os animais são sangrados na cauda para determinar se o soro contem anticorpos específicos para o antigénio com interesse. O animal é subsequentemente morto e o baço removido para proporcionar uma fonte de linfócitos.

Os processo de fusão para a criação de hibridomas são bem conhecidos e qualquer um dos processos conhecidos é útil para a produção de hibridomas produtores de monoclonais específicos de Mycosphaerella. O processo básico usado nos presentes exemplos é uma modificação do desenvolvido por Kohler e Milstein (1975) e Hammerling (1977).

Para resumir rapidamente um processo que se mostrou eficaz, células do baço (ou como alternativa linfócitos do sangue periférico) são isoladas a partir do animal imunizado e contado o número de células. As células T usadas como camada de sustentação numa concentração de 10 milhões de células/10 ml de meio foram usadas com êxito. Uma linha celular imortal adequada, de preferência é seleccionada uma linha celular de mieloma e adicionada

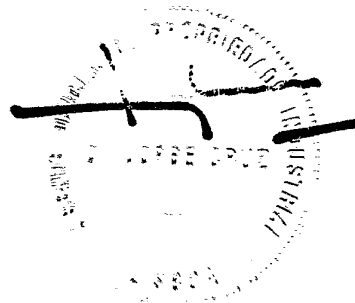


aos linfócitos numa proporção de cerca de 4:1 linfócitos:mieloma. Uma linha celular útil é uma linha celular seleccionada do grupo constituído por NS-1, SP2/O-Ag14 (Shulman et al., 1978) ou a linha celular de mieloma X63-Ag8.653.

Um meio de fusão preferido é uma solução tampão que contem um dos promotores de fusão normalmente usado para a fusão de células, tais como, por exemplo, vírus Sendai ou outros para mixovírus, sempre que adequado na forma inactivada por UV, iões cálcio, lípidos tensio-activos tais como por exemplo, lisolecitina ou polietilenoglicol. Dentro do âmbito deste invento é particularmente preferido o uso de polietilenoglicol (PEG), de preferência polietilenoglicol (PEG) com um peso molecular médio de 600 a 6000, especialmente de 1500 e numa concentração de 30% a 60%. Uma concentração de PEG de 40% - 50% é particularmente preferido. A temperatura de fusão óptima está entre 18°C e 39°C. É preferida a temperatura ambiente.

Após adição de polietilenoglicol para combinar as células, a mistura de reacção foi diluída lentamente com DMEM. Após centrifugação, meio HMT previamente aquecido foi adicionado ao sedimento que é ressuspenso. A amostra foi ainda diluída com meio HMT (ver Exemplo 1 para a composição) e pequenas amostras distribuídas pelas cavidades de uma placa de microtitulação. As placas foram então colocadas numa incubadora de CO₂, preferencialmente numa incubadora de 9% CO₂ com pelo menos 95% de humidade. As células foram novamente alimentadas com meio HMT após cerca de 5-7 dias. Conjuntos de células de hibridoma começam a aparecer após cerca de 5-7 dias. Foi posteriormente adicionado mais meio HT.

O processo atrás resumido brevemente para a preparação de uma linha celular de hibridoma de acordo com o invento pode



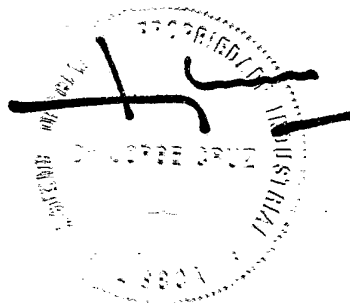
representa apenas uma realização preferida do presente invento mas não deve ser pensado como limitante.

Os clones de células de hibridoma de acordo com o invento preparados como descrito foram testados quanto à produção de anticorpos monoclonais adequados de preferência usando um dos imunoenaios convencionalmente usados com este fim, tais como, por exemplo, um imunoensoio acoplado a enzima ou radio-imunoensoio.

Em particular, os hibridomas produtores de anticorpos contra Mycosphaerella foram identificados usando material de fungos da espécie particular com interesse, por exemplo, micélio, conídios ou esporos germinados num formato de ELISA. Em particular, o material de micélio é uma fonte útil de M. fijiensis, enquanto que os conídios germinados são material útil de M. graminicola. As cavidades apresentando respostas positivas na ELISA foram subclonados para seleccionar estirpes puras de células de hibridoma. As linhas subclonadas foram novamente testadas relativamente à actividade específica de anticorpos contra os componentes fúngicos.

Para determinar o grau de especificidade dos anticorpos seleccionados, é desejável testá-los ainda contra um painel de fungos patogénicos que pode estar relacionado ou não com Mycosphaerella. Por exemplo, para obter um anticorpo específico de Mycosphaerella graminicola os anticorpos seleccionados deverão ser testados contra outras espécies de Mycosphaerella, assim como contra espécies mais distantes ou mesmo não relacionadas.

Exemplos de painéis primários úteis para os fins do presente invento estão apresentados nas Tabelas 1 e 4. É geralmente recomendado fazer o rastreio no formato de anticorpo



simples e duplo, pois certos anticorpos podem ser úteis num formato mas não noutro.

Uma outra realização do presente invento compreende assim um método para a preparação de uma linha celular de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que reage especificamente com pelo menos uma espécie do género Mycospaherella, método esse que se caracteriza por:

- (a) imunização de um animal dador com um extracto de Mycospaherella;
- (b) isolamento de células imunocompetentes a partir do animal dador imunizado;
- (c) fusão das células B com células de uma linha celular imortal;
- (d) rastreio dos produtos de fusão e identificação dos que produzem anticorpos tendo especificidade para Mycospaherella;
- (e) clonagem do produto de fusão isolado no passo (d) para obter uma linha celular de hibridoma pura que produz um anticorpo monoclonal tendo especificidade para Mycospaherella.

Também estão englobados no presente invento métodos para a preparação de anticorpos monoclonais. Em particular, estes métodos de preparação de anticorpos monoclonais são caracterizados por as linhas celulares de acordo com o invento que foram caracterizadas detalhadamente antes, ou outros clones ou subclones, que sintetizam e preferencialmente secretam para o meio circundante os anticorpos de acordo com o invento são cultivados in vitro ou in vivo por meio de métodos conhecidos.

A cultura in vitro das células de hibridoma de acordo com o invento é preferencialmente realizado em meio de cultura adequado, especialmente nos meios de cultura convencionais normalmente usados tais como, por exemplo, meio de Eagle



modificado por Dulbecco (DMEM) ou meio RPMI 1640, cada um deles pode ser suplementado sempre que adequado pela adição de soro de mamífero tal como, por exemplo, soro fetal de vitela ou pela adição de aditivos promotores do crescimento e micronutrientes.

O isolamento dos anticorpos monoclonais preferencialmente começa com a precipitação da fracção de imunoglobulina a partir dos sobrenadantes particulares das culturas de hibridoma, por exemplo usando sulfato de amónio. Isto é seguido de posterior manipulação e passos de purificação que são conhecidos dos familiarizados com a matéria e que incluem, por exemplo, a utilização de métodos cromatográficos tais como, por exemplo, filtração em gel, cromatografia de permuta iónica, cromatografia em DEAE-celulose, cromatografia em proteína A ou cromatografia de imunoafinidade.

No entanto, é também possível obter grandes quantidades dos anticorpos monoclonais de acordo com o invento usando métodos in vivo.

Assim, por exemplo é possível injectar clones de células de hibridoma produtoras de anticorpos, que induzem o desenvolvimento de tumores produtores de anticorpos nos animais tratados. Após um período de 1 a 3 semanas, os anticorpos podem ser isolados a partir dos fluídos de animais tratados desta forma.

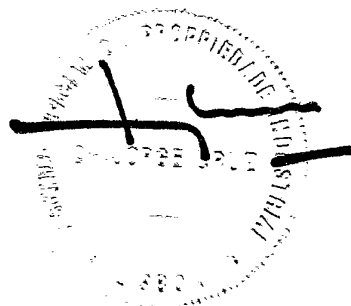
Numa realização particular do presente invento, murganhos Balb/c fêmeas que foram pré-tratados, sempre que adequado, com um hidrocarboneto tal como, por exemplo, pristano recebeu injeccção peritoneal de um clone celular de hibridoma de acordo com o invento. Uma a três semanas após a injeccção o clone de

células de hibridoma do fluido ascítico foi colhido e guardado até ser utilizado.

Os anticorpos monoclonais foram isolados de forma exactamente análoga ao isolamento descrito a partir dos sobrenadantes de hibridomas cultivados in vitro.

Uma série de anticorpos que caem dentro do âmbito de uma ou outra das reivindicações foi produzida pelo processo aqui descrito. Mais de um anticorpo dos inicialmente seleccionados pode ser produzido em cada fusão e rastreio; no entanto, certos anticorpos foram mereceram especial atenção pelo seu alto nível de especificidade e/ou pela sua sensibilidade em certos formatos de ensaio. Entre os anticorpos preferidos para a identificação de Mycosphaerella estão os produzidos pelos hibridomas Mf1 4C6 e Mfd1 8E6. O hibridoma Mf1 4C6 produz um anticorpo tendo um nível elevado de especificidade para espécies de Mycosphaerella, com reactividade cruzada observada apenas com a espécie muito distantemente relacionada Rhizopus stolonifer. Esta propriedade não interfere com a utilidade dos anticorpos na detecção de Mycosphaerella; ainda, MF14C6 é muito sensível num formato duplo de anticorpos. O anticorpo Mfd1 8E6 apresenta uma boa reactividade com várias espécies de Mycosphaerella e nenhuma reactividade cruzada com espécies de outros géneros. Estes anticorpos são da subclasse de imunoglobulina IgG1.

Relativamente a M. graminicola, especificamente o hibridoma Mg37B5 secreta anticorpos da subclasse IgG3 que são altamente específicos e sensíveis para M. graminicola. No entanto, como se pode ver na Tabela 1, outros anticorpos tendo estas características também foram produzidos.



Exemplos de hibridomas produtores de cada um destes tipos de anticorpos foram depositados, nos termos do tratado de Budapeste, na American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, USA e foi-lhes dado os números de acesso:

<u>Hibridoma</u>	<u>Especificidade</u>	<u>Nº de Acesso</u>
Mf14C6-E8	espécies de <u>Mycosphaerella</u>	HB 10413
Mfd18E6	espécies de <u>Mycosphaerella</u>	HB 10414
Mg37B5	<u>Mycosphaerella graminicola</u>	HB 10186

Deve-se entender que os depósitos acima foram feitos apenas com a finalidade de exemplificação e as presentes reivindicações não devem ser pensadas como sendo limitantes.

Os familiarizados com a matéria reconhecerão facilmente que anticorpos semelhantes podem ser produzidos por repetição dos processos atrás descritos.

O presente invento está ainda relacionado com a utilização dos anticorpos de acordo com o invento num dos imunoensaios convencionais para detecção de espécies dos fungos patogénicos do género Mycosphaerella.

Como se mostra acima, os patogénios em questão são capazes de provocar danos graves às plantas que são infectadas por eles e o diagnóstico precoce é pois altamente desejável. Os presentes anticorpos proporcionam agora um método pelo qual os patogénios podem ser detectados no material vegetal antes de aparecerem quaisquer sintomas visíveis da doença na planta.

Os anticorpos descritos atrás podem ser usados como reagentes básicos de uma série de imunoensaios diferentes para determinar a presença de uma espécie particular no material



vegetal. De um modo geral falando, os anticorpos podem ser empregues em qualquer tipo de imunoensaio, quer qualitativos quer quantitativos. Isto inclui ensaios de um único sítio e de dois sítios, ou sanduíche, do tipo não competitivo, assim como ensaios de ligação competitivos tradicionais.

É particularmente preferido, por facilidade de detecção e sua natureza quantitativa, o ensaio em sanduíche ou de dois anticorpos, do qual existe uma série de variações, todas elas destinando-se a serem englobadas pelo presente invento.

Por exemplo num ensaio típico, anticorpo não marcado é imobilizado num suporte sólido e a amostra a ser testada colocada em contacto com a molécula ligada. Após um período de tempo adequado suficiente para permitir a formação de um complexo binário de anticorpo-antigénio, um segundo anticorpo, marcado com uma molécula repórter capaz de induzir um sinal detectável, é então adicionado e incubado, deixando tempo suficiente para a formação de um complexo ternário de anticorpo-antigénio-anticorpo marcado. Qualquer material que não tenha reagido é removido por lavagem e a presença do antigénio determinada pela observação de um sinal ou pode ser quantificada por comparação com uma amostra testemunha contendo quantidades conhecidas de antigénio. Variações deste ensaio incluem o ensaio simultâneo, em que a amostra e o anticorpo são adicionados simultaneamente ao anticorpo ligado ou um ensaio reverso em que o anticorpo marcado e a amostra a ser testada são primeiro combinados, incubados e adicionados ao anticorpo não marcado ligado à superfície. Estas técnicas são bem conhecidas dos familiarizados com a matéria e a possibilidade de pequenas alterações será facilmente aparente. Tal como aqui é usado "ensaio sanduíche" destina-se a englobar todas as variações da técnica de dois sítios básica.



Para os imunoensaios do presente invento, o único factor limitante é que pelo menos um anticorpo tenha a especificidade necessária. Assim, um número de combinações são possíveis. Por exemplo, um anticorpo pode ser policlonal e o outro monoclonal. Como alternativa, um anticorpo pode ser um anticorpo geral, que se liga ao patógeno com interesse e a outros fungos, enquanto que o segundo anticorpo é específico para o patógeno com interesse. Também ambos os anticorpos podem ser específicos para o patógeno com interesse.

Como um exemplo mais específico, num ensaio sanduíche típico, um anticorpo geral que se liga a Mycosphaerella é ligado covalentemente ou passivamente a uma superfície sólida.

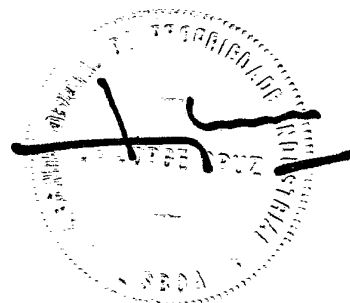
Exemplos de material de suporte sólido adequados para ligação do antígeno ou do anticorpo são superfícies de plástico de uma placa de microtitulação ou de um tubo de ensaio, a superfície de esferas de polistireno, polipropileno, cloreto de polivinilo, vidro ou plástico ou ainda a superfície de tiras de papel de filtro, dextrano, celulose ou nitrocelulose ou materiais semelhantes. Estes últimos são revestidos com um dos anticorpos monoclonais de acordo com o invento ou com um antígeno, sendo possível para a ligação ao material do suporte apenas a simples adsorção ou ainda, sempre que adequado, após activação do material do suporte como, por exemplo, glutaraldeído ou brometo de cianogénio.

A superfície sólida preferida é geralmente vidro ou um polímero, os polímeros mais normalmente usados sendo a celulose, poliacrilamida, nylon, polistireno, cloreto de polivinilo ou polipropileno.

Os materiais de suporte específicos atrás referidos podem ter uma variedade de modelos e dependendo do fim particular a que se destina, tipos diferentes de formas. Estas podendo ser por exemplo, placas, esferas, varetas, células, ampolas, tubos, fibras, redes, esferas, discos ou microplacas, ou qualquer outra superfície adequada para a realização de um imunoensaio.

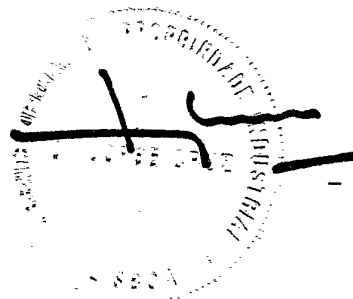
Os processos de ligação são bem conhecidos. Após a ligação, o complexo fase sólida-anticorpo é lavado na preparação para a amostra a testar. Uma amostra do extracto vegetal a ser testado é então adicionada ao complexo na fase sólida e incubado a uma temperatura adequada, de preferência a 25°C, durante um período de tempo suficiente para permitir a ligação de qualquer Mycosphaerella presente ao anticorpo. O período de incubação poderá variar mas será em geral cerca de 2 minutos a 16 horas. Após o período de incubação, o anticorpo-Mycosphaerella-fase sólida é lavado e seco, incubado com um segundo anticorpo específico para Mycosphaerella. O segundo anticorpo é ligado a um molécula repórter, o sinal visível da qual é usado para indicar a ligação do segundo anticorpo a qualquer antigénio na amostra. Por "molécula reporter", como usado na presente especificação e reivindicações, pretende-se significar uma molécula que pela sua natureza química, proporciona um sinal detectável analiticamente que permite a detecção do anticorpo ligado ao antigénio. A detecção deve ser pelo menos relativamente quantificável, para permitir a determinação da quantidade de antigénio na amostra, isto pode ser calculado em termos absolutos ou pode ser feito por comparação com um padrão (ou série de padrões) contendo um nível normal conhecido de antigénio.

As moléculas repórter mais vulgarmente usadas neste tipo de ensaio são moléculas contendo enzimas, fluoróforos ou radionuclidos. No caso de um imunoensaio com enzima, uma enzima é



conjugada com o segundo anticorpo, muitas vezes por meio de glutaraldeído ou periodato. Como será facilmente reconhecido, no entanto, existe uma grande variedade de diferentes técnicas de conjugação, as quais são bem conhecidas dos familiarizados com a matéria. Enzimas normalmente usadas incluem peroxidase de rábano silvestre, glucose-oxidase, B-D-galactosidase e fosfatase alcalina, entre outras. Os substratos a serem usados com as enzimas específicas são geralmente escolhidos pela produção, quando da hidrólise pela correspondente enzima, de uma mudança de cor detectável. Por exemplo, p-nitrofenilfosfato é adequado para usar com conjugados de fosfatase alcalina; para conjugados de peroxidase, normalmente usa-se 1,2-fenilenodiamina ou tolidina. É também possível empregar substratos fluorogênicos, os quais dão um produto fluorescente ao contrário dos substratos cromogênicos referidos atrás. Em todos os casos, o anticorpo específico de antígeno marcado com enzima é adicionado ao complexo primeiro anticorpo-Mycosphaerella, deixado ligar ao complexo, depois o excesso de reagente é removido por lavagem. Uma solução contendo o substrato adequado é então adicionada ao complexo terciário de anticorpo-antígeno-anticorpo marcado. O substrato reage com a enzima ligada ao segundo anticorpo, dando um sinal visual qualitativo, o qual pode ser ainda quantificado, geralmente espectrofotometricamente, para dar uma avaliação da quantidade de antígeno que está presente na amostra de soro.

Como alternativa, os compostos fluorescentes, tais como fluoresceína e rodamina, podem ser acoplados quimicamente a anticorpos sem alterar a sua capacidade de ligação. Quando activados por iluminação com luz de um comprimento de onda particular, o anticorpo marcado com fluorocromo absorve a energia luminosa, induzindo um estado de excitação na molécula, seguido da emissão da luz num comprimento de onda característico. A emissão aparece com uma cor característica visualmente detectável

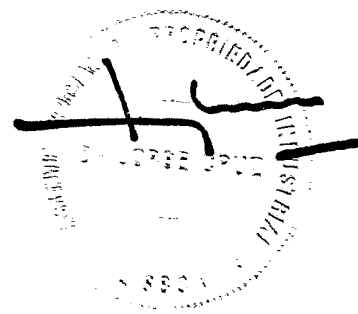


com um microscópio de luz. Tal como em EIA, o anticorpo específico marcado com a marca fluorescente PLF liga-se ao complexo primeiro anticorpo-ferritina. Após lavagem do reagente não ligado, o restante complexo ternário é então exposto à luz do comprimento de onda adequado e a fluorescência observada indica a presença com interesse.

As técnicas de imunofluorescência e EIA estão ambas muito bem estabelecidas e são particularmente preferidas para o presente método. No entanto, outras moléculas repórter, tais como radioisótopos, quimioluminescência de moléculas bioluminescentes podem igualmente ser empregues. Será facilmente aparente para os que estão dentro da área como variar o processo para o adaptar à utilização que se pretende.

O presente invento está ainda relacionado com meios para a determinação qualitativa e quantitativa de Mycosphaerella na forma de um kit de teste que pode, para além dos anticorpos monoclonais de acordo com o invento e/ou seus derivados, conter, sempre que adequado, outros anticorpos monoclonais ou policlonais, mas especialmente anticorpos ou policlonais e outros aditivos.

Dentro do âmbito deste invento são particularmente preferidos kits de testes baseados nos imunoensaios normalmente usados seleccionados do grupo constituído por radioimunoensaio, imunoensaio acoplado a enzima e ensaio de quimioluminescência. São muito particularmente preferidos kits de testes em que a detecção de Mycosphaerella se baseia num imunoensaio competitivo, mas especialmente num imunoensaio directo ou indirecto acoplado a enzima (ELISA).



Os kits de testes para a detecção radioimunológica de Mycosphaerella, pode conter, por exemplo, os seguintes constituintes:

- (a) um material de suporte adequado que pode estar revestido ou não com um dos anticorpos de acordo com o invento ou com um conjugado de antigénio;
- (b) sempre que adequado soluções liofilizadas ou concentradas de um dos anticorpos de acordo com o invento e/ou um seu derivado marcado radioactivamente ou antigénio marcado radioactivamente ou soluções normalizadas do antigénio;
- (c) soluções tampão e
- (d) sempre que adequado polipeptídeos, detergentes e outros aditivos que, por exemplo, evitam adsorção inespecífica e formação de agregados e
- (e) pipetas, vasos de reacção, gráficos de calibração, divisórias da embalagem etc.

Os kits de testes para a detecção imunológica de Mycosphaerella baseados num imunoensaio acoplado a enzimas (ELISA) pode conter, por exemplo, os seguintes constituintes:

- (a) um material de suporte adequado que pode revestida ou não com um dos anticorpos de acordo com o invento ou com um conjugado de antigénio;
- (b) sempre que adequado soluções liofilizadas ou concentradas de um dos anticorpos de acordo com o invento e/ou de um segundo anticorpo monoclonal ou policlonal marcado com enzima que é dirigido contra o antigénio a ser determinado ou contra um anticorpo que reconhece o antigénio;
- (c) substratos de enzimas na forma sólida ou dissolvida;
- (e) o antigénio ou soluções normalizadas do antigénio;



- (f) soluções tampão;
- (g) sempre que adequado polipeptídeos, detergentes e ainda aditivos que, por exemplo, evitam adsorção inespecífica e formação de agregados e
- (h) pipetas, vass de reacção, gráficos de calibração, tabelas de cor, divisórias da embalagem etc.

Um kit de testes para a detecção de Mycosphaerella que se baseia num teste de quimioluminescência pode conter, por exemplo, os seguintes constituintes:

- (a) um material de suporte adequado que pode ser ou não revestido com um dos anticorpos de acordo com o invento ou com um conjugado de antigénio;
- (b) sempre que adequado soluções liofilizadas ou concentradas de um dos anticorpos de acordo com o invento e de um segundo anticorpo policlonal que é capaz de reconhecer o primeiro anticorpo de acordo com o invento e está ligado a uma marca quimioluminescente;
- (c) soluções contendo um componente que induz a emissão de luz, como seja, por exemplo, H_2O_2 e NaOH;
- (d) soluções tampão;
- (e) sempre que adequado polipeptídeos, detergentes e ainda aditivos que evitam a adsorção inespecífica e a formação de agregados e
- (f) pipetas, vasos de reacção, divisórias da embalagem etc.

Os materiais de suporte que podem ser usados dentro do âmbito do presente invento essencialmente compreendem materiais poliméricos insolúveis seleccionados do grupo constituído por polistireno, polietileno, polipropileno, poliésteres, poliacrilonitrilo, cloreto de polivinilo, poliacrilamida, nitrocelulose,



dextrano inter-ligado, resinas fluoradas, agarose, agarose interligada, polissacáridos etc. No entanto, para além destes podem ser concebidos outros materiais tais como por exemplo, vidro, metal, rede baseada em nylon, etc.

Os materiais de suporte específicos atrás referidos podem ter uma larga variedade de modelos e dependendo do uso particular a que se destina, muitos tipos diferentes de formas. Estas últimas compreendem por exemplo, placas, esferas, folhas, varetas, células, ampolas, tubos, fibras, redes, etc.

São frequentemente usados para a produção de kits de testes, por exemplo, placas de microtitulação feitas de materiais plásticos transparentes tais como, por exemplo, cloreto de polivinilo ou polistireno, que podem ser revestidos ou não com um dos anticorpos de acordo com o invento, com antigénio livre ou com um conjugado de antigénio. São também usadas esferas, tubos ou varetas de polistireno e polistireno latex, neste caso o material latex resultante pode ser separado das partículas de polistireno por centrifugação.

Um outro componente do kit de testes de acordo com o invento compreende marcas ou indicadores que torne possível detectar a presença de uma reacção de formação de complexos, mas especialmente de uma reacção imunológica, que preferencialmente resulta num complexo antigénio-anticorpo ou ainda num complexo ligando-receptor, neste caso sempre que adequado informação quantitativa, para além da qualitativa, pode ser obtida relativamente ao antigénio a ser detectado. Marcas ou indicadores adequadas podem ser átomos isolados e moléculas, as quais podem estar envolvidas directa ou indirectamente na geração de um sinal detectável. Estas marcas ou indicadores podem estar ligados directamente ao antigénio a ser detectado ou a um dos anticorpos

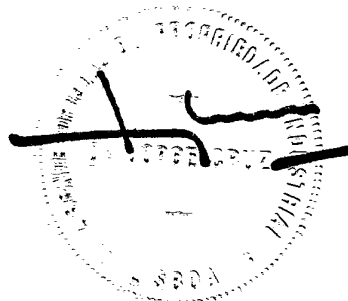


monoclonais do invento, ou ainda incorporados nestes últimos. No entanto, eles podem também estar na forma de substâncias simples ou de um componente de um composto separado que não é ele próprio o antigénio a ser detectado nem um dos anticorpos monoclonais de acordo com o invento mas que por sua vez é capaz de reagir com a molécula receptora, por exemplo na forma de uma formação de complexo.

Estes compostos separados preferencialmente tomam a forma de uma segunda molécula de anticorpo que pode ser de origem monoclonal e policlonal, de uma proteína do complemento ou seus fragmentos, de proteína A de S. aureus, etc. Estes compostos separados reconhecem e ligam-se especificamente a uma molécula receptor tal como, por exemplo, o antigénio a ser detectado ou um dos anticorpos monoclonais de acordo com o invento, mas preferencialmente a uma molécula receptor que está presente na forma de um complexo. Em muitos casos existe a necessidade de outros reagentes que conduzam a um sinal detectável apenas em cooperação com a marca. Isto aplica-se particularmente quando estão envolvidas enzimas.

Marcas ou indicadores que podem ser usados dentro do âmbito do presente invento são bem conhecidos dos familiarizados com a área da imunologia e imunoquímica. Eles compreendem por exemplo, elementos ou substâncias marcados radioativamente, enzimas ou substâncias quimioluminescentes. A lista que se segue de possíveis marcas ou indicadores destina-se meramente a estas ilustrarem a grande variedade de substâncias e reagentes que podem ser usados como exemplo mas sem que haja restrição do assunto do invento.

Exemplos de marcas ou indicadores adequados podem ser encontrados dentro do grupo de elementos radioactivos. São

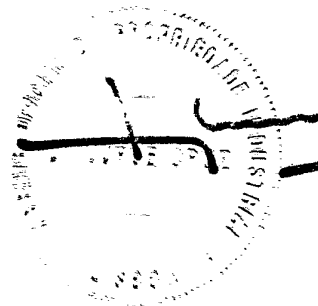


particularmente preferidos elementos que emitem eles próprios raios gama, tais como, por exemplo, ^{124}I , ^{125}I , ^{128}I , ^{132}I , ^{51}Cr ou induzem a emissão destes raios, como por exemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{13}N . São igualmente adequados os chamados emissores β tais como ^{111}In , ^{14}C e ^3H .

Outras marcas adequadas compreendem substâncias quimio-luminescentes, mas especialmente substâncias fluorescentes, as quais podem ser ligadas muito simplesmente por meios químicos ao antigénio ou a um anticorpo sem desnaturar este último. O fluorocromo resultante pode ser facilmente detectado usando métodos fluorométricos. Deve-se mencionar nesta altura os fluorocromos que são seleccionados do grupo constituído por isocianato de fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenossulfonilo, isotiocianato de tetrametilrodamina, lissamina, rodamina 8200 cloreto de sulfonilo etc.

Outros agentes fluorescentes e uma descrição de técnicas analíticas podem ser encontrados em DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", em Antibody As a Tool, Marchalonis et al., John Wiley & Sons, Ltd., pp189-231 (1982).

Dentro do âmbito deste invento é particularmente preferido o uso de enzimas como substâncias de marcação ou indicadores, tais como, por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, β -D-galactosidase, glucose-oxidase, glucoamilase, anidrase carbónica, acetilcolinesterase, lisozima, malato-desidrogenase, glucose-6-fosfato-desidrogenase etc. Quando se usa enzimas como substâncias de marcação é necessário adicionar outros reagentes que permitem a formação de um complexo imune que é seguido pela actividade enzimática e, sempre que adequado, um reagente de paragem com o qual a reacção enzimática pode ser parada.



São particularmente preferidos reagentes que resultem numa reacção corada. No caso da peroxidase de rábano silvestre, um exemplo que pode ser referido nesta altura é o peróxido de hidrogénio que resulta, em combinação com um precursor de corante oxidado como seja, por exemplo, diaminobenzidina ou o-fenilenodiamina, numa cor castanha ou amarela. Quando se usa glucose-oxidase como substância de marcação é possível usar, por exemplo, 2,2'-azino-di-(ácido 3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) [ABTS] como substrato.

Assim o presente invento está ainda relacionado com a utilização de kits de testes que contêm pelo menos um dos anticorpos monoclonais do presente invento como reagente, para a detecção rápida e eficaz, qualitativa e/ou quantitativa de espécies de fungos patogénicos do género Mycosphaerella.

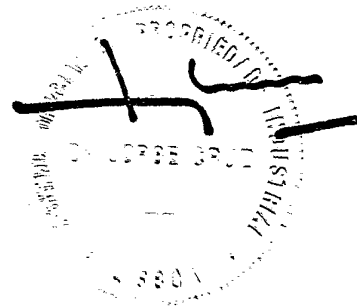
REALIZAÇÕES EXEMPLIFICATIVAS NÃO LIMITANTES

Os exemplos que se seguem ilustram os métodos de preparação dos hibridomas e anticorpos do presente invento.

Exemplo 1: Preparação do antigénio

1.1 Mycosphaerella fijiensis

Isolados de Mycosphaerella fijiensis foram cultivados em placas de agar V-8. O agar V-8 é preparado como se segue:



Sumo V-8 [sumo vegetal: tomate,	150 ml
cenouras, beterraba, espinafre, aipo, salsa,	
alface, (não clarificado); Campbell Soup Co.,	
Camden, NJ 08103-17011	
carbonato de cálcio	1,5 g
agar	18,0 g
água destilada	1,0 l

Se o isolado já estiver numa placa de agar V-8, placas com 7-14 dias são inundadas com água destilada estéril e retirados os conídios usando um raspador de células estéril ou uma vareta. Retira-se assepticamente uma pequena quantidade de suspensão de conídios e observa-se ao microscópio relativamente à presença de conídios típicos longos e estreitos tipo Cercospora. 0,1 ml desta suspensão é colocado em placas de agar V-8 e espalhado sobre a superfície usando um espalhador de vidro estéril. As placas são incubadas (com parafilme) com luz contínua [GE F40; 201 White Fluorescent Light Bulbs, fotoperíodo de 24 horas] à temperatura ambiente. Transferências contínuas dos isolados podem afectar a patogenicidade ao longo do tempo. Isolados frescos devem ser retirados do azoto líquido de três em três meses.

Os isolados de Mycosphaerella fijiensis podem ser crescidos depois de retirados do azoto líquido descongelando a ampola à temperatura ambiente e colocando pedaços de agar em placas de agar V-8 concentrado. As placas são incubadas à temperatura ambiente com luz contínua. Após o aparecimento decrescimento visível no pedaço de agar (5-7 dias), este é removido assépticamente usando pinças estéreis e o pedaço de agar é espalhado sobre a superfície de placas de agar V-8.



O antigénio pode ser produzido usando conídiso ou micélio cortado finamente como inóculo de culturas em caldo:

O inóculo de conídios prepara-se como descrito atrás usando placas de agar V-8 semeadas com uma suspensão de conídios. As placas com inóculo são incubadas à temperatura ambiente com luz contínua durante 7-14 dias (10 dias é óptimo segundo descrito na literatura). As placas são inundadas com 10 ml de água destilada estéril e os conídios retirados como descrito atrás. 0,1 ml da suspensão é removido assepticamente e usando um hemocitômetro, contado o número de conídios e a concentração de conídios ajustada assepticamente a 100000/ml de água. Se for realizado assepticamente, 0,1 ml da suspensão pode ser usado para semear mais placas de V-8. Anteriormente, números de conídios variando entre 500000 e 900000 foram colhidos a partir de uma única placa de agar.

O inóculo de micélio foi preparado por inoculação de frascos de cultura de tecidos de 250 ml (Falcon-3024) contendo 50 ml de caldo Phytone-Dextrose estéril com suspensão de conídios (100000 a 200000 conídios) ou pedaços de micélio removidos de uma placa de agar. O caldo de Phytone-Dextrose prepara-se como se segue:

Bacto-Soytone [Phytone; Difco Laboratories, Detroit, MI]	10 g
Dextrose	10 g
água destilada	1 l

Os frascos foram incubados na posição vertical durante três dias, depois agitados fortemente e deitados durante aproximadamente 5-7 dias. Após incubação, esta suspensão foi tratada

fisicamente para rebentar o micélio, por exemplo através da transferência para uma câmara estéril de 50 ml de um Omnimixer [câmara de aço inoxidável (capacidade 50 ml) de um homogenizador Omnimixer; Omni International, Waterbury, Conn., USA]. Esta suspensão foi triturada no máximo durante 30 segundos para picar finamente o micélio.

Assepticamente, 200000 conídios ou 0,5 ml da suspensão de micélio finamente cortado foram adicionados a 50 ml de caldo Phytone-Dextrose num frasco de 250 ml e incubado com agitação num banho-maria a 26°C e 80 rpm. Os frascos são preferencialmente incubados durante 8 dias.

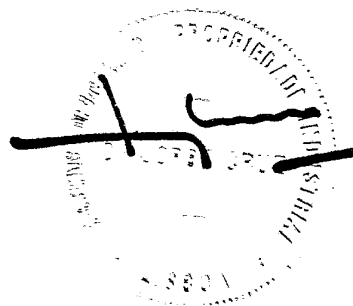
O micélio é colhido usando filtros de café (6,4 x 8,3 cm) num funil Buchner sob vácuo uma vez que Mycosphaerella cresce em esferas compactas em culturas em caldo que podem passar através de gase.

1.2: Mycosphaerella graminicola

Os extractos de antigénio podem ser preparados a partir de esporos germinados ou não germinados, como se segue:

1.2.1: Esporos não germinados

Os conídios de um isolado de S. tritici são semeados numa placa CDV8 (Caldo Czapek-Dox, Difco Cat #0338-01-2, suplementado com sumo "V-8", da Campbell) usando uma ansa de inoculação. A placa foi colocada em incubação a 18°C sob luz UV. Uma cultura com 5-7 dias de idade foi inundada com água destilada estéril e os conídios retirados suavemente raspando com uma ansa de



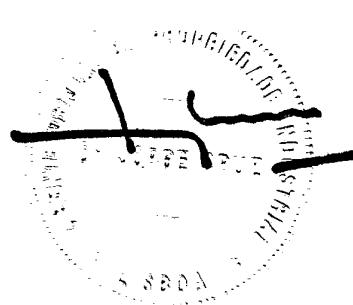
inoculação estéril a superfície do agar. O número de conídios/ml na suspensão resultante foi determinado usando um hemocitómetro (as concentrações de esporos podem ser muito altas, uma diluição de 1:50 é recomendada para uma suspensão turva). A suspensão de esporos foi diluída assepticamente para uma concentração final de 2 milhões de conídios/ml com água destilada estéril.

Em seguida frascos Erlenmeyer contendo 50 ml de meio para leveduras com sucrose (YSM) [10 g de extracto de levedura (Difco Laboratories); 10 g de sucrose; 1 l de água] com 1 l de inóculo cada (são necessários mais frascos para a produção em bloco) foram inoculados assepticamente. Os frascos de YSM inoculados foram colocados num agitador [alta velocidade; cerca de 140 rpm] a 18°C com luz ambiente [iluminação da sala com luz fluorescente, fotoperíodo de aproximadamente 10 horas] e cinco dos frascos foram colhidos após 96 horas. Os restantes frascos foram usados para preparar esporos germinados, infra. O conteúdo dos frascos foi vertido para dentro de um frasco de centrifuga de 250 ml e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado por decantação e o sedimento lavado uma vez com água destilada e recentrifugado. O sedimento foi ressuspensão em 50 ml PBS e extraído no moinho Dyno [moinho Dyno tipo KDL, destruidor de células: Impandes, Inc., Maywood, NJ 07067] durante 15 minutos.

1.2.2: Esporos germinados

Os cinco frascos restantes do processo descrito atrás foram colhidos após 96 horas e deixados a germinar em água de acordo com o processo que se segue.

O conteúdo de cada um dos frascos foi transferido assepticamente para um tubo Falcon estéril e centrifugado a 3000



rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi vertido, lavado uma vez com água destilada estéril e recentrifugado. O sedimento foi totalmente ressuspenso em 50 ml de água destilada estéril. A suspensão de cada tubo Falcon foi transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 ml. Os frascos inoculados foram colocados num agitador [alta velocidade, cerca de 140 rpm] a 18°C com luz ambiente durante 72 horas, os esporos foram colhidos vertendo o conteúdo de 5 frascos para um frasco de centrifuga de 250 ml (retirada uma amostra de 1 ml e determinada a % de germinação usando um hemocitómetro). A amostra foi centrifugada a 3000 rpm [rotor GS-3, centrifuga Sorvall; 1521 g] durante 5 minutos, o sobrenadante foi vertido, lavado uma vez com água destilada e recentrifugado. O sedimento foi ressuspenso em 50 ml de PBS e extraído no moinho Dyno [destruidor de células moinho Dyno tipo KDL: Impandex, Inc., Maywood, NJ 07607] durante 15 minutos.

1.3: Imunização e fusão

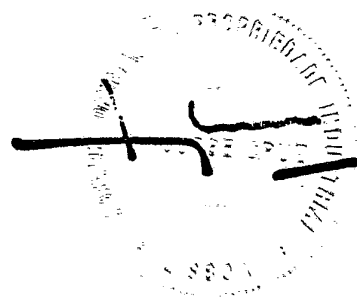
A descrição que se segue é para imunização com Mycosphaerella graminicola, mas a imunização com Mycosphaerella, usando um extracto de M. fijiensis, é realizado de forma idêntica.

A primeira imunização é feita intraperitonealmente num murganho Balb/C com 0,25 ml de extracto fungico Mg3 [Mycosphaerella graminicola isolado 3, preparado como descrito na secção 1.2.11 emulsionado em 0,25 ml de Adjuvante Completo de Freund. As injeções de reforço foram dadas usando o mesmo imunogénio em Adjuvante Incompleto de Freund com intervalos de duas semanas. A quarta injeção, terceiro reforço, foi dada com extracto fungico Mg3 em adjuvante incompleto seguido, após duas semanas, de um reforço da mesma preparação. O murganho foi sacrificado por deslocamento cervical no décimo dia e o baço removido para

extracção dos linfócitos. Antes da morte, o murgancho foi sangrado na veia da cauda e o soro testado quanto à presença de anticorpos específicos para o imunogénio.

O murgancho foi sacrificado por deslocamento cervical e o baço retirado cirurgicamente. O baço foi colocado num écran estéril de 80 mesh dentro de uma caixa de Petri rejeitável estéril, cortado com um bisturi e massajado com o embolo estéril de uma seringa de 3 ml. Durante este processo, o baço é lavado várias vezes com DMEM e as lavagens juntas num tubo. A suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm a 850 g [Beckman Table Top Centrifuge rotor TH-4] durante 10 minutos (as centrifugações foram todas feitas à temperatura ambiente). O sobrenadante foi decantado e o sedimento lavado com 4 ml de solução de lise de glóbulos vermelhos (0,83% NH_4Cl , 0,01M KHCO_3 , 0,1mM EDTA) durante 90 segundos à temperatura ambiente. A reacção de lise foi parada por diluição do conteúdo do tubo para 45 ml com DMEM. O conteúdo foi novamente centrifugado a 2000 rpm a 850 g [Beckman Table Top Centrifuge rotor TH-4] durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspenso em 10 ml de DMEM. Uma amostra da suspensão celular foi guardada para contagem das células. O número total de células viáveis na suspensão foi de $2,985 \times 10^8$ células.

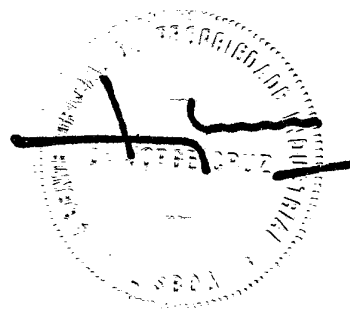
Células de mieloma [P3NS1/1-Ag4-1 (NS1) adquiridas à American Type Culture Collection, ATCC #TIB-18] foram removidas do meio de cultura por centrifugação num tubo de centrifuga estéril de 50 ml a 2000 rpm para 850 g [Beckman Table Top Centrifuge rotor TH-4] durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspenso em 10 ml de DMEM para a contagem de células. $7,46 \times 10^7$ células de mieloma foram necessárias para dar uma proporção de 4:1 de células do baço para células de mieloma. A quantidade adequada de células de mieloma foi adicionada à



suspensão de células do baço. As células combinadas foram centrifugadas a 2000 rpm para 850 g [Beckman Table Top Centrifuge rotor TH4-4] durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi decantado.

1 ml de PEG 1500 (Boehringer Mannheim Biochemicals, cat. #783-641) à temperatura ambiente foi adicionado ao sedimento. As células foram ressuspensas suavemente com uma pipeta de 2 ml e um pipetador automático. A suspensão de células foi diluída muito lentamente pela adição de 10 ml de DMEM gota a gota durante 10 minutos com agitação suave do tubo para manter as células em suspensão. A suspensão foi então lentamente diluída para 45 ml com DMEM e centrifugado 10 minutos a 1500 rpm para 500 g. O sobrenadante foi decantado, o sedimento lavado suavemente com 10 ml de DMEM e recentrifugado a 1500 rpm para 500 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e HMT previamente aquecido foi adicionado ao tubo. O sedimento foi ressuspenso, transferido para um frasco de cultura rejeitável estéril e diluído ainda para 80 ml com meio HMT. A diluição final foi adicionada às 60 cavidades internas de nove placas de microtitulação de 96 cavidades (Falcon, cat. #3870) usando uma pipeta de 10 ml, duas gotas por cavidade. As placas de microtitulação foram colocadas numa incubadora de 9% de CO₂ com pelo menos 95% de humidade.

As células foram novamente alimentadas com meio HMT com a composição que se segue após 5-7 dias.



Meio HMT	Composição
DMEM	70,0 ml
L-glutamina	1,0 ml
Penicilina-Estreptomicina	1,0 ml
Metotrexato [22,73 mg]	1,0 ml
Hipoxantina/Timidina	2,0 ml
Soro Fetal Bovino	20,0 ml
Origen-HCF ^{R*}	5,0 ml

* Origen-HCF é o nome da marca registada para um suplemento de cultura de tecidos para aumentar o crescimento de células de hibridoma [IGEN Inc. Maryland, 20852]

Grupos de células de hibridoma começam a aparecer após 5-7 dias. Ainda nova adição de meio HT, a mesma composição do meio HMT sem metotrexato e Origen-HCF.

1.4: Rastreio de hibridomas

1.4.1: *Mycosphaerella graminicola*

Os hibridomas produtores de anticorpos contra fungos patogénicos foram identificados usando extracto preparado de *Mycosphaerella graminicola* com 30% de esporos germinados (concentração proteica 5 µg/ml em tampão carbonato) num formato de ELISA. As cavidades apresentando resposta positiva em ELISA foram subclonadas de forma que estirpes puras de células de hibridoma foram seleccionadas. O método de subclonagem envolve diluição das células de uma cavidade para <100 células em 12 ml de meio HT com

5% Origen-HCF. Esta suspensão de células diluídas foi adicionada a uma placa de microtitulação, duas gotas por cavidade. As cavidades da placa de subclonagem foram novamente testadas quanto à actividade de anticorpo específico contra componentes fúngicos. As cavidades da placa de subclonagem foram novamente testadas relativamente à actividade de anticorpo específico contra componentes fungicos. As cavidades positivas foram então transferidas para frascos de cultura maiores para cultura numa escala maior.

ELISA--Processo do Carbinato--

360 µg de tampão carbonato contendo 5 µg/ml de antigénio foi colocado em cada uma das cavidades de uma placa de microtitulação (Nunc, cat #468667) e incubado durante 3 horas à temperatura ambiente. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão carbonato. As cavidades foram cheias com solução de bloqueio e incubadas 30 minutos à temperatura ambiente. A solução residual foi retirada, as placas enxutas com toalhas de papel e secas durante a noite a 37°C numa incubadora de convecção mecânica. As placas foram então fechadas em sacos de alumínio contendo sacos excicadores e guardadas a 4°C.

As placas foram retiradas do armazenamento e deixadas aquecer até à temperatura ambiente. 100 µl da amostra de sobrenadante foi colocado em cada uma das cavidades e incubado 10 minutos num agitador de microplacas à temperatura ambiente. A solução residual foi rejeitada e a placa lavada cinco vezes com tampão de lavagem [20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Tween-80, 0,01% Thimerosal (etil-mercuritio-salicilato de sódio; Fluka, Biochemika, # 71230), pH 7,8). Adicionou-se a cada uma das cavidades 100 µl de soro de cabra anti-IgG de murganho conjugado com peroxidase [Kikegaard e Perry Laboratories Inc. (KPL), Maryland 20879, cat. #14-18-02] diluído a 1:1000 em 0,1% BSA em PBS. As placas foram



incubadas durante 10 minutos num agitador à temperatura ambiente. A solução residual foi retirada e as placas lavadas cinco vezes com tampão de lavagem. 100 µl de substrato ABTS foi colocado em cada uma das cavidades e as placas foram incubadas 10 minutos como anteriormente. A reação enzima/substrato foi parada pela adição de 50 µl de 1,5% NaF a cada uma das cavidades e rapidamente misturado no agitador. A absorvância foi lida a 405 nm.

Soluções Necessárias:

1. Tampão Carbonato: 0,1 M carbonato, pH 9,6, consiste em 1,56 g/l de Na_2CO_3 e 2,93 g/l NaHCO_3 em DI H_2O .
2. PBS: 2,19 g/l Na_2HPO_4 , 0,56 g/l NaH_2PO_4 , 8,76 g/l NaCl em DI H_2O , pH 7,2.
3. Stock ABTS: 15 mg/ml 2,2'-Azinobis(ácido 3-etilbenztiazolios-sulfônico) em DI H_2O .
4. Tampão Citrato: 23 g/l de ácido cítrico, pH 4,5, depois adicionado 0,5ml 30% H_2O_2 .
5. Substrato ABTS: Solução stock ABTS foi diluída 1 ml com 24 ml de tampão citrato.

Todas as soluções tampão foram feitas com reagentes anidros quando disponíveis e DI H_2O .

Os resultados de um rastreio primário de uma série de anticorpos contra um painel de fungos patogênicos estão apresentados na Tabela 1.

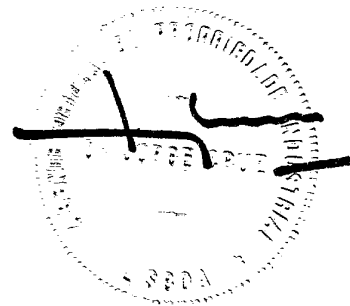


Tabela 1

Rastreo de anticorpos isolados contra o painel de fungos primário Mycosphaerella graminicola contra os anticorpos monoclonais Mg37B5, Mg35D10, Mg39G8, Mg35D6. As placas de microtitulação foram revestidas com o antígeno a 5 µg/ml.

	<u>Isolado</u>	<u>Mg37B5</u>	<u>Mg35D10</u>	<u>Mg39G8</u>	<u>Mg35D6</u>
<u>M. graminicola</u>	3G	2,00+	2,00+	1,74	1,01
<u>M. graminicola</u>	4G	2,00+	1,75	1,51	0,28
<u>Leptosphaeria nodorum</u>	1	0,01	0,02	0,03	0,27
<u>Pyrenophora tritici</u>					
<u>repentis</u>	1a	0,01	0,00	0,02	0,21
Espécies de <u>Alternaria</u>	2	0,02	0,02	0,03	1,13
<u>Aspergillus fumigatus</u>	1	0,01	0,00	0,01	0,24
Espécies de <u>Epicoccum</u>	1	0,02	0,02	0,02	1,55
Espécies de <u>Phoma</u>	1	0,02	0,07	0,00	1,14
Espécies de <u>Penicillium</u>	15	0,01	0,01	0,03	0,37
Espécies de <u>Cladosporium</u>	1	0,01	0,01	0,01	0,17
Branco (0,1% 4 BSA em PBS)		0,01	0,01	0,03	0,18

Os rastreios de anticorpos isolados foram realizados usando o anticorpo Mg37B5 contra um painel expandido de isolados de fungos patogênicos relacionados, assim como contra vários isolados de Mycosphaerella graminicola. Os resultados estão apresentados respectivamente nas Tabelas 2 e 3.



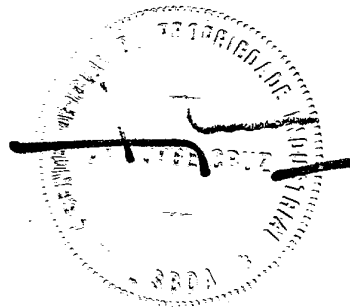
Tabela 2

Rastreo de anticorpos isolados do painel secundário de fungos Mycosphaerella graminicola de espécies relacionadas e não relacionadas contra o anticorpo monoclonal Mg37B5. Placas de microtitulação revestidas com antígeno a 5µg/ml. NT = Não testado.

<u>Isolado</u>	<u>Nº de isolados testados</u>	<u>Mg37B5</u>
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	3	0.015
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	5	2.00+
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	1	1.125
<i>Mycosphaerella musicola</i>	3	0.014
<i>M. fijiensis</i> var. <i>difformis</i>	3	0.016
<i>Alternaria alternata</i>	1	0.000
<i>Alternaria</i> spp.	1	0.056
<i>Aspergillus</i> spp.	3	0.000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0.000
<i>Aspergillus terreus</i>	1	0.000
<i>Aspergillus candidis</i>	1	0.007
<i>Aspergillus varians</i>	1	0.034
<i>Botrytis alli</i>	1	0.000
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0.037



<i>Bipolaris oryzae</i>	2	0.016
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	3	0.000
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0.048
<i>Cladosporium herbarum</i>	1	0.000
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1	0.000
<i>Cladosporium musae</i>	1	0.023
<i>Cladosporium</i> spp.	2	0.058
<i>Cladosporium</i> spp.	1	0.001
<i>Colletotrichum graminicola</i>	3	0.038
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	0.089
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	0.000
<i>Curvularia lunata</i>	1	0.080
<i>Chloridium musae</i>	1	0.000
<i>Cordana musae</i>	1	0.028
<i>Dreschlera gigantea</i>	1	0.000
<i>Diplodia gossypina</i>	1	0.001
<i>Deighthoniella torulosa</i>	1	0.000
<i>Deighthoniella</i> spp.	1	0.000
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0.049
<i>Epicoccum</i> spp.	1	0.000
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0.004
<i>Fusarium nivale</i>	1	0.028
<i>Fusarium</i> spp.	1	0.000
<i>Helminthosporium sativum</i>	4	0.051
<i>Leptosphaeria korrae</i>	3	0.000
<i>Leptosphaeria nodorum</i>	2	0.001
<i>Lambertella subrenispora</i>	1	0.000
<i>Monilinia</i> spp.	2	0.004



<i>Mortierella spinosa</i>	1	NT
<i>Myriosclerotinia dennisii</i>	1	0.112
<i>Penicillium</i> spp.	5	0.017
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	2	0.000
<i>Pythium aphanidermatum</i>	3	0.002
<i>Phoma</i> spp.	1	0.000
<i>Pseudocercospora</i> <i>herpotrichoides</i>	1	0.000
<i>Rhizopus stolonifer</i>	4	0.006
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	0.034
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2	0.026
<i>Stemphylium vesicarium</i>	2	0.019

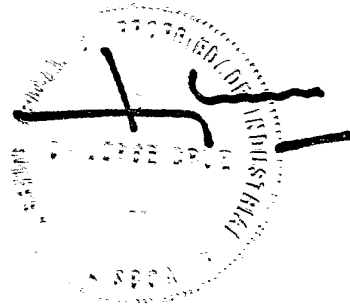
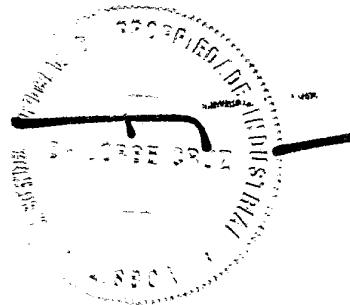


Tabela 3

Rastreo de anticorpos isolados de Mycosphaerella graminicola contra o anticorpo monoclonal Mg37B5. As placas de microtitulação foram revestidas com o antígeno a 5 µg/ml.

Antígeno	Lote	Anticorpo Monoclonal Mg37B5
		Absorvância (405 nm)
Mg 3	012G	2.000+
Mg 4	011G	2.000+
Mg 5	010G	2.000+
Mg 7	010G	2.000+
Mg 8	010G	0.559
Mg 10	010G	2.000+
Mg 15	010G	1.125
Mg 28	010G	2.000+
Mg 40	010G	2.000+
Mg 41	010G	2.000+
Mg 42	010G	2.000+
Mg 43	010G	2.000+
Mg 44	010G	2.000+
Mg 45	010G	2.000+

Três linhas celulares da fusão de Mycosphaerella graminicola foram testadas contra os isolados de fungos do painel de reactividade cruzada primária para Mycosphaerella fijiensis



num formato de um único anticorpo. Como se mostra na Tabela 4, cada um destes anticorpos (todos IgG1) apresentam uma forte reactividade cruzada com espécies de Mycosphaerella graminicola.

Tabela 4

Rastreio de anticorpos isolados do painel primário de fungos Mycosphaerella fijiensis contra os anticorpos monoclonais Mg39G8, Mg35D10 e Mg35D3. As placas de microtitulação foram revestidas com o antigénio a 5µg/ml.

	<u>Isolado</u>	<u>Mg39G8</u>	<u>Mg35D10</u>	<u>Mg35D3</u>
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	1	1.30	0.74	0.80
<i>M. fijiensis</i> var. <i>difformis</i>	1	0.07	0.27	0.37
<i>M. fijiensis</i> var. <i>difformis</i>	3	1.66	1.83	1.89
<i>Mycosphaerella musicola</i>	1	1.30	1.56	1.80
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	3G	1.55	1.33	1.61
<i>Deighthoniella torulosa</i>	1	0.00	0.02	0.08
<i>Cladosporium herbarum</i>	1	0.00	0.03	0.06
<i>Dreschlera gigantea</i>	1	0.00	0.00	0.03
<i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i>	1	0.00	0.00	0.03
<i>Cladosporium musae</i>	1	0.01	0.03	0.08
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2	0.00	0.00	0.03

O anticorpo monoclonal do hibridoma Mg37B5 e outros monoclonais, foram ainda testados num formato de dois anticorpos

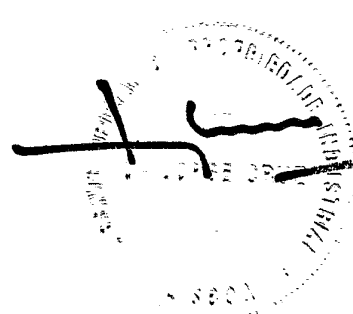


contra um trigo infectado e outro amtrial comparativo como se segue:

Os anticorpos monoclonais foram purificados, a partir de amostras de sobrenadantes de hibridoma por cromatografia de afinidade em Proteína A. O eluente da coluna de cromatografia foi dializado contra duas mudas de PBS, >100 volumes por ciclo de diálise. A concentração de proteína da solução de anticorpo foi calculada dividindo a absorvância da solução a 280 nm poe 1,4 para dar a concentração em miligramas de proteína por mililitro.

As placas de microtitulação foram sensibilizadas diluindo primeiro a solução de anticorpo purificado no tampão de sensibilização adequadoe depois colocando 100 µl em cada cavidade. A concentração do anticorpo após a diluição foi de 5µg/ml em cada um dos três tampões de sensibilização; Tampão Carbonato, pH 9,6, PBS, pH 7,2 e 0,1M Glicina-HCl, pH 4,5. As placas de microtitulação foram incubadas 3 horas à temperatura ambiente. A solução residual foi rejeitada e as cavidades lvadas 3 vezes com o mesmo tampão usado na sensibilização. As cavidades foram cheias com slução de bloqueamento e incubadas 30 minutos à temperatura ambiente. A solução residual foi rejeitada, as placas foram secas sobre toalhas de papel e depois secas a 37°C durante a noite numa incubadora de convecção mecânica. As placas foram então fechadas em sacos de folha de alumínio contendo uma bolsa excicadora e guardadas a 4°C.

As placas foram retiradas do local de armazenamento e deixadas a equilibrar à temperatura ambiente. As soluções de antigénio foram preparadas diluindo extractos de culturas de fungos em 0,1% BSA/PBS ou triturando no mesmo tampão folhas de trigo infectadas. 100 µl da solução de antigénio foi adicionado a cada uma das cavidades e as placas foram incubadas 10 minutos à



temperatura ambiente num agitador de placas de microtitulação. Adicionou-se a cada uma das cavidades 100 µl de soro de carneiro anti-Mg3G conjugado com peroxidase (0,5 µg/ml em 0,1% BSA/PBS). As placas foram incubadas como atrás. A solução de conjugado residual foi retirada e as placas lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se a cada uma das cavidades 100 µl de substrato ABTS [2,2'-Azinobis (ácido 3-etil-benzetiazolinssulfônico)] e as placas foram incubadas como atrás. A reacção corada foi parada após 10 minutos pela adição de 50 µl de 1,5% naF a cada uma das cavidades e rapidamente misturado num agitador de placas. Leu-se a absorvância de cada uma das placas a 405 nm.

Os resultados, os quais estão apresentados na Tabela 5, indicam que os monoclonais de Mg37B5 são eficazes na detecção de Mycosphaerella graminicola no material vegetal infectado.

Tabela 5

O teste de dois anticorpos usando o sobrenadante da linha celular Mg37B5 como anticorpo de captura (concentração de anticorpo 5 µg/ml, diluente tampão carbonato pH 9,6). O conjugado usado foi de carneiro anti-Mycosphaerella graminicola. Os antígenos testados foram de trigo infectado com Mycosphaerella graminicola, trigo não infectado e o isolado Mg3G.

<u>Antigénio</u>	<u>Mg37B5</u>
Trigo infectado com <u>Mycosphaerella graminicola</u> diluição 1:10	0,78
Trigo não infectado	0,02
Isolado 3G de <u>Mycosphaerella graminicola</u> 10 µg/ml	2,0+
0,1% de Albumina Sérica Bovina	0,01

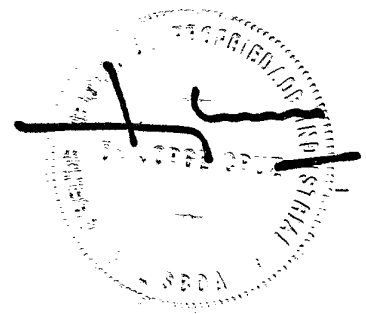
Mycosphaerella fijiensis

O rastreio de hibridomas resultantes das fusões de Mycosphaerella fijiensis foi realizado essencialmente como descrito para Mycosphaerella graminicola, *supra*. Os resultados do painel de rastreio primário estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6

Rastreio de anticorpos isolados do painel primário de fungos Mycosphaerella fijiensis contra os anticorpos monoclonais Mf14C6, Mf18E6, Mfd12C3, Mfd13F9, Mfd116D8, Mfd11B9, Mfd18C11 e Mfd17D10. As placas de microtitulação foram revestidas com o antigénio a 5 µg/ml.

NT = Não testado.



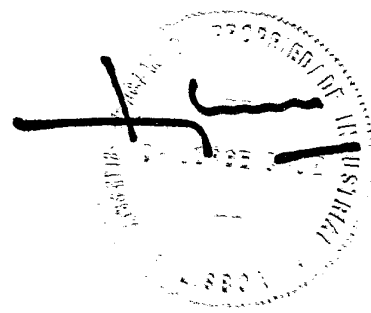
	Mf1 <u>4C6</u>	Mfd1 <u>8E6</u>	Mfd1 <u>2C3</u>	Mfd1 <u>3F9</u>	Mfd1 <u>6D8</u>	Mfd1 <u>1B9</u>	Mfd1 <u>8C11</u>	Mfd1 <u>7D10</u>
<i>Mycosphaerella</i>								
<i>fijiensis</i>	0.21	2.00+	2.0+	0.08	0.02	0.69	0.79	1.64
<i>M. fijiensis</i>								
var. <i>difformis</i>	0.12	2.00+	2.0+	0.49	0.82	1.65	0.61	1.83
<i>M. fijiensis</i>								
var. <i>difformis</i>	0.07	2.00+	2.0+	0.09	0.06	0.00	0.36	0.95
<i>Mycosphaerella</i>								
<i>musicola</i>	0.00	2.00+	2.0+	0.09	0.04	0.21	0.55	1.74
<i>Mycosphaerella</i>								
<i>graminicola</i>	0.00	1.05	0.82	0.09	0.05	0.01	0.28	0.11
<i>Deightoniella</i>								
<i>torulosa</i>	0.00	0.21	0.18	0.08	0.10	0.00	0.64	0.00
<i>Cladosporium</i>								
<i>herbarum</i>	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.12	0.27
<i>Dreschlera</i>								
<i>gigantea</i>	0.00	0.00	0.01	0.04	0.00	0.00	0.07	0.00
<i>Cladosporium</i>								
<i>musae</i>	0.00	0.00	0.08	0.06	0.02	0.00	0.03	0.00
<i>Fusarium</i>								
<i>oxysporium</i>	0.00	0.00	0.04	0.08	0.00	0.00	0.05	0.00
<i>Rhizopus</i>								
<i>stolonifer</i>	0.02	0.05	0.12	0.07	NT	0.00	0.60	0.00
Blank	0.00	0.00	0.06	0.09	NT	0.00	0.00	0.00

Os resultados de um ensaio com um só anticorpo para testar a reactividade cruzada de vários anticorpos de Mycosphaerella contra um painel largo de isolados relacionados e não relacionados estão apresentados nas Tabelas 7 e 7a. A reactividade destes anticorpos monoclonais com múltiplos isolados de M. fijiensis está apresentada nas Tabelas 8 e 8a.

Tabela 7

Rastreio de anticorpos isolados de um painel secundário de fungos de Mycosphaerella fijiensis contra os anticorpos monoclonais Mf 114C6, Mf18E6, Mfd12C3 e Mfd17D10. As placas de microtitulação foram revestidas com antigénio a 5 µg/ml. NT = Não testado.

<u>Isolados</u>	Número de <u>Isolados</u> <u>testados</u>	<u>Anticorpos Monoclonais</u>			
		<u>4C6</u>	<u>8E6</u>	<u>2C3</u>	<u>7D10</u>
<i>Mycosphaerella</i>					
<i>fijiensis</i>	3	0.008	2.00+	2.00+	1.443
<i>M. fijiensis</i> var.					
<i>difformis</i>	3	0.041	2.00+	2.00+	0.959
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	5	0.080	0.259	0.167	0.062
<i>Mycosphaerella musicola</i>	3	0.021	2.00+	1.768	0.940
<i>Alternaria alternata</i>	1	0.000	0.006	0.000	0.000
<i>Alternaria</i> spp.	1	0.044	0.023	0.000	0.018
<i>Aspergillus</i> spp.	3	0.002	0.022	0.000	0.015
<i>Aspergillus terreus</i>	1	0.000	0.048	0.009	0.000
<i>Aspergillus candidis</i>	1	0.017	0.100	0.000	0.000
<i>Aspergillus varians</i>	1	0.007	0.028	0.000	0.000
<i>Botrytis allii</i>	1	0.000	0.039	0.011	0.000
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0.014	0.023	0.004	0.016
<i>Bipolaris oryzae</i>	2	0.071	0.033	0.031	0.054
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	3	0.000	0.004	0.000	0.008
<i>Cladosporium</i>					

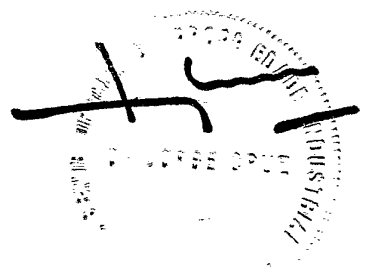


<i>cladosporioides</i>	1	0.000	0.000	0.000	2.00+
<i>Cladosporium herbarum</i>	1	0.000	0.027	0.000	2.00+
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1	0.000	0.079	0.000	0.000
<i>Cladosporium musae</i>	1	0.021	0.077	0.000	0.000
<i>Cladosporium</i> spp.	2	0.027	0.015	0.002	2.00+
<i>Cladosporium</i> spp.	1	0.000	0.015	0.000	0.022
<i>Colletotrichum graminicola</i>	3	0.030	0.004	0.000	1.443
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	0.000	0.012	0.003	2.00+
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	0.000	0.045	0.000	0.646
<i>Curvularia lunata</i>	1	0.015	0.000	0.000	0.006
<i>Chloridium musae</i>	1	0.000	0.005	0.034	1.254
<i>Cordana musae</i>	1	0.000	0.037	0.002	0.021
<i>Dreschlera gigantea</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Diplodia gossypina</i>	1	0.000	0.061	0.010	0.017
<i>Deightoniella torulosa</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Deightoniella</i> spp.	1	0.000	0.028	0.012	0.000
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0.036	0.017	0.000	0.028
<i>Epicoccum</i> spp.	1	0.000	0.028	0.015	0.033
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0.016	0.067	0.012	0.017
<i>Fusarium nivale</i>	1	0.016	0.029	0.010	2.00+
<i>Fusarium</i> spp.	1	0.000	0.015	0.016	0.040
<i>Helminthosporium sativum</i>	4	0.004	0.038	0.026	0.009
<i>Leptosphaeria korrae</i>	3	0.000	0.014	0.012	0.003
<i>Leptosphaeria nodorum</i>	2	0.002	0.010	0.035	0.011
<i>Lambertella subrenispora</i>	1	0.022	0.001	0.000	0.000
<i>Monilinia</i> spp.	2	0.000	0.044	0.021	0.025
<i>Mortierella spinosa</i>	1	NT	0.000	0.000	0.000
<i>Mortierella epigama</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Myriosclerotinia dennisii</i>	1	0.000	0.060	0.014	0.050
<i>Penicillium</i> spp.	5	0.017	0.183	0.119	0.003
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	2	0.004	0.042	0.008	0.012
<i>Pythium aphanidermatum</i>	3	0.000	0.019	0.000	0.000
<i>Phoma</i> spp.	1	0.000	0.095	0.007	0.023
<i>Rhizopus stolonifer</i>	4	0.007	0.194	0.140	0.008
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	0.007	0.029	0.011	0.000
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2	0.000	0.006	0.000	0.004

Tabela 7a

Rastreo de anticorpos isolados de um painel secundário de fungos de Mycosphaerella fijiensis contra os anticorpos monoclonais Mfd13F9, Mfd16D8, Mfd11B9 e Mfd18C11. As placas de microtitulação foram revestidas com antígeno a 5 µg/ml. NT = Não testado.

<u>Isolados</u>	<u>Número de</u> <u>Isolados</u> <u>testados</u>	<u>3F9</u>	<u>6D8</u>	<u>1B9</u>	<u>8C11</u>
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	3	0.014	0.000	0.022	0.893
<i>M. fijiensis</i> var. <i>difformis</i>	3	0.088	0.134	0.091	0.688
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	5	0.012	0.057	0.030	0.153
<i>Mycosphaerella musicola</i>	3	0.043	0.027	0.047	0.999
<i>Alternaria alternata</i>	1	0.018	0.026	0.003	0.088
<i>Alternaria</i> spp.	1	0.000	0.000	0.000	0.058
<i>Aspergillus</i> spp.	3	0.013	0.006	0.000	0.104
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	0.009	0.013	0.000	0.177
<i>Aspergillus terreus</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.075
<i>Aspergillus candidis</i>	1	0.000	0.020	0.000	0.205
<i>Aspergillus varians</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.098
<i>Botrytis allii</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.156
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0.000	0.040	0.033	0.072
<i>Bipolaris oryzae</i>	2	0.004	0.000	0.000	0.438
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	3	0.035	0.075	0.017	0.169



<i>Cladosporium</i>					
<i>cladosporioides</i>	1	0.009	0.006	0.000	0.078
<i>Cladosporium herbarum</i>	1	0.032	0.004	0.026	0.004
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1	0.009	0.000	0.000	0.139
<i>Cladosporium musae</i>	1	0.027	0.006	0.000	0.148
<i>Cladosporium spp.</i>	2	0.053	0.145	0.148	0.014
<i>Cladosporium spp.</i>	1	0.057	0.096	0.185	0.188
<i>Colletotrichum</i>					
<i>graminicola</i>	3	0.008	0.003	0.000	0.197
<i>Colletotrichum spp.</i>	1	0.021	0.000	0.013	0.129
<i>Colletotrichum spp.</i>	1	0.003	0.003	0.004	0.101
<i>Curvularia lunata</i>	1	0.014	0.000	0.000	0.082
<i>Chloridium musae</i>	1	0.012	0.000	0.000	0.062
<i>Cordana musae</i>	1	0.000	0.009	0.000	0.068
<i>Dreschlera gigantea</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.076
<i>Diplodia gossypina</i>	1	0.043	0.002	0.002	0.059
<i>Deighthoniella torulosa</i>	1	0.013	0.000	0.000	0.330
<i>Deighthoniella spp.</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.316
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0.076	0.000	0.000	0.272
<i>Epicoccum spp.</i>	1	0.089	0.170	0.142	0.183
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0.007	0.000	0.221	0.120
<i>Fusarium nivale</i>	1	0.007	0.000	0.000	0.219
<i>Fusarium spp.</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.317
<i>Helminthosporium sativum</i>	4	0.005	0.000	0.001	0.082
<i>Leptosphaeria korrae</i>	3	0.079	0.017	0.000	0.160
<i>Leptosphaeria nodorum</i>	2	0.022	0.019	0.000	0.109
<i>Lambertella subrenispora</i>	1	0.023	0.000	0.007	0.239
<i>Monilinia spp.</i>	2	0.470	0.009	0.024	0.053
<i>Mortierella spinosa</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.816
<i>Mortierella epigama</i>	1	0.015	0.021	0.002	0.195
<i>Myriosclerotinia dennisii</i>	1	0.000	0.000	0.000	0.793
<i>Penicillium spp.</i>	5	0.010	0.004	0.000	0.261
<i>Pyrenophora tritircrepentis</i>	2	0.390	0.015	0.007	0.149
<i>Pythium aphanidermatum</i>	3	0.067	0.002	0.006	0.387
<i>Phoma spp.</i>	1	0.057	0.129	0.025	0.232
<i>Rhizopus stolonifer</i>	4	0.076	0.006	0.047	0.362
<i>Rhizoctonia solani</i>	2	0.030	0.034	0.004	0.453
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2	0.006	0.003	0.000	0.068

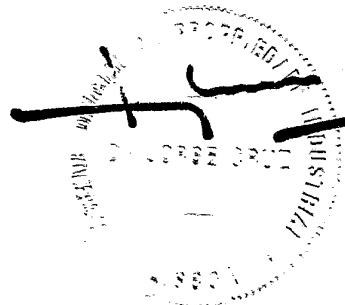


Tabela 8

Rastreo de anticorpos isolados de Mycosphaerella fijiensis (Mf), M. fijiensis var. difformis (Mfd) e M. musicola (Mm) contra anticorpos monoclonais Mf14C6, Mf18E6, Mfd12C3 e Mfd17D10. As placas de microtitulação foram revestidas com antígeno a 5µg/ml.

Antigênio	Lote	Mf14C6	Anticorpo Monoclonal		
			Mf18E6	Mfd2C3	Mfd7D10
			Absorvância (405 nm)		
Mf 1	012	0.016	2.00+	2.00+	1.654
Mf 2	011	0.011	2.00+	2.00+	2.00+
Mf 4	010	0.000	2.00+	2.00+	NT
Mfd 1	010	0.002	2.00+	2.00+	1.217
Mfd 2	010	0.082	2.00+	2.00+	0.657
Mfd 3	010	0.039	2.00+	2.00+	1.006
Mm 1	010	0.026	2.00+	2.00+	1.396
Mm 2	010	0.015	2.00+	2.00	1.040
Mm 3	010	0.023	2.00+	1.305	0.384

Tabela 8a

Rastreo de anticorpos isolados de Mycosphaerella fijiensis (Mf), M. fijiensis var. difformis (Mfd) e M. musicola (Mm) contra anticorpos monoclonais Mfd13F9, Mfd16D8, Mfd11B9 e Mfd18C11. As placas de microtitulação foram revestidas com antígeno a 5µg/ml.

Antigénio	Lote	Anticorpo Monoclonal			
		Mfd3F9	Mfd6D8	Mfd1B9	Mfd8C11
		Absorvância (405 nm)			
Mf 1	012	0.017	0.000	0.023	0.328
Mf 2	011	0.000	0.000	0.048	0.350
Mf 4	010	0.025	0.009	0.000	2.000
Mfd 1	010	0.228	0.377	0.257	0.146
Mfd 2	010	0.004	0.000	0.000	0.253
Mfd 3	010	0.032	0.025	0.015	1.666
Mm 1	010	0.000	0.000	0.000	2.00+
Mm 2	010	0.021	0.007	0.000	0.370
Mm 3	010	0.109	0.074	0.141	0.627

Na Tabela 9 está apresentado um rastreo com dois anticorpos do anticorpos monoclonal de Mycosphaerella fijiensis



Mf14C6 contra um painel largo de fungos patogénios relacionados e não relacionados. Esta tabela ilustra o nível elevado de especificidade do anticorpo Mf14C6 e a maior sensibilidade do Mf14C6 num rastreio de dois anticorpos versus um só anticorpo. A Tabela 10 mostra o resultado do rastreio com dois anticorpos de Mf14C6 contra um painel de folhas de baananeira infectadas com Mycosphaerella fijiensis e cultura pura de Mycosphaerella fijiensis assim como folhas de bananeira saudáveis.

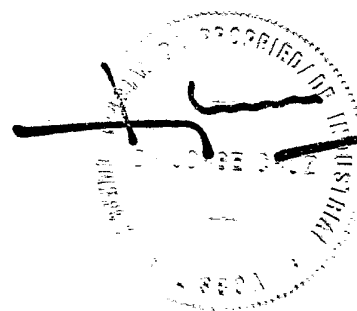


Tabela 9

Rastreo com dois anticorpos do painel secundário de fungos Mycosphaerella fijiensis contra o anticorpo monoclonal Mf14C6. As placas de microtitulação foram revestidas com Mf14C6 em 5 µg/ml. O segundo imuno-reagente é soro de carneiro anti-Mf1 conjugado com peroxidase de rábano silvestre. O conjugado de carneiro foi usado a 5µg/ml. NT = Não Testado.

<u>Isolados</u>	Número de <u>Isolados testados</u>	<u>4C6</u>
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	6	0.02
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	3	2.00+
<i>Mycosphaerella musicola</i>	3	2.00+
<i>M. fijiensis</i> var. <i>difformis</i>	3	2.00+
<i>Alternaria alternata</i>	1	0.00
<i>Alternaria</i> spp.	1	0.01
<i>Aspergillus</i> spp.	3	0.02
<i>Aspergillus fumigatis</i>	1	0.00
<i>Aspergillus terreus</i>	1	0.00
<i>Aspergillus candidis</i>	1	0.01
<i>Aspergillus varians</i>	1	0.01
<i>Botrytis allii</i>	1	0.04
<i>Botrytis cinerea</i>	3	0.03
<i>Bipolaris oryzae</i>	2	0.01
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	3	0.01



<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0.08
<i>Cladosporium herbarum</i>	1	0.13
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	1	0.01
<i>Cladosporium musae</i>	1	NT
<i>Cladosporium</i> spp.	2	0.04
<i>Cladosporium</i> spp.	1	0.00
<i>Colletotrichum graminicola</i>	3	0.04
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	0.00
<i>Curvularia lunata</i>	1	0.00
<i>Chloridium musae</i>	1	0.00
<i>Cordana musae</i>	1	0.00
<i>Dreschlera gigantea</i>	1	0.00
<i>Diplodia gossypina</i>	1	0.00
<i>Deightoniella torulosa</i>	1	0.00
<i>Deightoniella</i> spp.	1	0.01
<i>Epicoccum nigrum</i>	1	0.00
<i>Epicoccum</i> spp.	1	0.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0.03
<i>Fusarium nivale</i>	1	0.00
<i>Fusarium</i> spp.	1	0.00
<i>Helminthosporium sativum</i>	4	0.02
<i>Leptosphaeria korrae</i>	2	0.06
<i>Leptosphaeria nodorum</i>	2	0.00
<i>Lambertella subrenispora</i>	1	0.01
<i>Monilinia</i> spp.	2	0.09
<i>Mortierella epigama</i>	1	0.03
<i>Myriosclerotinia dennisii</i>	1	0.00
<i>Penicillium</i> spp.	6	0.04
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	3	0.04
<i>Pythium aphanidermatum</i>	2	0.02
<i>Phoma</i> spp.	1	0.00
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2	1.43
<i>Rhizoctonia solani</i>	3	0.00
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2	0.01

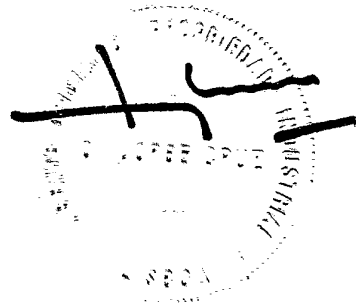


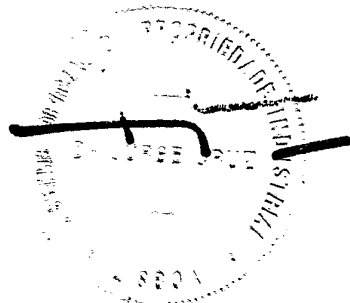
Tabela 10

Testes com dois anticorpos usando o sobrenadante da linha celular M14C6 como anticorpo de captura (concentração de anticorpo 5 µg/ml, diluente tampão carbonato pH 9,6). O conjugado usado foi soro de carneiro anti-Mycosphaerella fijiensis (concentração 5 µg/ml, diluente 0,1% BSA/PBS). Os antígenos usados foram cultura pura de Mycosphaerella fijiensis, folhas de bananeira infectadas com Mychosphaerella fijiensis e folhas de bananeira saudáveis.

Antígeno

Mf14C6

Folhas de bananeira infectadas com <u>Mycosphaerella fijiensis</u>	
variegado (infecção ligeira)	0,045
manchado (altamente infectado)	1,289
Folhas de bananeira saudáveis	0,000
Isolado de <u>Mycosphaerella fijiensis</u> 10 µg/ml	2,00+
0,1% de Albumina Sérica Bovina	0,000



BIBLIOGRAFIA

DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", in: Antibody As a Tool, Marchalonis *et al*, John Wiley & Sons, Ltd., pp 189-231 (1982)

Farr, DF *et al*, Fungi on Plant and Plant Products in the United States, APS Press, Minneapolis: 1252 pp. (1989).

Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, New York, 1983.

Hammerling (Eur. J. Immunol. 7:743, 1977).

Köhler and Milstein Nature, 256: 495-497, (1975).

Littlefield JW, Science, 145:709 (1964).

Shulman *et al*, Nature, 276: 269-270 (1978).

U.S. Patent No. 4,845,197

U.S. Patent No. 4,803,155

U.S. Patent No. 4,879,217



REIVINDICAÇÕES:

1a. - Linha celular de hibridoma, caracterizada por produzir um anticorpo monoclonal que reage especificamente com pelo menos uma espécie de Mycospharella.

2a. - Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o anticorpo reagir com pelo menos uma espécie seleccionada do grupo constituído por M. fijiensis, M. fijiensis var difformis, M. graminicola e M. musicola.

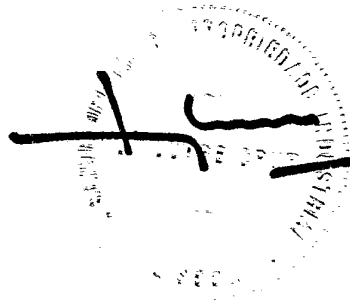
3a. - Linha celular de hibridoma de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada por o anticorpo reagir com apenas uma espécie de Mycosphaerella.

4a. - Linha celular de hibridoma de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizada por o anticorpo reagir com mais de uma espécie de Mycosphaerella.

5a. - Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por a espécie ser M. graminicola.

6a. - Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 5, caracterizada por ter as características de identificação da ATCC 10186 ou de um seu mutante ou variante.

7a. - Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por ter as características de identificação da ATCC HB 10413 ou de um seu mutante ou variante.



8a. - Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 4, caracterizada por ter as características de identificação da ATCC HB 10414 ou de um seu mutante ou variante.

9a. - Anticorpo monoclonal, caracterizado por reagir especificamente com pelo menos uma espécie de Mycosphaerella.

10a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por reagir com pelo menos uma espécie selecionada do grupo constituído por M. fijiensis, M. fijiensis var. difformis, M. graminicola e M. musicola.

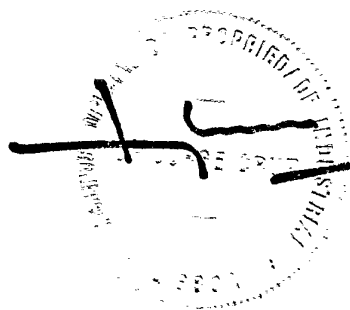
11a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado por reagir com apenas uma espécie de Mycosphaerella.

12a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado por reagir com mais de uma espécie de Mycosphaerella.

13a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a espécie ser M. graminicola.

14a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10186 ou de um seu mutante ou variante.

15a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10413 ou de um seu mutante ou variante.



16a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10414 ou de um seu mutante ou variante.

17a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por ser produzido como resposta a um extracto de micélio ou de conídios de Mycosphaerella fijiensis.

18a. - Anticorpo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por ser produzido como resposta a um extracto de esporos germinados de Mycosphaerella graminicola.

19a. - Método para a detecção da presença ou ausência de Mycosphaerella numa amostra suspeita de conter antigénios de Mycosphaerella, caracterizado por compreender o contacto da amostra com um anticorpo monoclonal que reage especificamente com pelo menos uma espécie de Mycosphaerella, e a observação da presença ou ausência de uma reacção de ligação antigénio-anticorpo.

20a. - Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por compreender o contacto da amostra com dois anticorpos monoclonais que reagem especificamente com pelo menos uma espécie de Mycosphaerella, em que um dos anticorpos está imobilizado e o outro anticorpo está marcado com uma molécula repórter.

21a. - Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o anticorpo reagir com pelo menos uma espécie seleccionada do grupo constituído por M. fijiensis, M. fijiensis var. difformis, M. graminicola e M. musicola.



22a. - Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por pelo menos um dos anticorpos reagir com pelo menos uma espécie seleccionada do constituido por M. fijiensis var. difformis, M. graminicola e M. musicola.

23a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 ou 21, caracterizado por o anticorpo reagir com apenas uma espécie de Mycosphaerella.

24a. - Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 ou 22, caracterizado por pelo menos um dos anticorpos reagir com apenas uma espécie de Mycosphaerella.

25a. - Método de acordo com e qualquer uma das reivindicações 19 ou 21, caracterizado por o anticorpo reagir com mais de uma espécie de Mycosphaerella.

26a. - Método de acordo com e qualquer uma das reivindicações 20 ou 22, caracterizado por pelo menos um dos anticorpos reagir com mais de uma espécie de Mycosphaerella.

27a. - Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado por a espécie ser M. graminicola.

28a. - Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por a espécie ser M. graminicola.

29a. - Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por um anticorpo ser monoclonal e um anticorpo ser policlonal.

30a. - Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por o anticorpo ser produzido por uma linha celular de

hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10186 ou de um seu mutante ou variante.

31a. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o anticorpo ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10186 ou de um seu mutante ou variante.

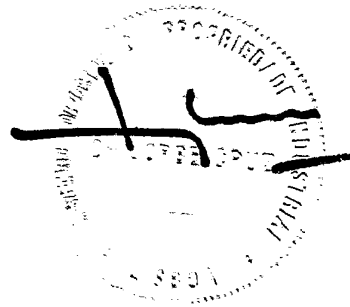
32a. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o anticorpo ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10413 ou de um seu mutante ou variante.

33a. - Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o anticorpo ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10413 ou de um seu mutante ou variante.

34a. - Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o anticorpo ser produzido por uma linha celular que tem as características de identificação de ATCC HB 10414 ou de um seu mutante ou variante.

35a. - Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado por o anticorpo ser produzido por uma linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10414 ou de um seu mutante ou variante.

36a. - Equipamento ("Kit") de diagnóstico para a detecção imunológica da presença ou ausência de Mycosphaerella numa amostra suspeita de conter antigénios de Mycosphaerella, caracterizado por compreender um anticorpo ligado a um suporte sólido e um anticorpo marcado com uma molécula repórter, sendo



ambos os anticorpos capazes de reagir com Mycosphaerella e reagindo pelo menos um especificamente com Mycosphaerella.

37a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 36, caracterizado por o anticorpo contra Mycosphaerella reagir com pelo menos uma espécie seleccionada do grupo constituído por M. fijiensis, M. fijiensis var. difformis, M. graminicola e M. musicola.

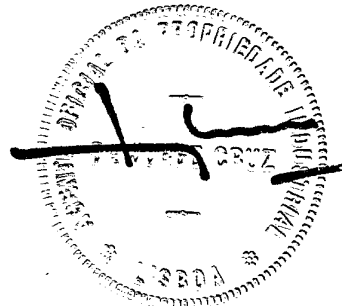
38a. - Equipamento de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 ou 37, caracterizado por o anticorpo específico de Micosphaerella reagir com mais de uma espécie de Mycosphaerella.

39a. - Equipamento de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 ou 37, caracterizado por o anticorpo específico de Mycosphaerella reagir com apenas uma espécie de Mycosphaerella.

40a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por a espécie ser M. graminicola.

41a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por conter o anticorpo produzido pela linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10186.

42a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por conter o anticorpo produzido pela linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10413.



43a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por conter o anticorpo produzido pela linha celular de hibridoma que tem as características de identificação de ATCC HB 10414.

44a. - Equipamento de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 ou 37, caracterizado por a molécula repórter ser uma enzima.

45a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 44, caracterizado por também compreender um substrato da enzima.

46a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por pelo menos um anticorpo ser específico de M. fijiensis.

47a. - Equipamento de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por pelo menos um anticorpo ser específico de M. fijiensis var. difformis.

48a. - Método para a preparação de uma linha celular de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que reage especificamente com pelo menos uma espécie do género Mycosphaerella, caracterizado por compreender:

- (a) a imunização de um animal dador com um extracto de Mycosphaerella;
- (b) o isolamento de células B imunocompetentes a partir de um animal dador imunizado;
- (c) a fusão de células B com células de uma linha celular imortal;



- (d) detecção dos produtos de fusão e identificação dos que produzem anticorpos tendo especificidade para Mycosphaerella;
- (e) clonagem do produto de fusão isolado no passo (d) para se obter uma linha celular de hibridoma pura que produza um anticorpo monoclonal tendo especificidade para Mycosphaerella.

49a. - Método para a preparação de um anticorpo monoclonal que reaja especificamente com pelo menos uma espécie de Mycosphaerella, caracterizado por compreender a cultura de uma linha celular de hibridoma capaz de produzir tais anticorpos em condições que conduzem à produção de anticorpos e o isolamento dos anticorpos assim produzidos.

50a. - Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado por a cultura da linha celular de hibridoma ser realizada in vivo ou in vitro.

Lisboa, 27 de Junho de 1991

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