



(11) Número de Publicação: PT 690071 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)
C07K016/40 A C12N005/20 B
A61K047/48 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1995.05.30	(73) Titular(es): JOHNSON & JOHNSON CLINICAL DIAGNOSTICS, INC. 100 INDIGO CREEK DRIVE ROCHESTER NEW YORK 14650 US
(30) Prioridade: 1994.05.31 US 251496	
(43) Data de publicação do pedido: 1996.01.03	(72) Inventor(es): KEVIN M. GORMAN US JOHN L. DAISS US
(45) Data e BPI da concessão: 2000.12.27	(74) Mandatário(s): PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) Epígrafe: ANTICORPOS MONOCLONAIS INIBIDORES E ANTI-INIBIDORES ESPECÍFICOS PARA A PEROXIDASE DE RÁBANO

(57) Resumo:

ANTICORPOS MONOCLONAIS INIBIDORES E ANTI-INIBIDORES ESPECÍFICOS
PARA A PEROXIDASE DE RÁBANO



DESCRIÇÃO

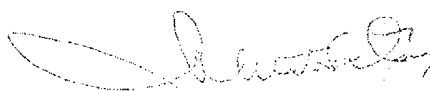
"ANTICORPOS MONOCLONAIS INIBIDORES E ANTI-INIBIDORES ESPECÍFICOS PARA A PEROXIDASE DE RÁBANO"

Campo da Invenção

Esta invenção refere-se a anticorpos monoclonais específicos para peroxidase de rábano. Em particular, refere-se a dois tipos de anticorpos monoclonais: os que inibem a actividade da enzima (aqui identificados como "inibidores", e os que evitam a ligação dos anticorpos "inibidores" à peroxidase de rábano (aqui identificados como "anti-inibidores"). Esta invenção refere-se também a conjugados destes anticorpos e aos hibridomas a partir dos quais foram obtidos. Tais anticorpos possuem um número de utilizações incluindo a sua utilização em ensaios de diagnóstico, como abaixo descrito.

Antecedentes da Invenção

Os anticorpos são normalmente sintetizados por células linfóides derivadas de linfócitos B na medula óssea. Os linfócitos individuais não podem ser cultivados directamente para produzir um anticorpo específico. No entanto, Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975) demonstraram que um processo de fusão de células somáticas especialmente entre uma célula de mieloma e um linfócito, podiam produzir células que crescem em cultura e produzem um anticorpo específico. O híbrido é aqui e na arte de um modo geral denominado célula de "hibridoma". Num procedimento típico de fusão, os linfócitos do baço de um animal imunizado contra um antigénio seleccionado são fundidos com células de mieloma. Os hibridomas resultantes são então dispersos numa série de tubos de cultura separados ou em poços de placa de microtitulação, para pesquisar culturas que proporcionem o desejado anticorpo específico para o antigénio. As culturas positivas são posteriormente diluídas para obter colónias originárias de uma única célula (ou clone). Os clones



são novamente pesquisados para a produção do anticorpo desejado, que é conhecido na arte como um anticorpo "monoclonal".

Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos para um único determinante ou um único antigénio, ao contrário dos convencionais anticorpos "policlonais" contendo moléculas específicas para vários determinantes do antigénio. Os anticorpos monoclonais são úteis para melhorar a selectividade e especificidade de métodos de diagnóstico e de terapêutica, utilizando ligação imunológica. São também isentos de contaminação por outras imunoglobulinas.

Embora a produção de anticorpos monoclonais seja conhecida há algum tempo, permanecem dificuldades na preparação de anticorpos consistentemente específicos. Por qualquer razão, a escolha da espécie animal e da linha celular de mieloma e a técnica de selecção utilizada para isolar a linha celular de hibridoma desejada são todas importantes para o resultado final.

A peroxidase de rábano (H_2O_2 : oxidorreductase do dador, E.C. 1.11.1.7) tem sido um marcador enzimático útil em diagnóstico imunológico e em reacções imunohistoquímicas durante muitos anos. As suas principais vantagens são o seu elevado número de reprocessamento e a sua relativa falta de especificidade para o substrato, permitindo que a sua actividade seja expressa através da geração de uma variedade de sinais colorimétricos, electroquímicos ou quimioluminiscentes. Adicionalmente, a peroxidase de rábano é relativamente estável em relação à desnaturação de superfície, liofilização e outras condições potencialmente perigosas de fabrico e armazenamento.

Têm sido desenvolvidos tanto anticorpos policlonais como monoclonais específicos para a peroxidase de rábano, que possuem vários graus de efeito inibidor sobre as propriedades enzimáticas da enzima (ver por exemplo, Marucci, *Immunochemistry*, 10, páginas 278-280, 1973; Conroy et al, *Immunochemistry*, 13, páginas 599-603, 1976; Conroy et al, *Molecular Immunology* 19(5), páginas 659-663, 1982; Conroy et al,



Molecular Immunology 20(6), páginas 647-653, 1983; Boot et al, *J. Immun. Methods*, 103, páginas 69-77, 1987; e David A. Tipton, Tese de Ph.D. Universidade do Estado de Memphis, Dezembro 1988).

EP-A-0 137 657 (publicada em 17 de Abril, 1985) descreve a produção de anticorpos monoclonais específicos contra peroxidase de rábano que não interferem com a actividade da enzima.

Tipton et al., (*Hybridoma*, 9, 319-330, 1990) e Kolosova et al., (*Biochimija*, 53, 1858-1863, 1988) revelam anticorpos monoclonais possuindo afinidade para peroxidase de rábano que diferem dos presentemente reivindicados. A utilização dos anticorpos monoclonais para bloquear a ligação de um inibidor de anticorpos não é revelada nem sugerida em nenhum dos documentos.

Permanece a necessidade de anticorpos "inibidores" que eliminem substancialmente toda (maior do que 95%) a actividade de peroxidase de rábano. Também existe uma necessidade de anticorpos específicos contra peroxidase de rábano que não afectem substancialmente a actividade enzimática mas, quando ligados à enzima, impeçam completamente a ligação à enzima de anticorpos inibidores.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal possuindo as seguintes características:

- a) específico contra peroxidase de rábano,
- b) ser da classe IgG,
- c) uma constante de dissociação menor do que ou igual a cerca de 50 nmolar, e
- d) ligar-se à peroxidase de rábano de tal modo que a actividade enzimática da peroxidase de rábano determinada colorimetricamente seja diminuída em não mais do que 20%, e a ligação de qualquer outro anticorpo inibidor específico contra peroxidase de rábano a peroxidase de rábano seja substancialmente bloqueada.



Esta invenção também proporciona linhas celulares de hibridoma a partir dos quais o anticorpo monoclonal acima descrito pode ser produzido.

Além disso, é também proporcionado um conjugado solúvel em água, que é formado a partir do anticorpo monoclonal acima descrito e de um ligando de ligação específica.

É também proporcionado por esta invenção um segundo tipo de anticorpo monoclonal que possui as seguintes características:

- a) específico contra a peroxidase de rábano;
- b) ser da classe IgG,
- c) uma constante de dissociação menor do que ou igual a cerca de 25 nmolar, e
- d) ligar-se a peroxidase de rábano de tal modo que iniba a actividade enzimática da peroxidase de rábano em pelo menos 95%.

A presente invenção proporciona ainda um conjugado solúvel em água formado a partir do segundo tipo de anticorpo monoclonal acima descrito e de um ligando de ligação específica.

Novamente, contudo, esta invenção também proporciona uma linha celular de hibridoma a partir da qual o segundo tipo de anticorpo monoclonal acima descrito pode ser produzido.

Encontrámos anticorpos monoclonais específicos apenas contra peroxidase de rábano que possuem propriedades altamente desejáveis. Uma classe destes anticorpos, aqui identificada como anticorpos "anti-inibidores", não inibe a actividade enzimática, mas impede a ligação à enzima daqueles que inibem a actividade enzimática (aqui identificados como anticorpos "inibidores"). Ambos os tipos de anticorpos podem ser utilizados vantajosamente em vários métodos imunológicos e imunohistoquímicos. Em particular, podem ser utilizados com vantagem em ensaios de ligação específica que são definidos em maior detalhe no pedido de patente Europeia co-pendente N° 95303655.5 aqui arquivado contemporaneamente (ficheiro do advogado N°. P13962EP) reivindicando prioridade a partir de USSN 250883.



Estes anticorpos possuem uma especificidade única. Isto é, não são bi-específicos ou reactivos com mais do que um ligando.

Descrição Detalhada da Invenção

Como aqui utilizado, o termo "anticorpo monoclonal" inclui todas as moléculas de imunoglobulina possuindo uma especificidade única como é convencional na arte. Adicionalmente, o termo pretende incluir fragmentos preparados quimicamente [tais como fragmentos Fab, F(ab)', F(ab)₂] de tais moléculas e equivalentes destes preparados geneticamente (tais como "fragmentos de anticorpo de cadeia única" ou fragmentos ScFv).

Os anticorpos monoclonais desta invenção possuem várias utilizações em técnicas de diagnóstico e terapêuticas. Estas podem incluir a detecção, identificação ou localização de antígenos específicos, receptores e sítios de superfície celular e outras utilizações que seriam imediatamente óbvias para um especialista na técnica.

Geralmente, os anticorpos monoclonais são preparados imunizando um mamífero adequado (tal como um murganho ou rato) com peroxidase de rábano nativa (Servac Corporation, Capetown, África do Sul), ou com a enzima conjugada a proteínas transportadoras tais como IgG de murganho (Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania) ou proteína C reactiva (Scripps, La Jolla, California), seguido de procedimentos convencionais descritos por Kohler et al., *supra*. Por exemplo, cada imunização pode ser realizada com 100 µg de enzima ou conjugado em adjuvante TDM/MPL (RIBI Corporation, Hamilton, Montana) por murganho a cada cinco semanas. Foi fornecida uma imunização final de reforço contendo antígeno em solução salina tamponada com fosfato, 4 a 5 dias antes da fusão de hibridomas.

Uma população de esplenócitos dos animais imunizados pode ser lavada em soro de bovino fetal a 10% (DMEM a 10%), suspendida durante cinco minutos num tampão de lise (cloreto de amónio a 155 mmolar, bicarbonato de potássio a 10 mmolar e ácido



etilenodiaminatetracético a 0,1 molar), e lavada novamente duas vezes com DMEM sem soro. A fusão com células de hibridoma adequadas pode ser realizada na presença de polietilenoglicol (PEG1450) ou outro fusogénio de acordo com os ensinamentos de Lane [*J. Immunol. Methods* 81, páginas 223-228 (1985)]. As células hibridadas resultantes são então diluídas em meios selectivos, distribuídas em placas de microtitulação e cultivadas durante 7 a 21 dias antes da pesquisa, para observar que tipo de propriedades possuem os anticorpos.

Estão comercialmente disponíveis uma variedade de linhas celulares de mieloma para hibridação com as células do baço de mamífero. Fontes de tais linhas celulares incluem a American Type Culture Collection (ATCC) em Rockville, Maryland. Linhas celulares de mieloma particularmente úteis incluem as linhas celulares de mieloma Sp2/O-Ag14 e P3x63Ag8.653, ambas disponíveis na ATCC. É preferida a primeira linha celular.

A pesquisa para a produção de anticorpos é um passo crítico na tecnologia de hibridomas. Os sobrenadantes da cultura de hibridomas acima descrita podem ser pesquisados através de três ensaios independentes. O primeiro ensaio permite escolher anticorpos que são específicos para peroxidase de rábano utilizando Ensaios de Imunoabsorção Ligados a Enzima (ELISA) convencionais, em placas de microtitulação de poliestireno contendo conjugado de peroxidase de rábano adsorvido.

Especificidade para Peroxidase de Rábano:

Uma amostra (50 µl/poço de placa) de cada sobrenadante da cultura é colocada num poço de microtitulação revestido com um conjugado de peroxidase de rábano e um anticorpo irrelevante que serviu para mediar a adsorção de peroxidase de rábano à placa de microtitulação. Este anticorpo pode ser obtido, por exemplo, de Jackson Immunoresearch. Após uma incubação de 30-60 minutos as placas são lavadas com uma solução tamponada adequada de um agente tensioactivo não iónico e a presença de anticorpos monoclonais de murganho ou de rato específicos contra peroxidase



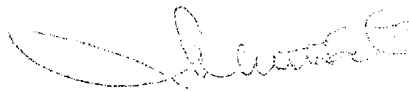
de rábano é detectada com um conjugado de IgG anti-murganho ou IgG anti-rato e fosfatase alcalina (conjugado com Fc anti-murganho obtido, por exemplo, de Jackson ImmunoResearch). Um sinal corado pode ser gerado adicionando o substrato sal dissódico de p-nitrofenilo (4 mg/ml) em tampão tris(hidroximetil)aminometano (1,5 molar, pH 8). Podem ser utilizados de um modo semelhante outros reagentes produtores de sinal (tais como outros substratos), ou outros marcadores enzimáticos. Os anticorpos pesquisados que proporcionam um sinal corado após cerca de 30 minutos que é pelo menos duas vezes mais denso do que o sinal de fundo são considerados como sendo específicos para peroxidase de rábano. O sinal corado pode ser medido utilizando um leitor de placas de microtitulação convencional ou um espectrofotômetro.

Os anticorpos específicos contra peroxidase de rábano podem ser pesquisados para a função inibidora como se segue:

Ensaio para Inibição Enzimática:

Uma amostra (50 µl) de cada sobrenadante de cultura é colocada num poço de placa de microtitulação, seguido por adição de uma solução (50 µl) de peroxidase de rábano (0,2 nmolar) e gelatina (0,8%) em salino tamponado com fosfato, e as misturas resultantes são deixadas permanecer durante 10 minutos à temperatura ambiente. A actividade enzimática residual é então determinada adicionando 100 µl do substrato da peroxidase de rábano, O-fenilenodiamina (1 mg/ml), em tampão citrato/fosfato (50 mmolar, pH 5,5), e medindo a quantidade de sinal corado a 450 nm utilizando um leitor de microplacas convencional que pode ser adaptado para cinética. Podem ser utilizados de modo semelhante outros substratos ou reagentes que proporcionem cor.

Esses sobrenadantes de culturas que inibem a peroxidase de rábano em mais do que 20% (em comparação com um controlo sem a presença de anticorpo monoclonal) são considerados para posterior investigação como anticorpos inibidores.



Os anticorpos avaliados deste modo são sujeitos a posterior avaliação para avaliar quais estão dentro do âmbito da presente invenção, nomeadamente os que inibem a actividade de peroxidase de rábano em pelo menos 95%, em comparação com o sinal produzido pela enzima na ausência dos anticorpos. Esta avaliação foi realizada através do procedimento acima descrito.

Os anticorpos específicos para peroxidase de rábano são também pesquisados quanto à sua capacidade de inibir a ligação de anticorpos inibidores à enzima.

Ensaio para Anti-Inibição:

Uma amostra (25 μ l) de peroxidase de rábano (0,4 nmolar) é adicionada a cada poço de uma placa de microtitulação, seguido de adição de uma amostra (50 μ l) de cada sobrenadante de cultura, incubada durante 30 minutos, seguido pela adição de um anticorpo monoclonal inibidor 4-22.2 (25 μ l, 15 nmolar, definido abaixo na Tabela I). Após uma incubação de 10 minutos, é adicionada solução de substrato (100 μ l) e o sinal corado de actividade de peroxidase é avaliado como acima descrito (isto é, utilizando O-fenilenodiamina como substrato). Os anticorpos anti-inibidor dentro do âmbito desta invenção são definidos como aqueles que bloqueiam a inibição de peroxidase de rábano através do anticorpo inibidor 4-22.2 aqui descrito. Geralmente, o anticorpo inibidor é adicionado a um nível suficiente para inibir 80-90% de actividade enzimática e mais do que 30% da actividade enzimática é medida após co-incubação com um anticorpo anti-inibidor.

Quando utilizado para modificar a percentagem de inibição da actividade enzimática na revelação e nas reivindicações, o termo "cerca" refere-se a uma variação de $\pm$ 5%. Quando utilizado para modificar os valores de K_d aqui, o termo "cerca" refere-se a uma variação de $\pm$ 50%.

Na preparação de anticorpos monoclonais desta invenção, os hibridomas seleccionados foram clonados, em agar mole, e clones



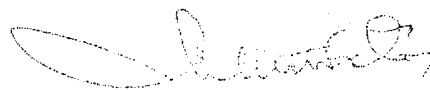
individuais foram removidos, cultivados utilizando meios convencionais e pesquisados utilizando os procedimentos acima descritos. Os anticorpos monoclonais foram crescidos em frascos de cultura e os anticorpos recolhidos e purificados utilizando cromatografia de afinidade convencional em Proteína A ou Proteína G imobilizadas. Podem ser utilizados, se desejável, outros procedimentos de purificação convencionais.

As constantes de dissociação (K_d) para anticorpos inibidores foram determinadas medindo a concentração do anticorpo necessário para inibir 50% de actividade de peroxidase de rábano (em comparação com a actividade enzimática na ausência de anticorpo). Os anticorpos inibidores desta invenção geralmente possuem uma K_d menor do que ou igual a 25 nmolar, preferencialmente uma K_d menor ou igual a 1 nmolar, e mais preferencialmente uma K_d menor ou igual a 0,5 nmolar.

Os valores de K_d para anticorpos anti-inibidores foram determinados medindo a concentração do anticorpo necessária para impedir 50% da inibição de peroxidase de rábano a 0,1 nmolar por anticorpo inibidor 4-22.2 a 10 nmolar (definido abaixo na Tabela I), que se determinou inibir cerca de 99% da actividade enzimática como acima definido. Estes valores de K_d são geralmente menores ou iguais a 50 nmolar, mais preferencialmente menores ou iguais a 25 nmolar e mais preferencialmente menores ou iguais a 5 nmolar. Preferencialmente, estes anticorpos diminuem a actividade de peroxidase de rábano em não mais do que 6%.

Deve ser entendido que estes valores de K_d são medições relativas para os anticorpos e que métodos alternativos para medir esse parâmetro podem produzir valores superiores ou inferiores.

Todos os anticorpos monoclonais desta invenção são da classe IgG. A determinação do isotipo das culturas de anticorpos clonados é alcançada utilizando ensaios de isotipagem convencionais e "kits" de testes que estão comercialmente



disponíveis. A peroxidase de rábano pode ser imobilizada em vários suportes, directamente ou indirectamente, para os ensaios de isotipagem.

A Tabela I que se segue lista anticorpos monoclonais inibidores úteis representativos desta invenção por espécie de origem, isotipo, K_d e inibição máxima de peroxidase de rábano:

Tabela I

<u>Anticorpo</u>	<u>Espécie/Isotipo</u>	<u>Kd (nmolar)</u>	<u>Inibição Máx. (%)</u>
4-22.2	rato*/IgG1	0,14	99
3-8.1	murganho**/IgG2a	25	97

* ratos Sprague-Dawley

** murganhos Swiss/Webster

O anticorpo monoclonal 4-22.2 identificado acima é preferido. É preparado utilizando a nova linha celular de hibridoma aqui identificada como HB 11603 que foi depositada na ATCC de acordo com o Tratado de Budapeste.

A seguinte Tabela II lista anticorpos monoclonais anti-inibidores úteis desta invenção, por espécie de origem, isotipo, K_d e inibição máxima de peroxidase de rábano:

TABELA II

<u>Anticorpo</u>	<u>Espécie/Isotipo</u>	<u>Kd (nmolar)</u>	<u>Inibição Máx. (%)</u>
7-32.2	Murganho/IgG2a	3,3	0
6-09.1	Rato*/IgG2a	3,5	6
6-82.1	Rato*/IgG2a	7,0	10
6-71.2	Rato*/IgG2a	10	8
6-55.2	Rato*/IgG1	20	6

* ratos Sprague-Dawley

O anticorpo monoclonal 7-32.2 é preferido. É preparado utilizando a nova linha celular de hibridoma aqui identificada como HB 11604 que foi depositada na ATCC de acordo com o Tratado



de Budapeste. O anticorpo monoclonal 6-89.1 é preparado utilizando uma nova linha celular de hibridoma aqui identificada como HB 11635 que também foi depositada na ATCC de acordo com o Tratado de Budapeste.

Os anticorpos anti-inibidores desta invenção podem ser utilizados para preparar vários conjugados solúveis em água para utilização em vários procedimentos de diagnóstico e terapêuticos, tais como imunoensaios de ligação competitiva e outros protocolos de ensaio como descritos em maior detalhe no pedido de patente Europeia co-pendente identificada acima.

Um tal conjugado é um produto de reacção do anticorpo anti-inibidor e um ligando de ligação específica. O conjugado pode ser preparado utilizando qualquer técnica convencional da arte para ligar covalentemente proteínas a outras proteínas, hormonas, fármacos ou outros compostos químicos possuindo os grupos reactivos requeridos. Assim, os vários grupos reactivos dos anticorpos e o ligando podem ser considerados na escolha dos meios para produzir o conjugado, incluindo tais grupos, mas não estando limitados a, grupos carboxilo, amino, hidroxilo, tiol e imidazole. Métodos de ligação úteis incluem, mas não estão limitados a, ligação de péptidos, oxidação por periodato, utilização de glutaraldeído, carbodiimidas ou N-hidroxisuccinimida e outros prontamente óbvios para um especialista na técnica. Detalhes para cada um destes ou de outros métodos são encontrados em literatura volumosa, incluindo Williams *et al.*, *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Academic Press, Nova Iorque, 1976, e Yoshitake *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 101, 395 (1979).

Tais ligandos podem incluir qualquer material que é capaz de se ligar especificamente a uma molécula receptora, tais como um anticorpo, e pode incluir antibióticos, drogas, hormonas, péptidos, proteínas, hidratos de carbono e outros materiais prontamente óbvios para um especialista na técnica. Ligandos de ligação específica particularmente úteis incluem compostos



possuindo um peso molecular abaixo de cerca de 1600 daltons, tais como vários fármacos terapêuticos, drogas de abuso, antibióticos e os que são conhecidos como antigénios de substituição (ou péptidos que se comportam como proteínas antigénicas). Ligandos específicos são vancomicina, digoxina, fenobarbital, difenilhidantoína e prostaglandina E₂.

Conjugados solúveis em água dos anticorpos inibidores desta invenção e ligandos de ligação específica podem ser preparados de modo semelhante.

Os seguintes exemplos são fornecidos apenas com objectivos ilustrativos e o âmbito da invenção não deve ser considerado como limitado a estes. Salvo referência em contrário as percentagens são apresentadas em peso.

Exemplo 1 Preparação de Anticorpo Monoclonal Inibidor Específico para Peroxidase de Rábano

O anticorpo monoclonal identificado acima como 4-22.2 na Tabela I foi preparado utilizando a linha celular de hibridoma HB 11603 (ATCC) como se segue:

Ratos Sprague-Dawley foram injectados com uma solução de peroxidase de rábano (400 µg) em adjuvante de emulsão TDM/MPL disponível comercialmente (RIBI Corporation) quatro vezes em intervalos de quatro semanas. Uma quinta e final injeção foi realizada com peroxidase de rábano (400 µg) em solução salina tamponada com fosfato. Três dias mais tarde, esplenócitos dos ratos imunizados foram fundidos com células a partir da linha celular de mieloma Sp2/0-Ag14 utilizando procedimentos convencionais.

A pesquisa dos anticorpos resultantes para especificidade contra peroxidase de rábano foi realizada como descrito acima adicionando 50 µl do sobrenadante da cultura aos poços de uma placa de microtitulação revestidos com um conjugado de peroxidase de rábano e um anticorpo irrelevante que serviu para mediar a adsorção da enzima à placa de microtitulação. O



anticorpo ligado foi detectado adicionando um conjugado de fosfatase alcalina com IgG Fc anti-murganho de cabra (Jackson Immunoresearch), seguido por geração de sinal utilizando sal dissódico de p-nitrofenilfosfato a 4 mg/ml (Sigma Chemical) como substrato para a fosfatase alcalina em tampão tris(hidroximetil)aminometano (1,5 molar, pH 8). O sinal corado foi avaliado após 30 minutos utilizando um leitor de placas de microtitulação convencional.

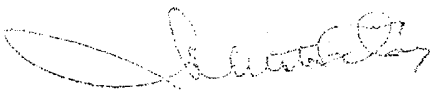
A pesquisa de função inibidora de peroxidase de rábano foi realizada adicionando uma amostra (50 µl) de cada sobrenadante de cultura a poços de placas de microtitulação, seguido por adição de peroxidase de rábano (0,2 nmolar) e gelatina (0,8%) em solução salina tamponada com fosfato e as misturas resultantes foram deixadas durante 10 minutos à temperatura ambiente. A actividade residual foi então determinada adicionando 100 µl de O-fenilenodiamina (1 mg/ml) em tampão citrato/fosfato (50 µl, 50 mmolar, pH 5,5) e medindo o sinal corado a 450 utilizando um leitor de microtitulação adaptado para cinética.

Os anticorpos que inibiram a actividade enzimática em pelo menos 20% foram seleccionados adicionando volumes iguais dos sobrenadantes das culturas o peroxidase de rábano aos poços de placas de microtitulação e utilizando o procedimento descrito acima ("Ensaio para Inibição Enzimática"). O anticorpo 4-22.2 foi determinado inibir a actividade de peroxidase de rábano em pelo menos 99%.

Exemplo 2 Preparação de Anticorpo Monoclonal Anti-Inibidor Específico para Peroxidase de Rábano

O anticorpo monoclonal identificado acima como 6-89.1 na Tabela II foi preparado utilizando a linha celular de hibridoma HB 11635 (ATCC) como se segue:

A imunização de ratos e fusão de esplenócitos resultantes foram realizadas como descrito no Exemplo 1. A pesquisa de actividade de peroxidase de rábano foi realizada como descrito no Exemplo 1, excepto que após as placas terem sido agitadas



durante 10-30 minutos, uma solução (25 µl) do anticorpo inibidor 4-22.2 (cerca de 15 nmolar, descrito acima) foi adicionada a cada poço de placa. As misturas resultantes foram deixadas a incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.

A actividade residual de peroxidase de rábano foi determinada adicionando uma solução (100 µl) de O-fenilenodiamina (1,2 mg/ml) em tampão citrato/fosfato (0,1 molar, pH 5,5) e medindo a quantidade de sinal corado a 450 nm utilizando um espectrofotómetro convencional como descrito no Exemplo 1.

A determinação do anticorpo que é um anti-inibidor foi realizada utilizando o procedimento descrito acima ("Ensaio para Anti-Inibição"). Foi determinado que o anticorpo 6-89.1 diminui a actividade enzimática em apenas 6%.

O anticorpo 7-32.2 (Tabela II) foi preparado de modo semelhante utilizando a linha celular de hibridoma HB 11604 (ATCC).

Exemplo 3 Preparação de Conjugados de Anticorpo Monoclonal Anti-Inibidor e Hapteno de Difenilhidantoína

Foram preparados conjugados solúveis em água de um hapteno de difenilhidantoína e dois anticorpos monoclonais anti-inibidores desta invenção. Esta preparação é apenas representativa e não é essencial para preparar conjugados da presente invenção. Também existem métodos preparatórios alternativos.

O hapteno 5,5-difenil-3-4{4-[4-(3-succinimidoxicarbonilpropionil)-1-piperazinilcarbonil]-butil}-2, 4-imidazolidinediona, foi preparado através de procedimentos descritos no Exemplo 2 Preparatório de EP-A-0 517 327 (publicado a 5 de Maio, 1993).

Este hapteno foi conjugado com os anticorpos monoclonais identificados como 7-32.3 ou 6-89.1 (Tabela II) numa razão molar de 9:1 ou 18:1, adicionando hapteno concentrado lentamente gota



a gota em sulfóxido de dimetilo, a uma solução de qualquer dos anticorpos (1 mg/ml) em tampão N-[2-hidroximetil]piperizina-N'-[ácido 3-propanossulfônico] (0,1 molar, pH 8). As misturas resultantes foram incubadas à temperatura ambiente durante 4 horas, depois dializadas durante a noite em solução salina tamponada com fosfato. O produto final dos conjugados foi filtrado através de um filtro de 0,22 μ metros comercialmente disponível (Nalge Corporation, Rochester, N.Y.). A concentração final de proteína foi determinada através da absorvância a 280 nm utilizando um espectrofotômetro comercialmente disponível (Beckman Instruments).

Exemplo 4 Preparação de Conjugados de Anticorpo Monoclonal Anti-Inibidor e Hapteno de Fenobarbital

Dois conjugados solúveis em água de um hapteno de fenobarbital e anticorpos monoclonais anti-inibidores desta invenção foram preparados do seguinte modo. Esta preparação é apenas representativa e não é essencial para a preparação de conjugados da presente invenção. Também existem métodos preparatórios alternativos.

O hapteno, 5-etil-5-fenil-1-{4-[4-(3-succinimidoxicarbonilpropionil)-1-piperazinilcarbonil]-butil}-2,4,6-(1H,3H,5H)pirimidinetriona foi preparado através de procedimentos descritos no Exemplo 4 Preparatório de EP-A-0 517 327 (publicado em 5 de Maio, 1993).

Este hapteno foi conjugado com os anticorpos monoclonais identificados como 7-32.3 ou 6-89.1 (Tabela II) numa razão molar de 9:1, 18:1 ou 27:1, adicionando hapteno concentrado lentamente gota a gota em sulfóxido de dimetilo, a uma solução de qualquer um dos anticorpos (1 mg/ml) em tampão N-[2-hidroxietil]piperizina-N'-[ácido 3-propanossulfônico] (0,1 molar, pH 8). As misturas resultantes foram incubadas à temperatura ambiente durante 4 horas, depois dializadas durante a noite em solução salina tamponada com fosfato. Os produtos finais de



conjugados foram filtrados através de um filtro de 0,22 μ metros comercialmente disponível (Nalge Corporation, Rochester, N.Y.). A concentração final de proteína foi determinada através da absorvância a 280 nm utilizando um espectrofotômetro comercialmente disponível (Beckman Instruments).

Exemplo 5 Preparação de Conjugados de Anticorpo Monoclonal Anti-Inibidor e Hapteno de Digoxina

Dois conjugados solúveis em água de um hapteno de digoxina e anticorpos monoclonais anti-inibidores desta invenção foram preparados do seguinte modo. Esta preparação é representativa, na medida em que podem ser utilizados outros métodos para produzir os conjugados.

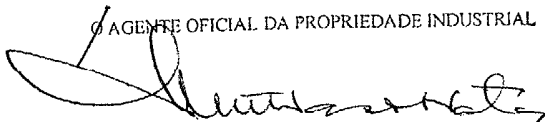
O hapteno foi conjugado com os anticorpos monoclonais identificados como 7-32.3 ou 6-89.1 (Tabela II) diluindo 2 mg de cada anticorpo a 1:1 com acetato de sódio (0,1 molar, pH 5,5), sem exceder 2 ml. Foi adicionado metaperiodato de sódio (1 ml) a 6,66 mg/ml. A mistura de reacção foi coberta com papel de alumínio e agitada em rotação durante 20 minutos à temperatura ambiente. O metaperiodato de sódio em excesso foi removido fazendo passar a mistura de reacção por uma coluna comercialmente disponível PD10 (Pharmacia, Inc.) e pré-equilibrada com acetato de sódio (0,1 molar, pH 5,5). Foram adicionados a frasquinhos 3 mg em 1 ml de digoxigenina-x-hidrazida (Boehringer Mannheim) a cada mistura e incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. Para bloquear a reacção foi adicionada glicina em excesso (concentração final de 10%) a pH 7, seguido por cianoborohidreto de sódio em água para uma concentração final de 20 mmolar. A mistura de reacção foi agitada durante 3 horas à temperatura ambiente e depois dializada durante a noite contra tampão ácido 3-(N-morfolino)propanossulfónico (0,02 molar, pH 7). Os produtos finais dos conjugados foram filtrados através de um filtro de 0,22 μ metros comercialmente disponível (Nalge Corporation,

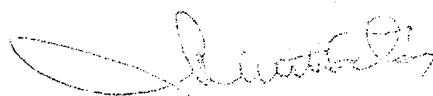
Rochester, N.Y.). A concentração final de proteína foi determinada através da absorvância a 280 nm utilizando um espectrofotómetro comercialmente disponível (Beckman Instruments).

A invenção foi descrita em detalhe com particular referência a realizações preferidas destes, mas deve ser entendido que podem ser realizadas variações e modificações dentro do espírito e âmbito da invenção.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL





REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal possuindo as seguintes características:
 - a) especificidade para peroxidase de rábano,
 - b) ser da classe IgG,
 - c) uma constante de dissociação menor do que ou igual a cerca de 50 nmolar, e
 - d) ligar-se à peroxidase de rábano de tal modo que a actividade enzimática da peroxidase de rábano determinada colorimetricamente é diminuída em não mais do que 20%, e a ligação de qualquer outro anticorpo inibidor específico contra peroxidase de rábano a peroxidase de rábano seja substancialmente bloqueada.
2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 possuindo uma constante de dissociação menor do que ou igual a cerca de 25 nmolar, preferencialmente menor do que ou igual a cerca de 5 nmolar.
3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 que se liga a peroxidase de rábano de tal modo que a actividade enzimática da referida peroxidase é diminuída em não mais do que cerca de 6%.
4. Linha celular de hibridoma a partir da qual o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3 pode ser produzido.
5. Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 4 que está disponível como depósito da ATCC HB 11604 ou HB 11635.

6. Anticorpo monoclonal possuindo as seguintes características:
- a) especificidade para peroxidase de rábano,
 - b) ser da classe IgG,
 - c) constante de dissociação menor do que ou igual a cerca de 25 nmolar, e
 - d) ligar-se a peroxidase de rábano de modo a inibir a actividade enzimática de peroxidase de rábano determinada colorimetricamente em pelo menos 95%.
7. Anticorpo de acordo com a reivindicação 6 possuindo uma constante de dissociação menor do que ou igual a cerca de 1 nmolar, preferencialmente menor do que ou igual a cerca de 0,5 nmolar.
8. Linha celular de hibridoma a partir da qual o anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7 pode ser produzido.
9. Linha celular de hibridoma de acordo com a reivindicação 8, que está disponível como depósito ATCC HB 11603.
10. Conjugado solúvel em água de um ligando de ligação específica e o anticorpo monoclonal de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, 6 e 7, e em que o referido ligando de ligação específica é preferencialmente vancomicina, digoxina, fenobarbital, difenilhidantoína ou prostaglandina E₂.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

