



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0612666-9 A2**

(22) Data de Depósito: 15/06/2006
(43) Data da Publicação: 30/11/2010
(RPI 2082)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/573
G01N 33/53
C12P 21/08

(54) Título: **ANTICORPO MONOCLONAL, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, SUPORTE SÓLIDO, COMPOSIÇÃO, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, IMUNOENSAIOS E ESTOJOS DE DETECÇÃO DOS MESMOS**

(30) Prioridade Unionista: 24/06/2005 US 60/693,818

(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

(72) Inventor(es): LILIAN ZEITOUNI, MICHELE SUSAN YARNALL

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006023418 de 15/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/001895 de 04/01/2007

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, SUPORTE SÓLIDO, COMPOSIÇÃO, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, IMUNOENSAIOS E ESTOJOS DE DETECÇÃO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a área de imunologia e mais especificamente refere-se aos anticorpos monoclonais antifitase, métodos de imunoensalo, kits e reagentes, para a detecção de uma fitase de ou derivada da fitase de E. coli, em particular, a fitase Quantum®. A invenção refere-se ainda a linhagens de células de hibridoma que produz anticorpos monoclonais antifitase.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANTICORPO MONOCLONAL, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, SUPORTE SÓLIDO, COMPOSIÇÃO, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, IMUNOENSAIOS E ESTOJOS DE DETECÇÃO DOS MESMOS"**.

5 Este pedido reivindica o benefício da data de apresentação do Pedido de Patente Provisória U.S. nº 60/693 818, apresentado em 24 de Junho de 2005, o qual é aqui incorporado por referência.

Campo da Invenção

10 A presente invenção refere-se com à área de imunologia e mais especificamente, refere-se a anticorpos monoclonais, métodos de imunoensaio, incluindo ensaios ELISA e em tira imunológica, kits e reagentes, para a detecção de fitase. A presente invenção refere-se ainda com linhagens de células de hibridoma que produzem anticorpos monoclonais antifitase.

Antecedentes da Invenção

15 Existe uma necessidade significativa de um ensaio conveniente, relativamente fácil para detectar a presença de fitase em alimentação animal. Existe também uma grande necessidade para determinar se uma planta foi geneticamente modificada ou se o grão ou gêneros alimentícios processados contêm características de GMO. A necessidade requer métodos de
20 ensaio que possam detectar e quantificar o DNA ou proteína novos. A presente invenção satisfaz esta necessidade ao proporcionar anticorpos monoclonais, linhagens de células de hibridoma, métodos, reagentes e kits imunológicos para detecção e quantificação de fitase.

Sumário da Invenção

25 São proporcionados métodos, kits e reagentes para detectar e medir fitase em uma amostra. Em particular, a fitase é uma fitase bacteriana, mais especificamente uma fitase de *E. coli*, e mais particularmente, uma fitase Quantum®. A fitase é produzida em vários micro-organismos, incluindo mas não se limitando a *Escherichia coli*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Pi-*
30 *chia pastoris* ou em vegetais, incluindo mas não se limitando, por exemplo, a milho, trigo, arroz, colza e luzerna. Em particular, a fitase é detectada em alimentos ou em plantas geneticamente modificadas contendo um gene que

codifica a proteína. Os alimentos são alimentos para animais. Os alimentos para animais podem ser para monogástricos ou ruminantes. Os alimentos podem ser alimentos em calda e/ou alimentos granulados.

Os reagentes incluem proteína purificada e anticorpos específicos para a fitase. A proteína fitase pode ser isolada de corpos de inclusão de *E. coli* e administrada em animais para produzir anticorpos policlonais ou monoclonais. Alternativamente, a proteína pode ser isolada de um extrato celular solúvel, tal como um extrato celular de *E. coli*.

Os anticorpos têm sensibilidade e especificidade elevadas para a fitase e são úteis em métodos de imunoensaio para a detecção de fitase enzimaticamente ativa em animais ou em organismos geneticamente modificados.

Os métodos são imunoensaios que utilizam os anticorpos monoclonais aqui descritos e são capazes de detectar concentrações baixas de fitase. Os anticorpos são purificados e por esse motivo reagem muito pouco com outras proteínas que possam estar presentes na amostra. Os anticorpos e/ou proteína estão reunidos em um kit com reagentes convencionais de imunoensaio para detecção da fitase.

Tendo em consideração o referido acima, existe uma necessidade real para o desenvolvimento de tecnologia que permita a identificação de fitases específicas em amostras.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 é um gráfico que mostra uma curva padrão para a atividade da fitase.

A Figura 2 é um gráfico que mostra a atividade relativa em percentagem contra o tempo de incubação a 99°C da enzima fitase em um ensaio ELISA e em um ensaio de atividade da enzima. A detecção da enzima fitase na ELISA correlaciona diretamente com a quantidade de atividade detectada no ensaio de atividade da enzima.

A Figura 3 é uma reprodução digitalizada dos ensaios de tira imunológica que mostram a detecção de fitase (seta) após incubação a 99°C durante até uma hora. Observa-se uma redução na detecção de fitase após

cerca de 20 minutos a 99°C.

A Figura 4 é uma representação de um kit de imunoensaio exemplificativo e o método de utilização do mesmo.

As Figuras 5A-C são uma série de três tiras imunológicas que mostram uma comparação do revestimento de anticorpos monoclonais antifitase e a sua capacidade para detectar a fitase em amostras de ensaio de alimentos à base de milho contendo fitase a concentrações de 0 U/kg; 250 U/kg; ou 500 U/kg. A Figura 5A mostra as três tiras imunológicas de nitrocelulose revestida com anticorpos monoclonais PHY46 como o anticorpo de revestimento; a figura 5B mostra as três tiras imunológicas de nitrocelulose revestida com PHY36 monoclonal como o anticorpo de revestimento e a figura 5C mostra as tiras imunológicas de nitrocelulose revestida com PHY37 monoclonal como o anticorpo de revestimento. Utilizou-se PHY34 monoclonal conjugado com ouro para detecção em todas as tiras imunológicas.

A Figura 6 é uma comparação dos ensaios de tira imunológica para a fitase utilizando anticorpos monoclonais antifitase (fila superior) ou anticorpos policlonais antifitase (fila do fundo). As amostras de enzima fitase nas pistas de amostra foram: Pista 9-Ronozyme®; pista 10-Phyzyme®; pista 11-Natuphos®; e pista 12-fitase Quantum®.

A Figura 7 é uma curva padrão de fitase presente nas amostras testadas utilizando um ELISA de anticorpo monoclonal.

As Figuras 8A-K mostram os passos para o ELISA de fitase Quick Quantum®. Figura 8A-moer 300 g de alimentos em um moinho de café; 8B-adicionar 80 mL de tampão de extração a 20 g de amostra; 8C-agitar vigorosamente durante 1 minuto; 8D-deixar o recipiente em repouso durante 30 minutos; 8E-preparar placa e reagentes e trazer até a temperatura ambiente; 8F-adicionar 50 uL de controles ou amostras aos poços; 8G-adicionar 50 uL de conjugado aos poços e incubar durante 30 minutos; 8H-lavar poços 5 vezes com água destilada; 8I-adicionar 100 uL de substrato aos poços e incubar 15 minutos; 8J-interpretar os resultados visualmente ou ler a 650 nm em um leitor de placas e 8K-mostra resultados representativos.

Descrição Detalhada das Modalidades Descritas

São aqui descritos métodos, kits e reagentes para a detecção de fitase em uma amostra. São também descritas linhagens de células monoclonais que produzem anticorpos monoclonais antifitase.

5 A metodologia da invenção pode ser utilizada para detectar qualquer enzima em amostras tais como alimentos para animais. Muitas enzimas de alimentos são conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, conhece-se um número de fitases, cuja detecção pode ser conseguida utilizando a presente invenção. As fitases conhecidas incluem, mas não se limitam às descritas na WO 01/90333, intitulado "Recombinant Bacterial Phytases and Uses Thereof;" WO 99/08539, intitulado "Novel Phytase;" Publicação de Pedido U.S. nº 20030157646, intitulada "Microbially Expressed Thermotolerant Phytase For Animal Feed", e Publicação de Pedido U.S. nº 20030170293, intitulada "Thermotolerant Phytase For Animal Feed," cada um dos quais e todos são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

15 Quando se prepara imunoensaios para detectar a fitase em plantas transgênicas e nos produtos produzidos a partir daquelas (incluindo frações de gêneros alimentícios) é importante que o ensaio tenha a capacidade de detectar a proteína específica. Assim, são muito importantes anticorpos extremamente específicos para o desenvolvimento de produtos comerciais com sucesso.

20 Os reagentes são fitase antigênica e anticorpos antifitase que são extremamente específicos para a fitase. O método é um imunoensaio para a detecção específica, sensível de fitase, especificamente para a detecção de fitase em alimentos para animais e em plantas geneticamente manipuladas, tais como produtos agrícolas. O kit contém os anticorpos antifitase aqui descritos e outros reagentes, em particular os utilizados em um formato de ensaio em tira, para serem utilizados no imunoensaio descrito em mais pormenor a seguir.

Proteína Antigénica

30 Para a preparação de proteína recombinante, tal como fitase, após transformação de uma cepa hospedeira adequada e multiplicação da cepa hospedeira até uma densidade celular apropriada, por exemplo, um

hospedeiro bacteriano, de inseto ou levedura, pode induzir-se um promotor selecionado por meios apropriados (por exemplo, alteração da temperatura ou indução química) e cultivar as células durante um período adicional para produzir enzima recombinante. As células são depois tipicamente colhidas por centrifugação, rompidas por meios físicos ou químicos, e o extrato bruto resultante retido para purificação adicional.

As células microbianas utilizadas na expressão de proteínas podem ser rompidas por qualquer método conveniente, incluindo ciclos de congelação-descongelação, sonicação, ruptura mecânica ou utilização de agentes de lise celular, sendo tais métodos bem conhecidos dos versados na técnica.

A enzima fitase é recuperada e purificada a partir de culturas de células recombinantes por métodos incluindo precipitação com sulfato de amônio ou etanol, extração ácida, cromatografia de troca aniônica ou catiônica, cromatografia em fosfocelulose, cromatografia de interação hidrófoba, cromatografia de afinidade, cromatografia em hidroxiapatite e cromatografia em lectina. Pode utilizar-se passos para redobragem da proteína, consoante necessário, para completar a configuração da proteína madura. Finalmente pode utilizar-se cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para os passos de purificação final.

Anticorpos

Os anticorpos úteis na invenção podem ser preparados utilizando um coelho, galinha, camundongo ou uma cabra. O programa de inoculação não é crítico e pode ser qualquer um normalmente utilizado na técnica para este efeito. Tais procedimentos são descritos, por exemplo, em *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, páginas 92-115.

Os anticorpos preferidos para a detecção de fitase são os anticorpos de coelho, anticorpos de galinha e anticorpos de cabra que são purificados por imunoafinidade contra a fitase recombinante produzida em corpos de inclusão de *E. coli* ou anticorpos monoclonais de camundongo. Para detectar e quantificar a fitase, os anticorpos são marcados, de um modo pre-

ferido, diretamente utilizando etiquetas as quais incluem enzimas, radioisótopos e partículas coloridas tais como esferas de látex ou ouro coloidal. Outra modalidade, os anticorpos são marcados indiretamente, for exemplo, por reação com substâncias marcadas que se ligam ao anticorpo tais como anticorpos secundários, proteína A ou proteína G.

Anticorpos Policlonais

Numa modalidade, os anticorpos são anticorpos policlonais. Os métodos de preparação de anticorpos policlonais são conhecidos do especialista. Os anticorpos policlonais podem ser gerados em um animal, por exemplo, através de uma ou mais injeções de um agente de imunização e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante será injetado no mamífero por injeções múltiplas subcutâneas ou intraperitoneais. O agente de imunização inclui as enzimas alimentares ou suas proteínas de fusão. Por exemplo, o agente é o polipeptídio fitase ou as suas proteínas de fusão.

Os exemplos de adjuvantes incluem o adjuvante completo de Freund e o adjuvante MPL-TDM (monofosforilo Lípido A, trealose dicorinomicolato sintético). O protocolo de imunização pode ser selecionado por um versado na técnica sem experimentação excessiva. Os anticorpos preferidos são extremamente sensíveis para a detecção de proteínas fitase, por exemplo proteínas fitase transgênicas a concentrações relevantes em amostras em bruto de produtos à base de grão nos canais de distribuição. Preferencialmente, os anticorpos detectam a proteína fitase a uma sensibilidade elevada de aproximadamente 0,059 ng/mL. Os anticorpos de elevada sensibilidade são úteis para a detecção de concentrações baixas de proteínas fitases em tecidos de culturas geneticamente manipuladas, tais como, mas não se limitando a, folhas, caules, sementes, talos, raízes e semelhantes, ou produtos derivados de tais culturas, tais como frações de alimentos ou alimentos para animais.

Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos antifitase são anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais foram preparados utilizando métodos de hibridoma, tais

como os descritos por Kohler e Milstein, Nature, 256:495 (1975). Num método de hibridoma imuniza-se tipicamente um camundongo, hamster ou outro hospedeiro animal apropriado, com um agente de imunização para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligam especificamente ao agente de imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

Os anticorpos monoclonais da invenção foram preparados segundo a descrição do Exemplo 6. As linhagens de células de hibridoma foram depositadas em 3 de novembro de 2004 e 2 de fevereiro de 2005 (como se indica abaixo), de acordo com o Tratado de Budapeste no DSZM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemanha. Foram atribuídos os seguintes Números de Acesso às linhagens de células:

	Cultura de células PHY34	DSM ACC2698	Depósito 3/11/04
15	Cultura de células PHY36	DSM ACC2699	Depósito 3/11/04
	Cultura de células PHY37	DMS ACC2700	Depósito 3/11/04
	Cultura de células PHY46	DSM ACC2701	Depósito 3/11/04
	Cultura de células fitase Mab 28	DSM ACC2715	Depósito 2/2/05.

As linhagens de células monoclonais da invenção foram preparadas segundo a descrição no Exemplo 6, *infra*.

O agente de imunização inclui tipicamente o polipeptídeo desejado ou as suas proteínas de fusão. De uma maneira geral utiliza-se linfócitos de sangue periférico ("PBLs") se se desejar células de origem humana ou células de baço ou células de gânglios linfáticos se se desejar fontes mamíferas não-humanas. Os linfócitos são depois fundidos com uma linhagem de células imortalizadas utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103). As linhagens de células imortalizadas são geralmente células de mamífero transformadas, em particular células de mieloma de origem em roedores, bovinos e humanos. Geralmente utiliza-se linhagens de células de mieloma de rato ou camundongo. As células de hibridoma são cultivadas em um meio

de cultura adequado que contém preferencialmente uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células imortalizadas não fundidas. Por exemplo, se as células parentais carecerem da enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas inclui tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias essas que impedem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

As linhagens de células imortalizadas preferidas são aquelas que fundem eficientemente, suportam uma expressão estável de um nível elevado de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. As linhagens de células imortalizadas mais preferidas são as linhagens de mieloma murídeo, que podem ser obtidas, por exemplo, de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. e de American Type Culture Collection, Manassas, Va. As linhagens de células de mieloma humano e heteromieloma camundongo-humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, pág. 51-63).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas é depois analisado quanto à presença de anticorpos monoclonais dirigidos contra a PRO. Preferencialmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como um radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidos na técnica. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise Scatchard de Munson e Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Depois de se ter identificado as células de hibridoma desejadas, os clones são subclonados por procedimentos de diluição limitante e crescimento por métodos correntes (Goding, *supra*). Os meios de cultura adequados para este efeito incluem, por exemplo, Meio de Eagle Modificado por

Dulbecco e meio RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma são multiplicadas *in vivo* como ascites em um mamífero. Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são isolados ou purificados a partir do meio de cultura ou do fluido ascítico por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidroxiapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Os anticorpos monoclonais também podem ser preparados por métodos de DNA recombinante, tais como os descritos na Pat. U.S. nº 4 816 567. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais da invenção é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos de murídeo). As células de hibridoma da invenção servem como uma fonte preferida desse DNA. Uma vez isolado, o DNA é colocado em vectores de expressão, os quais são depois transfectados em células hospedeiras tais como células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzam de outro modo proteína de imunoglobulina, para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA também é modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação pelos domínios constantes das cadeias pesada e leve humana em vez das sequências homólogas de murídeo (Pat. U.S. nº 4 816 567; Morrison et al., *supra*), ou juntando covalentemente a sequência de codificação da imunoglobulina à totalidade ou parte da sequência de codificação de um polipeptídeo de não imunoglobulina. Um tal polipeptídeo de não imunoglobulina está substituído pelos domínios constantes de um anticorpo da invenção ou está substituído pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo quimérico bivalente.

Noutra modalidade, os anticorpos são anticorpos monovalentes. Os métodos de preparação de anticorpos monovalentes são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método envolve a expressão recombinante

da cadeia leve de imunoglobulina e da cadeia pesada modificada. A cadeia pesada está geralmente truncada em qualquer ponto da região Fc de modo a impedir a reticulação da cadeia pesada. Alternativamente, os resíduos de cisteína relevantes são substituídos por outro resíduo de aminoácido ou são
5 eliminados de modo a evitar a reticulação. Os métodos *in vitro* são também adequados para preparar anticorpos monovalentes. A digestão de anticorpos para produzir fragmentos destes, em particular, fragmentos Fab, pode ser realizada utilizando técnicas de rotina conhecidas na arte.

Outros métodos conhecidos na técnica incluem o método de Kamey, et al., J. Immunol. 123: 1548-1558 (1979), o qual é aqui incorporado por referência. Abreviadamente, inocula-se animais tais como ratinhos ou coelhos com o imunogénio em adjuvante, e colhe-se as células de baço e mistura-se com uma linhagem de células de mieloma. As células são induzidas a fundir pela adição de polietileno glicol. Os hibridomas são quimicamente
10 selecionados aplicando as células em um meio de selecção contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Os hibridomas são subsequentemente rastreados em relação à capacidade para produzir anticorpos monoclonais antifitase. Os hibridomas que produzam anticorpos são clonados, expandidos e armazenados congelados para produção futura.

Noutra modalidade, o anticorpo é marcado diretamente com uma etiqueta detectável para identificação e quantificação de uma proteína fitase. As etiquetas para utilização em imunoensaios são geralmente conhecidas dos versados na técnica e incluem, mas não se limitam às enzimas, radioisótopos e substâncias fluorescentes, luminescentes e cromogênicas incluindo
15 partículas coloridas tais como ouro coloidal e esferas de látex.

Alternativamente, os anticorpos são marcados indiretamente por reação com substâncias marcadas que têm uma afinidade para a imunoglobulina, tal como proteína A ou G ou anticorpos secundários. Os anticorpos são conjugados com uma segunda substância e detectados com uma terceira substância marcada possuindo afinidade para a segunda substância conjugada com o anticorpo. Por exemplo, o anticorpo está conjugado com biotina e o conjugado anticorpo-biotina é detectado utilizando avidina ou estre-
20

pavidina marcada.

Noutra modalidade, o anticorpo é conjugado com um hapteno e o conjugado anticorpo-hapteno detectado utilizando anticorpo anti-hapteno marcado. Estes e outros métodos de marcação de anticorpos e análise de conjugados são bem conhecidos dos versados na técnica.

Imunoensaio

Os anticorpos são reunidos coletivamente em um kit com reagentes convencionais de imunoensaio para detecção da fitase utilizando o imunoensaio descrito abaixo. O kit pode conter opcionalmente anticorpos monoclonais e policlonais e um padrão para determinar a presença da fitase em uma amostra. O kit contendo estes reagentes proporciona uma detecção simples, rápida e no local de uma proteína.

Os anticorpos descritos acima são utilizados como os reagentes básicos de um número diferente de imunoensaios para determinar a presença de fitase em uma amostra. Os anticorpos são utilizados em qualquer tipo de imunoensaio, quer seja qualitativo ou quantitativo.

Num ensaio quantitativo em sanduíche típico, existem três partes básicas. Por exemplo, em um tal ensaio para a fitase, a proteína fitase em um extrato vegetal geneticamente modificado ou em um extrato de alimentos, tais como alimentos para frangos, é capturada para a fase sólida utilizando um anticorpo primário. Numa modalidade, o anticorpo primário é um anticorpo antifitase de coelho. Em seguida forma-se uma "sanduíche" entre o anticorpo primário, a proteína fitase e o anticorpo secundário que foi adicionado ao poço. Numa modalidade, o anticorpo secundário é um anticorpo antifitase de cabra. Depois de um passo de lavagem, no qual se eliminou o anticorpo secundário não-ligado, o anticorpo secundário ligado é detectado utilizando um anticorpo marcado. Numa modalidade particular, o anticorpo de detecção é um anticorpo anticabra de burro marcado com fosfatase alcalina. O substrato para detecção da enzima, fosfatase alcalina, é adicionado e o desenvolvimento de cor determinado lendo a absorvância de cada poço. A curva de calibração utiliza um ajuste de curva de quatro parâmetros para representar as concentrações em função da absorvância.

De uma maneira mais geral, o imunoensaio para a detecção de fitase compreende os passos de: a) preparar um extrato da amostra; b) incubar uma porção do extrato com um anticorpo antifitase primário que se liga à fitase, encontrando-se o anticorpo primário ligado a um veículo sólido, e um anticorpo antifitase secundário que se liga à fitase para criar um complexo anticorpo-fitase-anticorpo, c) lavar o complexo anticorpo-fitase-anticorpo para eliminar o anticorpo secundário não-ligado; d) adicionar um anticorpo de detecção que reaja imunologicamente com o anticorpo secundário em que o anticorpo de detecção está marcado; e e) medir a quantidade de anticorpo marcado ligado para determinar a concentração da fitase.

Numa modalidade, a fitase é uma fitase bacteriana, mais particularmente, uma fitase de *E. coli*. Numa modalidade ainda mais particular, a fitase é uma termoestável, tal como uma fitase Quantum®.

Noutra modalidade da invenção, a etiqueta detectável é uma enzima. Em modalidades mais preferidas, a enzima é fosfatase alcalina, peroxidase ou β -galactosidase. Noutra modalidade, a enzima produz um produto reacional solúvel. A invenção também proporciona um kit para a detecção e quantificação pelo método do imunoensaio compreendendo: a) um meio de extrair a fitase de uma amostra; b) um suporte sólido compreendendo um anticorpo primário antienzimas alimentares ligado ao suporte sólido; c) um anticorpo antifitase secundário; e d) um anticorpo de detecção capaz de se ligar imunologicamente ao anticorpo secundário e em que o anticorpo de detecção está marcado com um meio de detecção.

Numa modalidade particular, o meio de detecção é uma enzima. Em modalidades particulares, a enzima de detecção é fosfatase alcalina, peroxidase ou β -galactosidase. Noutra modalidade, a enzima produz um produto reacional solúvel ou insolúvel. Noutra modalidade, o kit compreende ainda um substrato para uma enzima. Tais imunoensaios são também referidos como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Os anticorpos descritos acima são também utilizados em um imunoensaio qualitativo para a detecção de uma enzima alimentar, tal como a fitase. Um desses ensaios é geralmente referido como uma tira imunológica.

ca. Uma tira imunológica é produzida utilizando membranas e filtros através dos quais é absorvida uma amostra de líquido por ação capilar. A fitase na amostra reage com os anticorpos contidos na tira imunológica à medida que ela se move ao longo do comprimento da tira. Para detectar proteína da fitase em alimentos para frangos, os alimentos são lavados com um tampão, separados do material sólido e adicionados à tira imunológica. À medida que a amostra líquida migra para a extremidade oposta da tira imunológica, a fitase reage com os anticorpos específicos e é capturada em uma linha que se torna visível. A detecção do sinal na linha de ensaio indica que existe fitase na amostra.

Numa modalidade a invenção proporciona um imunoensaio para a detecção de fitase em uma amostra compreendendo os passos de: a) preparar um extrato da amostra na presença de um anticorpo primário o qual reconhece imunologicamente a fitase no extrato pelo que se forma um complexo anticorpo primário-fitase; b) preparar um formato de fase sólida possuindo um tamanho tridimensional significativo para formar um volume substancial com uma multiplicidade de espaços intersticiais ligando àquela um anticorpo secundário desejado capaz de reconhecer imunologicamente a fitase e em que o anticorpo secundário está conjugado com meios de detecção e em que o anticorpo secundário também reconhece imunologicamente a fitase; d) combinar o extrato do passo (a) com o formato preferido do passo (b) de acordo com o que o extrato é retirado através dos espaços intersticiais do formato de fase sólida preparado capturando o complexo anticorpo primário-fitase; e) detectar a fitase pela presença do referido complexo de anticorpo primário-fitase capturado.

Numa modalidade a fitase é uma fitase bacteriana. Numa modalidade mais particular, a fitase é de *E. coli*. Noutra modalidade, a fitase é uma fitase termoestável, tal como mas não se limitando à fitase Quantum®.

Noutras modalidades, o formato de fase sólida é acetato de celulose, celulose, nitrocelulose ou náilon. Noutra modalidade, o formato de fase sólida é constituído por camadas múltiplas sobrepostas e contíguas em que cada camada é capaz de capturar uma enzima alimentar diferente. Numa

modalidade preferida, o suporte de fase sólida compreende ainda uma almofada de absorção de amostra do formato de fase sólida. Numa modalidade mais preferida, o imunoensaio compreende ainda uma tira compreendendo um anticorpo anti-enzimas alimentares marcado.

5 Numa modalidade particular, o meio de detecção é ouro coloidal.

 É proporcionado um imunoensaio extremamente sensível que utiliza os anticorpos descritos acima. O ensaio é útil para a detecção de uma enzima fitase em uma amostra de alimentos. De igual modo, o ensaio é útil para a detecção de organismos geneticamente modificados que foram manipulados para incluir um gene que codifica um gene da fitase. O imunoensaio é capaz de detectar concentrações baixas da proteína em amostras, tais como alimentos para animais e em amostras de culturas geneticamente melhoradas.

10

 Como se descreveu acima, os anticorpos utilizados no imunoensaio são imunorreativos com determinantes antigênicos ou com um determinante antigênico comum na proteína fitase, expressado por vários microorganismos e reage de um modo mínimo com outras proteínas que possam estar presentes na amostra, proporcionando desse modo uma determinação exata da presença de um organismo geneticamente modificado em uma amostra, tal como uma amostra de grãos.

15

20

 O imunoensaio é útil para detectar a presença ou a quantidade de uma fitase, em uma diversidade de amostras, incluindo alimentos para animais e amostras agrícolas tal como material vegetal. A amostra pode ser obtida de qualquer fonte na qual a proteína desejada esteja acessível ao anticorpo. Por exemplo, a amostra pode ser qualquer tecido vegetal ou extrato incluindo raízes, caules, talos, folhas ou sementes ou produtos derivados de tais culturas, tais como frações de alimentos.

25

 Um ou mais dos anticorpos descritos acima são utilizados em qualquer imunoensaio em sanduíche ou competitivo, heterogêneo ou homogêneo para a detecção de proteína fitase. O anticorpo está marcado com uma etiqueta detectável ou acoplado a uma fase sólida. Os métodos para acoplamento de anticorpos a fases sólidas são bem conhecidos dos versa-

30

dos na técnica. De acordo com o método de imunoensaio, a amostra contendo fitase é feita reagir com o anticorpo durante uma quantidade de tempo suficiente em condições que promovem a ligação do anticorpo à proteína fitase na amostra. Os versados na técnica compreenderão que os reagentes de imunoensaio e a amostra podem ser feitos reagir em combinações e por ordens diferentes. Utiliza-se um meio físico para separar reagentes ligados à fase sólida de reagentes não-ligados tal como filtração de partículas, decantação de soluções reacionais de tubos ou poços revestidos, separação magnética, ação capilar e outros meios conhecidos dos versados na técnica. Entender-se-á também que se pode incluir no método uma lavagem separada da fase sólida.

A concentração de proteína fitase na amostra é determinada comparando a intensidade da cor produzida pela amostra com um cartão de cor, utilizando um reflectômetro, ou utilizando um espectrofotômetro ou leitor de placas microtítulo.

A mistura reacional resultante, ou combinação de anticorpo e amostra, é preparada em uma solução que otimiza a cinética de ligação anticorpo-fitase. Uma solução apropriada é uma solução aquosa ou tampão. A solução é preferencialmente proporcionada em condições que promoverão a ligação específica, minimizarão a ligação não-específica, solubilizarão as enzimas alimentares, estabilizarão e conservarão a reatividade do reagente, e pode conter tampões, detergentes, solventes, sais, quelantes, proteínas, polímeros, carbdratos, açúcares e outras substâncias conhecidas dos versados na técnica.

A solução da mistura reacional é feita reagir durante um período de tempo suficiente para permitir que o anticorpo reaja e se ligue à proteína fitase para formar um complexo anticorpo-fitase. É desejado o período de tempo reacional mais curto que resulte em ligação para minimizar o tempo necessário para completar o ensaio. Um período de tempo reacional apropriado para um ensaio em tira imunológica é menor ou igual a 10 minutos ou entre aproximadamente um minuto e 10 minutos. É preferido um tempo de reação menor do que cinco minutos. Muito preferencialmente, o tempo de

reação é menor do que três minutos. Otimizando os reagentes, a ligação pode ser consideravelmente completa à medida que os reagentes são combinados.

5 A reação é realizada a qualquer temperatura à qual os reagentes não se degradem ou se tornem inativos. É preferida uma temperatura entre aproximadamente 18°C e 30°C, e a temperatura de reação muito preferida é a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C).

10 Um formato de fase sólida tal como uma tira imunológica é idealmente adequada para este imunoensaio. As tiras de ensaio são constituídas por componentes porosos múltiplos, membranas e filtros, através dos quais a amostra líquida é absorvida por ação capilar. A fitase na amostra reage com os reagentes de ensaio contidos na tira de ensaio à medida que ela atravessa o comprimento da tira. Para detectar a proteína no grão ou semente, o grão é moído em um pó e a proteína extraída do pó com um líquido que é depois separado do material sólido e analisado utilizando o teste. O líquido é aplicado à tira imunológica, e a proteína fitase migra em direção da extremidade distal da tira. À medida que migra ao longo da tira, a fitase reage com reagentes aplicados ou imobilizados na tira provocando um produto com sinal detectável. A detecção do sinal indica a presença de fitase na amostra.

20 Numa modalidade o formato de fase sólida é acetato de celulose, celulose, nitrocelulose ou náilon. Numa modalidade preferida, o formato de fase sólida é nitrocelulose.

25 Noutra modalidade, o formato de fase sólida compreende uma almofada de absorção da amostra, uma tira de nitrocelulose e uma almofada de fundo compreendendo um anticorpo antifitase marcado.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

30 Os métodos serológicos que são utilizados baseiam-se em técnicas de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) descritas, por exemplo, em Harlow, E., pista D., Antibodies: a Laboratory Manual. 1998. Cold Spring Harbor Laboratory. pág. 553-612. O método de ELISA utilizado na presente invenção é descrito no Exemplo 1.

Estojo de Imunoensaio

Um kit de imunoensaio para a detecção de proteína de enzimas alimentares em uma amostra contém um ou mais dos anticorpos descritos acima. O kit pode conter adicionalmente equipamento para obter a amostra, um recipiente para conter os reagentes, um meio de cronometragem, um tampão para diluir a amostra e um calorímetro, reflectômetro ou padrão contra o qual se pode medir uma mudança de cor. O kit pode incluir os reagentes na forma de uma tira imunológica como se descreveu acima.

Numa modalidade preferida, os reagentes, incluindo o anticorpo estão secos. A adição de amostra aquosa ao frasquinho ou tira resulta na solubilização do reagente seco, levando-o a reagir.

Os reagentes, métodos de imunoensaio e kits descritos acima serão melhor compreendidos por referência aos seguintes exemplos não-restritivos. Os exemplos abaixo mostram protocolos experimentais e reagentes típicos que podem ser utilizados na detecção de fitase em amostras tais como alimentos ou outros materiais vegetais. Tais exemplos são proporcionados a título de ilustração e não de restrição.

Outros objetos, particularidades e vantagens da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição pormenorizada que se segue. No entanto entender-se-á que a descrição pormenorizada e os exemplos específicos, apesar de indicarem modalidades preferidas da invenção, são dados apenas a título de ilustração, uma vez que tornar-se-ão evidentes aos versado na técnica várias alterações e modificações dentro do espírito e âmbito da invenção a partir desta descrição pormenorizada.

As várias referências citadas acima são aqui todas incorporadas nas suas totalidades.

EXEMPLOS

Estes métodos e materiais descrevem o procedimento geral para preparar as amostras de milho ou alimentos e de produção dos anticorpos policlonais e monoclonais utilizados nos exemplos descritos abaixo.

Materiais e Métodos

Amostra de milho: O extrato de milho era proveniente de semen-

- tes Hi II ou sementes A188 (não-transgênicas) ou sementes fitase geneticamente modificadas. Pulverizou-se cinco grãos de milho utilizando um triturador de tecidos KLECO. Suspendeu-se a farinha de milho resultante em 5 mL de água destilada para solubilizar as proteínas. Testou-se o sobrenadante em ELISA ou com as tira imunológicas.

Produção de Anticorpos Policlonais

- Para imunização: Depois da injeção inicial, o animal (coelho ou cabra) recebeu um reforço após 28 dias. Cada reforço subsequente daí em diante foi dado de 21 dias. Os animais foram sangrados 10 dias após cada reforço.

Para as galinhas, o primeiro reforço é efetuado 7 dias depois da injeção inicial, seguido de reforços de 28 em 28 dias. As galinhas foram sangradas 10 dias após cada reforço, e se for detectado um bom título de anticorpos, recolhe-se os ovos depositados após o reforço.

- O agente de imunização foi toda a proteína fitase purificada de um sistema de expressão de *E. coli*. Com a primeira injeção no animal, a proteína é emulsionada em adjuvante completo de Freund. Os reforços são em adjuvante incompleto de Freund. Os animais utilizados para produzir os anticorpos policlonais são coelhos, galinhas e cabras.

Purificação da fitase (Nov9X):

- Submeteu-se à diálise fitase (Nov9X) formulada com 10% de sorbitol, 10% de NaCl e pH 4,2 dum dia para o outro contra Tris-HCl a 25 mM, pH 8,0 a 4°C utilizando um tubo de diálise SnakeSkin 10K MWCO (Pierce, Rockford, IL.). Após diálise adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido à mistura de fitase, inicialmente até 25% de saturação, depois até 50% e finalmente 75% de saturação a 0°C. Após a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 25% de saturação, agitou-se a mistura durante 30 minutos a 0°C, centrifugou-se em seguida a 20.000 rpm durante 20 minutos. Ao sobrenadante decantado, adicionou-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 50% de saturação enquanto se ressuspensava o sedimento em Tris-HCl a 25 mM, pH 9,0. Este procedimento foi realizado 3 vezes para produzir sedimentos de Nov9X $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0-25%, 25-50% e 50-75% de saturação. A análise por SDS-PAGE demonstrou a presença de Nov9X na fração

50-75%. Esta fração foi sujeita a diálise contra Tris-HCl a 25 mM, pH 9,0 e preparada para purificação por cromatografia em coluna.

Carregou-se Nov9X TAM em bruto da fração de 50-75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em uma coluna de troca aniônica HiTrapQ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) utilizando um caudal de 5,0 mL/min. Utilizou-se um gradiente de NaCl a 0-0,4 M em Tris-HCl a 25 mM, pH 9,0 desenvolvido ao longo de 30 minutos para eluir o Nov9X. Utilizou-se as medições da absorvância a 280 nm para seguir o progresso do ensaio cromatográfico. Após análise por SDS-PAGE as frações mais puras contendo Nov9X foram misturadas, concentradas com um concentrador centrífugo Centricon Plus-20 (Millipore, Bedford, MA), e carregadas em uma coluna de exclusão molecular 26/60 Sephacryl S100 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a correr a 1 mL/min. O tampão eluente foi Tris-HCl a 25 mM, pH 9,0. As frações contendo Nov9X puro foram reunidas, concentradas, submetidas a diálise contra Tris-HCl a 25 mM, pH 8,0, e utilizadas nos estudos descritos a seguir.

EXEMPLO 1: ELISA da fitase

Este exemplo descreve a detecção e determinação quantitativa da enzima fitase em uma amostra de milho utilizando a técnica imunológica de ELISA.

20 Procedimento

Revestiu-se as placas de poços múltiplos (Nunc, Maxisorp) a 4°C dum dia para o outro com o anticorpo antifitase de coelho a uma concentração de 2 µg/mL, diluído em borato de sódio/ácido bórico a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH 8,5. Lavou-se as placas cinco vezes com Tris a 10 mM contendo 0,05% de Tween-20 e 0,03% de azida de sódio pH 8 (tampão de lavagem). Nota: o mesmo passo de lavagem foi realizado após cada período de incubação para eliminar anticorpos/amostras não-ligados. Bloqueou-se então as placas durante 45 min. à temperatura ambiente com albumina de soro bovino a 1%, 0,05% de Tween-20, 0,03% de azida de sódio, NaCl a 150 mM em fosfato de sódio a 100 mM, pH 7,4 diluente. Adicionou-se cinquenta microlitros de cada amostra à placa e incubou-se durante 1,5 h à temperatura ambiente. Adicionou-se o anticorpo antifitase de cabra (diluído

até 2 µg/mL em diluente) às placas e incubou-se durante 1 h a 37°C. Adicionou-se o anticorpo de detecção (anticorpo anticabra de burro marcado com fosfatase alcalina foi diluído até 1 µg/mL em diluente) às placas e incubou-se durante 1 h a 37°C. Adicionou-se o substrato, fosfato de para-nitrofenilo (pNPP) e deixou-se desenvolver durante 30 min à temperatura ambiente. Mediu-se a absorvância a 405 nm com 492 nm como uma referência.

Características do Ensaio

A curva padrão da fitase foi um ajuste de curva de 4 parâmetros 4 (ver Figura 1). A curva foi representada linear contra log em uma gama de 0,04 até 16 ng/mL. Para representar a curva padrão de 4 parâmetros em um eixo dos X logarítmico deverá introduzir-se o padrão de 0 ng/mL no programa de análise a 0,01 ng/mL em vez de 0 ng/mL. O programa de análise utilizado foi o software WinSelect® para o leitor de microplacas Tecan Sunrise®, embora se possa utilizar qualquer programa de ajuste de curvas de quatro parâmetros.

A dose mínima detectável (MDD) foi o nível mais baixo de proteína fitase que se distinguia estatisticamente do padrão zero. A dose mínima detectável foi determinada através da análise de 24 replicados de controle negativo de extrato de grão de milho a 1 mg/mL de proteína total. Adicionou-se dois desvios padrão da O.D. média do padrão zero (limites de confiança de 95%) à média, e determinou-se a dose deste valor total de O.D. utilizando uma curva padrão. A dose detectável mínima foi de 0,044 ng/mL.

A precisão entre ensaios foi determinada analisando 4 amostras de controle diferentes em 21 ensaios diferentes. As amostras eram de fitase purificada adicionada a diluente de ELISA. Os resultados são indicados abaixo no Tabela 1. A precisão é boa, inferior a 15%, para concentrações de amostras que são medidas na parte linear da curva padrão.

Tabela 1: Ensaio de Precisão Entre Ensaios

Amostra	fitase Média ng/mL	Desvio Padrão	% de Coeficiente de Variação
1	9,65	2,27	23,5%
2	2,99	0,38	12,8%

Amostra	fitase Média ng/mL	Desvio Padrão	% de Coeficiente de Variação
3	0,94	0,11	12,0%
4	0,39	0,10	25,6%

A precisão no ensaio foi determinada analisando 20-24 replicados das amostras seguintes. As amostras foram fitase adicionada a diluente de ELISA. Os resultados são indicados no Tabela 2 abaixo. Todas as amostras originaram uma precisão muito boa, indicando boa reprodutibilidade dentro de um único ensaio.

Tabela 2: Ensaio de Precisão Entre Ensaios

Amostra	fitase Média ng/mL	Desvio Padrão	% de Coeficiente de Variação
1	0,463	0,030	6,44%
2	2,293	0,264	11,51%
3	5,224	0,787	15,07%

Diluiu-se quatro extratos de grão de milho com diluente de ELISA para testar a linearidade do ensaio. O extrato de milho foi proveniente de sementes Hi II ou sementes A188 (não-transgênicas) ou sementes produtoras de fitase geneticamente modificadas. Pulverizou-se cinco grãos de milho utilizando um triturador de tecido KLECO (Visalia, CA). Suspendeu-se a farinha de milho resultante em 5 mL de água destilada para solubilizar as proteínas. Testou-se o sobrenadante em ELISA ou com as tiras. A percentagem de recuperação da fitase das amostras diluídas foi aceitável.

Tabela 3: Linearidade do Ensaio de Doseamento

Amostra	Diluição	fitase Medida (ng/mL)	Valor X Medido fração de diluição	Percentagem de recuperação
A	1/2500	12,76	31900	82%
	1/5000	5,85	29250	75%
	1/10.000	3,90	39000	100%
B	1/2500	6,87	17175	52%
	1/5000	6,90	34500	104%
	1/10.000	3,33	33300	100%

C	1/2500	3,58	8950	63%
	1/5000	2,35	11750	83%
	1/10.000	1,41	14100	100%
D	1/2500	6,11	15275	72%
	1/5000	3,54	17700	83%
	1/10.000	2,13	21300	100%

Exemplo 2: Tiras imunológicas para a fitase

Este exemplo descreve a utilização dos ensaios de tiras imunológicas para testar quanto à presença de fitase em uma amostra.

Procedimento

- 5 Preparou-se extratos de alimentos para frangos em calda adicionado os alimentos a um tubo de centrifuga de 50 mL até à marca de 15 mL. Adicionou-se esta quantidade de alimentos a um dos lados da rede no interior do saco de extração. Adicionou-se tampão de extração (25 mL de borato a 0,1 M, pH 7,5 contendo 0,5% de Tween-20) e pressionou-se suavemente o tampão sobre os alimentos para garantir que a totalidade dos alimentos estava umidificada. Incubou-se o extrato à temperatura ambiente durante pelo menos 10 min antes de se aplicar 3-5 gotas à tira imunológica para ensaio.

Tira Imunológica

- 15 Abreviadamente, a tira imunológica de fluxo lateral compreendia uma membrana de detecção de nitrocelulose ($2,5 \times 18$ cm), sobre um suporte de plástico (G&L Precision Die Cutting, Inc, San Jose, CA), no qual se pulverizou uma linha de 1 mm de anticorpo policlonal antifitase de coelho (também se pode utilizar anticorpos de galinha) específico. Pulverizou-se uma linha de controle de reagente de anticorpo anticabra de burro em um paralelo acima da linha do primeiro anticorpo. A extremidade do fundo da tira de nitrocelulose é tapada com um pedaço de tira de poliéster. A tira de poliéster é tratada em primeiro lugar com 0,5% de BSA, 0,5% de poli(álcool vinílico) e 0,1% de Triton X-100; tampão de fosfato a 50 mM, pH 7,4 e o anticorpo antifitase de cabra conjugado com ouro coloidal. Deixa-se secar a tira de poliéster. A tira de poliéster é depois coberta com uma almofada de aplica-

ção de amostra em algodão. A almofada de aplicação da amostra também foi pré-tratada com 0,1% de Triton X-100 em tampão de borato a 0,1 M, pH 8,5 e deixada secar. Flanqueando a outra extremidade ou extremidade superior da tira de nitrocelulose está uma outra almofada de algodão para absorver a solução da amostra depois desta ter passado as áreas do anticorpo de ensaio e do anticorpo controle na nitrocelulose. Esta placa completada foi depois cortada em tiras de ensaio de 4 mm para caber em um cassete de plástico com um poço oval de aplicação de amostra posicionado acima da almofada de amostra e uma janela retangular de detecção posicionada acima da área de detecção da membrana de nitrocelulose.

O ensaio foi realizado adicionando 150 μ L (3-5 gotas) de extrato ao poço da amostra. Depois de esperar aproximadamente 5-10 minutos, os resultados surgiram na janela de resultados. Se houvesse fitase na amostra, surgia uma linha vermelha dupla na janela de resultados. A linha inferior indica a presença de fitase enquanto a linha superior é a linha de controle que demonstra um dispositivo a funcionando adequadamente. Se a fitase estiver ausente, surge apenas uma única linha de controle vermelha na janela de resultados. Ver Figuras 3 e 4 para tiras imunológicas de amostras. A Figura 3 mostra a detecção da presença de fitase. A detecção de fitase diminui após 20 minutos como indicado pela seta, porque é quando a fitase começa a perder atividade.

Preparação Pormenorizada da Tira Imunológica

Tiras de Fitase de 2ª Geração-Revestimento de Materiais da Membrana

Revestimento da linha de ensaio: Placas de material absorvente, 2,25 polegadas $\times$ 180 mm com membrana AE100 são revestidas com IAP antifitase de galinha a 0,1 mg/mL em PBS utilizando um pulverizador Cmag[®] com o volume ajustado para 18 (1 μ L/cm). Coloca-se a placa em uma plataforma e a porção da placa com os e pedaços de papel é colocada mais próxima da frente do instrumento. A placa é fixada com ímãs. Encher a seringa com 1,0 mg/mL de IAP antifitase de galinha.

Revestimento da linha de controle: Utiliza-se uma linha de controle de anticorpo anticabra de burro como uma linha de controle na tira imu-

nológica. Pulveriza-se a linha de controle nas placas utilizando um pulverizador Camag® com o volume ajustado para 18 (1 µL/cm). Seca-se as placas a 33°C dum dia para o outro, transfere-se em seguida para a temperatura ambiente e conserva-se seco à temperatura ambiente.

5 Tiras de Fitase-Revestimento do Conjugado no Poliéster

Procedimento

Diluiu-se o conjugado de ouro até OD = 50 utilizando solução diluente de ouro. Adicionou-se 20% de sacarose e 5% de trealose ao conjugado de ouro para estabilizar o anticorpo antifitase Nov9X de cabra (0,2 g de sacarose e 50 mg de trealose por 1 mL de conjugado de ouro) e misturou-se até estar completamente dissolvido. Pulverizou-se uma lâmina de poliéster com o anticorpo antifitase conjugado com ouro utilizando um volume Camag® de 27 (1,5 µL/cm). Colocou-se a lâmina de poliéster na plataforma e segurou-se com os magnetes. Pulverizou-se a lâmina com o conjugado, deslocando 9 mm em cada ensaio, até a lâmina de poliéster estar toda cheia. Oito linhas de conjugado encherão uma lâmina. Secou-se a lâmina a 37°C durante 1 h. Cortar em seguida a lâmina em tiras de 6,35 m (¼") de modo a que a linha de conjugado de ouro atravessasse o topo de cada tira. Armazenar seco à T.A.

20 Tiras de Fitase-Montagem

Materiais

1. Placas revestidas com anticorpo IAP antifitase de galinha a 1,0 mg/mL e 1 µL/cm.
2. Tiras de 15,875 mm (5/8") × 180 mm de papel absorvente nº40 (almofada superior)
- 25 3. Tiras de 19,05 mm (¾") × 180 mm de papel nº903 tratado com solução C, pH 8,6 (almofada inferior).
4. Tiras 6,35 mm (¼") × 180 mm de conjugado de ouro pulverizado (anti-NOV9X de cabra, OD = 50 a 1,5 µL/cm).

30 Procedimento

Nota: as tiras são montadas em condições de umidade inferior a 40%. Usar luvas para aplicar os componentes. Retira-se os dois revestimen-

tos das tiras de cola no fundo da placa. Posicionou-se a tira de ouro com a linha de conjugado de ouro ao longo da parte superior e sobrepondo a membrana em 1-1,5 mm. Colocou-se a almofada inferior ao longo do limite inferior da placa, tendo o cuidado de deixar a tira de ouro exposta. Retirou-se os revestimentos das tiras de cola ao longo da parte superior da placa. Colocar a almofada superior ao longo do topo da placa sobrepondo a membrana em 1-1,5 mm. As placas acabadas foram conservadas secas à T.A. até estarem prontas para serem cortadas em tiras.

Cortou-se as tiras em comprimentos de 4 mm. Uma placa produzirá 40 tiras. Conservar as tiras secas à temperatura ambiente.

EXEMPLO 3: Detecção de fitase Enzimaticamente Activa

Procedimento

Fitase purificada produzida por *Pichia* foi inactivada aquecendo a 99°C durante até 60 minutos. A fitase foi depois avaliada em relação à atividade enzimática e comparada com a reatividade no ELISA da fitase (Figura 2) e a reatividade com as tiras imunológicas para a fitase (Figura 3).

Comparação de ELISA: a figura 2 mostra um gráfico da atividade residual de Nov9X após incubação a 99°C 04-28-03, de TAM purificado por FPLC Lote nº PHY-PP9XR-PB200L. Comparação da Atividade contra Dados de ELISA. Isto demonstra que o ensaio ELISA e as tiras imunológicas parecem detectar apenas a fitase ativa. A fitase inativada termicamente não é detectada em qualquer um dos ensaios.

EXEMPLO 4: Estojo de Imunoensaio da fitase

Este ensaio de diagnóstico (ver Figura 4) foi concebido para a detecção rápida (10 min) de fitase em alimentos. O kit contém todos os reagentes e equipamento necessários para realizar o teste. O kit pode ser conservado a temperaturas ambientes que não excedam 38°C (100°F). Os testes são embalados em um saco de folha metálica à prova de umidade selado com um dessecante de sílica capaz de absorver alguma umidade. Manter o teste na sua embalagem até à sua utilização. Evitar colocar o teste em um local úmido.

Procedimento de Ensaio

1. Encher o tubo grande com alimentos até à marca 15. Adicionar esta quantidade de alimentos a um dos lados da rede no interior do saco de extração.
2. Retirar um recipiente plástico de tampão de extração (25 mL) do kit e
5 verter para o saco de extração.
3. Fechar o saco e deslocar suavemente o tampão sobre os alimentos para assegurar que a totalidade dos alimentos é umidificada. Esperar pelo menos 10 minutos.
4. Retirar um Teste de Campo do saco de película metalizada e colocar
10 em uma superfície seca plana. Verificar o dessecante. Deverá ser azul. Se estiver rosa, os testes já não são válidos e deverão ser rejeitados.
5. Utilizando a pipeta de transferência, transferir 3-5 gotas do extrato de alimentos para encher o poço de amostra do teste de campo.
6. Esperar aproximadamente 5 minutos para que os resultados surjam na
15 janela acima do poço da amostra.

Resultados

Se houver fitase presente na amostra surge uma linha vermelha dupla na janela de resultados do teste de campo. A linha inferior indica a presença de fitase, enquanto a linha superior é a linha de controle que sinaliza um dispositivo funcionando adequadamente. A linha de teste não será
20 tão forte quanto a linha de controle. Qualquer reação observada na linha de teste é considerada positiva.

Se não houver fitase presente, surge apenas uma única linha de controle vermelha na janela de resultados.

25 EXEMPLO 5: Detecção de fitase em Alimentos Granulados

Este exemplo demonstra a utilização dos ensaios de tira imunológica para detectar fitase em alimentos granulados para animais.

Os métodos e reagentes são como descritos acima no Exemplo 4, com a exceção de que os alimentos granulados para animais são triturados até uma consistência granulosa ou em pó com qualquer dispositivo mecânico, e de que o tampão de extração foi 5% de metanol com 0,5% de Tween-20 em água em vez do tampão de borato. De igual modo, o anticorpo
30

antifitase foi de galinha em vez de coelho. Os resultados são indicados a seguir nas Tabelas 4 e 5. As Tabelas 4 e 5 mostram que a fitase Quantum® era detectável tanto nas dietas em calda ou iniciais (antes da transformação em granulado) como nas dietas granuladas ou esfareladas utilizando o ensaio ELISA. Na Tabela 5, a atividade foi também confirmada com um ensaio de atividade enzimática. Os resultados de ambas as Tabelas 4 e 5 foram também confirmados pelo ensaio de tira imunológica (resultados não apresentados).

Tabela 4: Detecção de fitase em Alimentos Granulados ou em Calda

Dieta	Resultado ELISA ng/mL	Nível de fitase Adicionado	Tipo
RA0309 Dieta Inicial 1	0	0	calda
RA0309 Dieta Inicial 9	0	0	pélete
RA0309 Dieta Inicial 4	0	0	calda
RA0309 Dieta Inicial 15	0	0	pélete
RA0309 Dieta Inicial 11	22,3375	285	calda
RA0309 Dieta Inicial 19	24,9875	285	calda
RA0309 Dieta Inicial 2	8,8425	285	pélete
RA0309 Dieta Inicial 23	10,93	285	pélete
RA0309 Dieta Inicial 6	27,495	566	calda
RA0309 Dieta Inicial 17	46,25	566	calda
RA0309 Dieta Inicial 13	19,76	566	pélete
RA0309 Dieta Inicial 21	24,425	566	pélete
RA0309 Dieta Inicial 3	58,19	1133	calda
RA0309 Dieta Inicial 14	69,0275	1133	calda
RA0309 Dieta Inicial 7	20,7225	1133	pélete
RA0309 Dieta Inicial 22	32,825	1133	pélete
RA0309 Dieta Inicial 12	153,62	2832	calda
RA0309 Dieta Inicial 24	173,7425	2832	calda
RA0309 Dieta Inicial 10	104,2125	2832	pélete
RA0309 Dieta Inicial 28	100,6525	2832	pélete
RA0309 Dieta Inicial 5	0	305	Ronozyme

RA0309 Dieta Inicial 26	0	605	Ronozyme
-------------------------	---	-----	----------

Tabela 5: Atividade da fitase e quantificação por ELISA da fitase em Dietas Iniciais e Esfareladas

Dietas Iniciais	Atividade Extratável Média (FTU/kg)	Resultado ELISA ng/mL
T1	37,7	0,0
T2	301,1	4,9
T3	426,3	16,7
T4	74,8	0,0
T5	209,8	7,5
T6	449,3	17,3
T7	58,0	0,0
T8	152,7	4,0
T9	806,6	13,3
T10	436,5	18,4
Dietas Esfareladas		
T1	50,6	0,0
T2	142,2	4,5
T3	353,7	11,4
T4	68,7	0,0
T5	167,7	12,7
T6	237,8	9,1
T7	50,4	0,9
T8	234,4	8,8
T9	301,7	13,6
T10	711,0	22,5

EXEMPLO 6: Produção de Anticorpos Monoclonais contra a fitase

- Os anticorpos monoclonais contra a fitase foram gerados utilizando um método baseado no inicialmente descrito por Kohler G., Milstein C. Nature 256, 495-497 (1975). Imunizou-se ratinhos (raça Alderley Park) com a proteína fitase (Ref. *Pichia pastoris* NOV 9X 10/13/03). Administrou-se três doses de 20 µg por injeção subcutânea em intervalos de duas semanas. A primeira dose incluiu adjuvante completo de Freund; a segunda e terceira

doses incluíram adjuvante incompleto de Freund. Pelo menos seis semanas depois da terceira dose administrou-se aos ratinhos um reforço com doses de 20 µg de fitase administrada por via intravenosa sem adjuvante. Colheu-se os baços quatro dias depois do reforço intravenoso. Lavou-se os linfócitos dos baços com Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) administrado através de seringas com agulhas de calibre 20.

Obteve-se células NS0 de mieloma (HGPRT-) da Coleção Europeia de Culturas de Células. Cultivou-se as células de mieloma em DMEM contendo 584 mg/L de L-glutamina, 13,6 mg/L de hipoxantina, 3,88 mg/L de timidina e soro fetal bovino (FBS) a 10%, a 37°C em CO₂ a 5%. As células de mieloma foram selecionadas para fusão quando estavam a uma densidade de cerca de 5×10^5 /mL.

Misturou-se os linfócitos de um único baço (aproximadamente 2×10^8) com 2×10^7 células NS0 de mieloma. Sedimentou-se a mistura de células por centrifugação e rejeitou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se suavemente o sedimento de células e fundiu-se em seguida através da adição gota a gota de 1 mL de um polietileno glicol (1500) a 50% em tampão de HEPES pH8 ao longo de um minuto. Adicionou-se então lentamente meio de cultura completo (DMEM contendo L-glutamina, hipoxantina, timidina e FBS) ao longo de vários minutos até um volume final de 50 ml. Aplicou-se em seguida a fusão resultante em placas de cultura de tecido de 96 poços. Várias horas depois, adicionou-se por cima aos poços de fusão um volume igual de meio completo contendo também hipoxantina, timidina e 0,352 mg/L de aminopterin.

Aproximadamente duas semanas após fusão os sobrenadantes da cultura foram analisados quanto à presença de anticorpos específicos contra a fitase utilizando um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de captura de anticorpo com base no método descrito por Engvall E., e Perlmann P. *Immunochemistry* 8, 871-874 (1971); e Harlow E. et al., *Antibodies-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) pág. 182-183.

Adicionalmente, os sobrenadantes da cultura foram também analisados por Biacore®, uma técnica de análise de interação biomolecular

utilizando tecnologia de ressonância de plasmônio superficial, para seleccionar anticorpos capazes de capturar fitase da solução e também para detectar pares de anticorpos capazes de se ligar simultaneamente à fitase. O método foi desenvolvido a partir do descrito por Fägerstam L. et al., J. Mol. Recognition 3, 208-214 (1991).

As células de hibridoma selecionadas foram depois passadas através de pelo menos dois ciclos de clonagem por diluição limitante seguidos de reanálise, para garantir tanto a clonabilidade como a estabilidade dos hibridomas. Preparou-se bancos de hibridomas congelados.

A produção de anticorpos monoclonais selecionados foi conseguida aumentando a escala da cultura de tecido. Os anticorpos foram purificados dos sobrenadantes das culturas por cromatografia de afinidade utilizando proteína G Sepharose com um método corrente como descrito em Antibody Purification Handbook publicado por Amersham Biosciences (part of GE Healthcare).

EXEMPLO 7: Tira Imunológica de Anticorpo Monoclonal

A tira imunológica de fluxo lateral compreendia uma membrana de detecção de nitrocelulose ($2,5 \times 18$ cm), aplicada em um suporte de plástico, na qual se pulverizou uma linha de 1 mm de anticorpo monoclonal antifitase de uma das linhagens de células n°PHY36 (ACC2699), n°PHY37 (ACC2700) ou n°PHY46 (ACC2701). Pulverizou-se uma linha de controle reagente de anticorpo anticamundongo de burro em paralelo acima da linha do primeiro anticorpo. A porção da extremidade inferior da tira de nitrocelulose é coberta com um pedaço de tira de poliéster. A tira de poliéster é primeiramente tratada com 0,5% de BSA, 0,5% de poli(álcool vinílico) e 0,1% de Triton X-100; tampão de fosfato a 50 mM, pH 7,4 e o anticorpo monoclonal antifitase de n°PHY34 (ACC2698) conjugado com ouro coloidal (anticorpo conjugado com ouro coloidal de 40 nm da Capricorn Products, Inc., Portland, ME). Deixa-se secar a tira de poliéster. A tira de poliéster é depois coberta com uma almofada de aplicação de amostra em algodão. A almofada de aplicação da amostra também foi pré-tratada com 0,1% de Triton X-100 e tampão de borato a 0,1 M, pH 8,5 e deixou-se secar. Flanqueando a outra

extremidade ou extremidade superior da tira de nitrocelulose encontra-se outra almofada de algodão para absorver a solução da amostra depois de ter passado sobre as áreas de anticorpo de ensaio e anticorpo de controle na nitrocelulose. Esta placa completada foi depois cortada em tiras de ensaio

5 de 4 mm para caber em um cassete de plástico com um poço de aplicação de amostra oval posicionado acima da almofada de amostra e uma janela de detecção retangular posicionada acima da área de detecção da membrana de nitrocelulose.

A Figura 5 demonstra que todas as três linhas de anticorpos monoclonais, PHY46, PHY36 e PHY37 foram capazes de detectar a enzima fitase em amostras de alimentos à base de milho contendo fitase. O anticorpo monoclonal antifitase PHYMAb 28 não funcionou no ensaio de tira imunológica (dados não apresentados).

10

Exemplo 8: Reatividade do Anticorpo Monoclonal Para Várias Proteínas Fitases

15

Este exemplo demonstra a diferença na reatividade do anticorpo monoclonal antifitase para várias enzimas fitase de fontes bacterianas e fúngicas. As tiras imunológicas foram preparadas e utilizadas como se descreveu acima no Exemplo 7. Utilizou-se anticorpo monoclonal antifitase PHY37

20 como anticorpo de revestimento e utilizou-se PHY34 como anticorpo marcado (marcado com ouro coloidal). Utilizou-se amostras de outras enzimas fitase comerciais como amostras incluindo: Ronozyme[®], Phyzyme[®] e Natuphos[®].

Os resultados na Figura 6 demonstram que as tiras imunológicas preparadas com anticorpos policlonais antifitase detectam a fitase Quantum[®] e a Phyzyme[®] as quais são enzimas fitase provenientes de *E. coli*, mas não detectaram as enzimas fitase provenientes de fungos tais como Ronozyme[®] e Natuphos[®]. As tiras imunológicas preparadas com anticorpos monoclonais antifitase detectaram apenas a fitase Quantum[®].

25

Exemplo 9: ELISA de Anticorpo Monoclonal

30

Este exemplo descreve a detecção e determinação quantitativa da enzima fitase em uma amostra de milho utilizando anticorpos monoclo-

nais em uma técnica imunológica de ELISA.

Revestiu-se as placas de poços múltiplos (Nunc, Maxisorp) a 4°C dum dia para o outro com o anticorpo monoclonal nº46 (linhagem de células PHY46-ACC2701) antifitase a uma concentração de 1 µg/mL, diluído em borato de sódio/ácido bórico a 50 mM, NaCl a 75 mM, pH 8,5. Lavou-se as placas cinco vezes com Tris a 10 mM contendo 0,05% de Tween-20 e 0,03% de azida de sódio pH 8,0) (tampão de lavagem). Nota: efetuou-se o mesmo passo de lavagem após cada período de incubação para eliminar anticorpos/amostras não-ligados. Bloqueou-se então as placas durante 45 min. à temperatura ambiente com albumina de soro bovino a 1%, 0,05% de Tween-20, 0,03% de azida de sódio, NaCl a 150 mM em fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4 (diluyente). Adicionou-se à placa cem microlitros de cada amostra e incubou-se durante 1,5 h à temperatura ambiente. Adicionou-se em seguida o anticorpo monoclonal PHY28 antifitase biotinilado (diluído a 1 µg/mL em diluyente) às placas e incubou-se durante 1 h a 37°C. Adicionou-se o anticorpo de detecção (diluiu-se a estreptavidina marcada com fosfatase alcalina até 2 µg/mL em diluyente) às placas e incubou-se durante 1 h a 37°C. Adicionou-se o substrato, fosfato de para-nitrofenilo (pNPP) e deixou-se desenvolver durante 30 min à temperatura ambiente. Mediu-se a absorvância a 405 nm com 492 nm como referência.

A curva de calibração da fitase produziu a curva padrão sigmóide esperada utilizando um ajuste de curva de 4 parâmetros (ver Figura 7). A curva foi representada linear contra log com uma gama desde 0 até 64 ng/mL. Para representar a curva de calibração de 4 parâmetros em um eixo dos X logarítmico, o padrão de 0 ng/mL tem de ser introduzido no programa de análise a 0,001 ng/mL em vez de 0 ng/mL. O programa de análise utilizado foi o Software WinSelect® para o leitor de placas Tecan Sunrise®, embora possa ser utilizado qualquer programa de ajuste de curva de quatro parâmetros.

Exemplo 10: Reatividade Cruzada do Anticorpo Monoclonal com Outras Enzimas fitase

Os anticorpos monoclonais da presente invenção foram avalia-

dos em relação à sua reatividade cruzada com a enzima fitase fúngica, Ronozyme[®], e à sua especificidade para a fitase Quantum[®] (Nov9X) utilizando os ensaios ELISA descritos acima no Exemplo 9.

Os resultados são indicados na Tabela 6. Os anticorpos monoclonais nº36 e 37 reagiram de modo cruzado com a fitase de *E. coli* (Phyzyme[®]). O Mab nº34 não tinha reatividade cruzada com a Phyzyme, mas reagiu com a fitase Quantum[®] proveniente da enzima *E. coli*. Os anticorpos monoclonais nº46 e nº28 foram também específicos para a fitase Quantum[®]. Nenhum dos anticorpos, incluindo o anticorpo policlonal de cabra, reagiu de modo cruzado com as enzimas fitase fúngicas, Ronozyme[®] ou Natruphos[®].

Para realizar reações imunológicas utilizando o Mab nº34, como anticorpo marcado com ouro, ele tornaria o ensaio específico para a fitase Quantum[®]. Os Mab nº46 e 28 também poderiam ser utilizados para preparar um imunoensaio específico para a fitase Quantum[®].

Tabela 6: Percentagem de Reatividade Cruzada dos Anticorpos Monoclonais para várias enzimas fitase

Fitase	Mab 34	Mab 36	Mab 37	Mab 46	Mab 28	Anti-Nov9X de Ca-bra
Quantum [®]	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Ronozyme [®]	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Phyzyme [®]	<0,01%	125%	64%	<0,01%	<0,01%	71%
Natruphos [®]	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%

Exemplo 11: ELISA da fitase Quick Quantum[®]

Este exemplo descreve a detecção e determinação semiquantitativa da enzima fitase em uma amostra de alimentos utilizando anticorpos monoclonais na técnica imunológica ELISA. O método e resultados típicos são mostrados nas Figuras 8A-J.

As placas multipoço (Nunc, Maxisorp) foram revestidas a 4°C

- dum dia para o outro com o anticorpo monoclonal antifitase nº46 (linhagem de células PHY46-ACC2701) a uma concentração de 1 µg/mL, diluído em borato de sódio/ácido bórico a 50 mM, NaCl a 75 mM, soro fisiológico tamponado pH 8,5. Lavou-se as placas cinco vezes com um tampão de base
- 5 Tris pH 8,0 (Tris a 10 mM contendo 0,05% de Tween-20 e 0,03% de azida de sódio pH 8,0). Bloqueou-se então as placas durante 1 h à temperatura ambiente com StabilCoat® (SurModics, Inc.) e secou-se durante 18-24 h a 30°C e 18% de umidade. Adicionou-se cem microlitros de cada amostra à
- 10 placa e incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente. Lavou-se a placa cinco vezes com água destilada e transferiu-se para papel absorvente. Adicionou-se anticorpo monoclonal antifitase PHY28 conjugado com peroxidase diluído a 1 µg/mL em albumina de soro bovino a 1%, 0,05% de Tween-20, 0,04% de Kathon CG® (Supelco, Inc.), NaCl a 150 mM em fosfato de sódio a 100 mM, pH 7,4 às placas e incubou-se durante 15 min à temperatura
- 15 ambiente. Adicionou-se o substrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e deixou-se desenvolver durante 15 min à temperatura ambiente. Mediu-se a absorvância a 650 nm ou comparou-se visualmente com os controles.

Exemplo 12: Estojo de Extração de Fitase

Utilização Desejada

- 20 Este kit de extração contém materiais para a extração de 20 amostras de alimentos. É necessária, mas não fornecida, água destilada ou desionizada.

Requisitos de Armazenagem- Conservar o kit à temperatura ambiente.

Materiais Fornecidos

- 25 1. 20 recipientes de extração
2. 2 saquetas de tampão de borato.
3. 2 frascos de hidróxido de sódio a 10 N (NaOH)
4. 2 tubos de Tween-20 a 10%
5. 1 tubo de 50 mL
- 30 6. Instruções de utilização

Materiais Recomendados Mas Não Fornecidos

1. Moinho de Alimentos (Cuisinart CCM-16PC)

2. Balança capaz de pesar 20 gramas
3. Proveta graduada de 100 mL
4. Recipiente de 1 litro

Cuidados

- 5 Manusear cuidadosamente a solução de hidróxido de sódio. Usar luvas para evitar exposição potencial da pele.

Instruções

1. Encher um recipiente adequado com 1 litro de água destilada ou desionizada.
- 10 2. Adicionar o conteúdo de uma saqueta contendo tetraborato de sódio.
3. Adicionar todo o conteúdo de um frasco contendo hidróxido de sódio (usar luvas).
4. Adicionar todo o conteúdo de um tubo de Tween-20.
5. Misturar bem até todos os sólidos estarem completamente dissolvidos.

15 Extração da Amostra

1. Encher o moinho de café Cuisinart com uma amostra representativa de 300 g e moer toda a amostra até se obter um tamanho de partícula muito fina tipo café instantâneo (regulação mais fina no moinho).
- 20 2. Medir 20 g de amostra de alimentos moídos e adicionar ao recipiente de extração. Alternativamente, encher o tubo de 50 mL até a marca de 35 mL, bater levemente o tubo em uma superfície plana para nivelar os alimentos no tubo, e adicionar ao recipiente de extração.
3. Adicionar 80 mL de tampão de extração ou encher o recipiente de extração até a marca de 110 mL. Agitar bem durante 1 min. É muito importante agitar bem as amostras durante o minuto completo para se obter extracções coerentes.
- 25 4. Deixar a amostra repousar durante 30 minutos antes de testar para permitir a deposição das partículas insolúveis.

Exemplo 13: Estojo de Detecção Rápida de Enzima para a fitase Quantum®

30 Introdução

Este kit de diagnóstico é concebido para a detecção de fitase Quantum® em alimentos. O ensaio é um método ELISA no formato de mi-

croplaca corrente (8 × 12 poços). O ensaio é rápido (45 minutos) bem como extremamente sensível. Ele permite a avaliação de 44 amostras em duplicado ou de 88 amostras em determinações simples. O kit também tem flexibilidade para testar tão poucas como 2-4 amostras em 12 ensaios separados.

- 5 O kit contém uma amostra de controle negativa e 3 positivas.

Princípio do Ensaio

Os poços da fase sólida estão revestidos com um anticorpo que reconhece especificamente a fitase Quantum®.

- 10 1ª reação: a fitase Quantum® presente na amostra liga-se ao anticorpo imobilizado, formando o complexo antígeno-anticorpo. Um segundo anticorpo, dirigido para a fitase Quantum®, liga-se ao complexo antígeno-anticorpo. Este anticorpo (o conjugado) está marcado com peroxidase de rábano-silvestre.

- 15 2ª reação: o complexo antígeno-anticorpo marcado com enzima converte um substrato em um produto azul. As amostras contendo a fitase Quantum® apresentam o desenvolvimento de uma cor azul, enquanto as amostras sem a fitase Quantum® permanecem incolores.

Requisitos de Armazenagem

- 20 O kit é estável até a data limite de validade indicada na etiqueta quando mantido refrigerado a 2-8°C.

Materiais Fornecidos

7. 96 micropoços revestidos com anticorpo
8. 4 frascos de 0,7 mL cada de controles de 0, 200, 400 e 800 unidades/kg de fitase Quantum®
25 9. 1 frasco de 6 mL de solução de conjugado de HRP
10. 1 frasco de 6 mL de solução de substrato TMB

Materiais Recomendados Mas Não Fornecidos

5. Estojo de Extração
30 6. Balança capaz de pesar 20 gramas
7. Proveta graduada de 100 mL
8. Moinho de Alimentos (Cuisinart CCM-16PC)

9. Garrafa de esguicho para água destilada/desionizada
10. Pipetas de 1 e 8 canais para 50 e 100 μ l
11. Pontas de pipetas
12. Fotômetro de microplaca munido com um filtro de 650 nm

5 Extração da Amostra

5. Encher o moinho de café Cuisinart com uma amostra representativa de 300 g e moer toda a amostra até se obter um tamanho de partícula muito fina tipo café instantâneo (regulação mais fina no moinho).
6. Medir 20 g de amostra de alimentos moídos e adicionar ao recipiente de extração.
7. Adicionar 80 mL de tampão de extração (Borato a 25 mM, pH 10,0 contendo 0,01% de Tween-20). Agitar bem durante 1 min. É muito importante agitar bem as amostras durante o minuto completo para se obter extrações coerentes.
8. Deixar a amostra repousar durante 30 minutos antes de testar, para permitir a deposição das partículas insolúveis.

Procedimento de Ensaio

Deixar todos os reagentes aquecer até a temperatura ambiente (18-30°C) antes de se utilizar (aproximadamente 30 min).

1. Retirar a placa microtítulo do saco de película metalizada. Retirar as filas de poços que não são necessárias para o ensaio e recolocar no saco de película metalizada. Selar o saco para manter os poços não utilizados secos.
2. Utilizando uma pipeta, transferir os controles e os extratos preparados para os poços da placa; 50 μ l por poço. Utilizando uma pipeta de 8 canais, fornecer a solução do conjugado de HRP a 50 μ l por poço a todos os poços da placa. Misturar o conteúdo dos poços sacudindo levemente a placa para a frente e para trás em uma superfície plana durante 10-20 segundos sem salpicar reagentes dos poços. Incubar durante 30 min à temperatura ambiente.
3. Esvaziar o conteúdo dos poços. Lavar todos os poços enchendo os poços com água destilada/desionizada e eliminar o conteúdo sacudin-

do. Repetir 5 vezes, e em seguida bater levemente a placa de modo firme em várias camadas de toalhas de papel para eliminar a água residual.

4. Utilizando uma pipeta de 8 canais, dispensar a solução de substrato TMB (frasco âmbar) a todos os poços da placa a 100 µl por poço. Incubar durante 15 min à temperatura ambiente.
5. Ler a densidade óptica a 650 nm ou comparar visualmente os poços das amostras com os poços de controle.

Análise de Resultados

10 O ensaio está a funcionar adequadamente se os controlos (200, 400 e 800 unidades/kg) apresentarem uma cor azul com intensidade gradualmente crescente e o controle negativo permanecer incolor. Contacte o seu representante Syngenta se tiver alguma dúvida sobre a realização do ensaio.

15 Modificações dos atuais reagentes, métodos e kits para detectar proteína de enzimas alimentares, em particular fitase, serão óbvias para os versados na técnica a partir da descrição pormenorizada precedente.

Embora a presente invenção tenha sido descrita relativamente a modalidades específicas daquela, entender-se-á que são possíveis numerosas variações, modificações e outras modalidades, e por conseguinte, todas essas variações, modificações e modalidades são para ser entendidas como estando dentro do âmbito da presente invenção.

Um grande número de patentes, pedidos e referências são discutidos ou citados nesta especificação, e todos eles são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de que reage especificamente com uma fitase de *E. coli* ou uma fitase derivada de uma fitase de *Escherichia coli*.
- 5 2. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser produzido pela linhagem de células de hibridoma PHY36 depositada como DSM ACC2699; ou linhagem de células PHY37 depositada como DSM ACC2700.
- 10 3. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fitase é a fitase Quantum® (Nov9X).
- 15 4. Anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de ser produzido pela linhagem de células de hibridoma PHY34 depositada como DSM ACC2698; linhagem de células PHY46 depositada como DSM ACC2701 ou linhagem de células PHYTASE MAb28 depositada como DSM ACC2715.
5. Fragmento de ligação, caracterizado pelo fato de ser ao antígeno de um anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 1.
6. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser marcado.
- 20 7. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de ser marcado com biotina, peroxidase, fosfatase alcalina, glucoamilase ou .beta.-galactosidase.
8. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de ser marcado com .sup.125 I, .sup.131 I ou trítio.
- 25 9. Suporte sólido, caracterizado pelo fato de ser ligado ao anticorpo da reivindicação 1.
10. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 1 e um tampão ou diluente.
- 30 11. Linhagem de células de hibridoma, caracterizada pelo fato de que produz o anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 1.
12. Linhagem de células de hibridoma, de acordo com a reivindi-

cação 11, caracterizada pelo fato de que a linhagem de células PHY36 depositada como DSM ACC2699 ou linhagem de células PHY37 depositada como DSM ACC2700.

5 13. Linhagem de células de hibridoma, caracterizada pelo fato de que produz o anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 3.

14. Linhagem de células de hibridoma, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a linhagem de células é a PHY34 depositada como DSM ACC2698; linhagem de células PHY46 depositada como DSM ACC2701 ou linhagem de células PHYTASE MAb28 depositada
10 como DSM ACC2715.

15. Imunoensaio para uma fitase de *E. coli* ou uma fitase derivada da fitase de *E. coli*, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) contatar o anticorpo monoclonal como definido na reivindicação 1 com uma amostra suspeita de conter a fitase durante um período de
15 tempo e em condições adequadas para ligação do anticorpo à fitase,
b) determinar a ligação entre o anticorpo e a fitase, e
c) relacionar a ligação com a presença ou quantidade da fitase na amostra.

20 16. Imunoensaio de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser um RIA.

17. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de ser um EIA.

25 18. Imunoensaio para a detecção de uma fitase de *E. coli* ou uma fitase derivada de uma fitase de *E. coli* em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) preparar um extrato da amostra na presença de um anticorpo monoclonal primário, como definido na reivindicação 1, o qual reconhece imunologicamente a fitase no extrato de modo a formar um complexo anticorpo primário-fitase;

30 b) preparar um formato de fase sólida possuindo uma dimensão tridimensional para formar um volume com uma multiplicidade de espaços intersticiais ligando, ao formato de fase sólida, um anticorpo secundário de-

sejado capaz de reconhecer imunologicamente a fitase e em que o anticorpo secundário está conjugado com um meio de detecção e em que o anticorpo secundário também reconhece imunologicamente a fitase;

5 c) combinar o extrato do passo (a) com o formato preparado no passo (b) de acordo com o que o extrato é absorvido através dos espaços intersticiais do formato de fase sólida preparado capturando o complexo anticorpo primário-fitase;

d) detectar a fitase pela presença do referido complexo capturado de anticorpo primário-fitase.

10 19. Imunoensaio de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a fitase é a fitase Quantum®.

20. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o formato de fase sólida é acetato de celulose, celulose, nitrocelulose ou náilon.

15 21. Imunoensaio de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o formato de fase sólida é constituído por camadas múltiplas sobrepostas e contíguas em que cada camada é capaz de capturar uma fitase diferente.

20 22. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma almofada de absorção de amostra do formato de fase sólida.

23. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma tira compreendendo um anticorpo antifitase marcado.

25 24. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o meio de detecção é ouro coloidal.

25. Estojo de detecção pelo imunoensaio, como definido na reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) um meio de extração da fitase a partir de uma amostra; e

30 b) um formato de fase sólida compreendendo um anticorpo monoclonal antifitase primário, como definido na reivindicação 1 e possuindo uma dimensão tridimensional para formar um volume com uma multiplicidade

de de espaços intersticiais ligando, ao formato de fase sólida, um anticorpo secundário desejado capaz de reconhecer imunologicamente a fitase e em que o anticorpo secundário está conjugado com um meio de detecção e em que o anticorpo secundário também reconhece imunologicamente a fitase.

5 26. Estojo, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um recipiente contendo um tampão.

27. Estojo, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um meio para fornecer a amostra ao formato de fase sólida.

10 28. Imunoensaio de detecção e quantificação de uma fitase Quantum[®] (Nov9X) caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

a) preparar um extrato de uma amostra;

15 b) incubar uma porção do extrato com um anticorpo monoclonal antifitase primário, como definido na reivindicação 1, que se liga à fitase, encontrando-se o anticorpo primário ligado a um veículo sólido, e com um anticorpo antifitase secundário que se liga à fitase para formar um complexo anticorpo-fitase-anticorpo,

20 c) lavar o complexo anticorpo-fitase-anticorpo para eliminar o anticorpo secundário não-ligado;

d) adicionar um anticorpo de detecção que reaja imunologicamente com o anticorpo secundário em que o anticorpo de detecção está marcado; e

25 e) medir a quantidade de anticorpo marcado ligado ou não-ligado para determinar a concentração de fitase.

29. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a etiqueta detectável é uma enzima.

30 30. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a enzima é fosfatase alcalina, peroxidase ou β -galactosidase.

31. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a enzima produz um produto reacional insolúvel.

32. Estojo de detecção e quantificação pelo imunoensaio, como definido na reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que compreende:

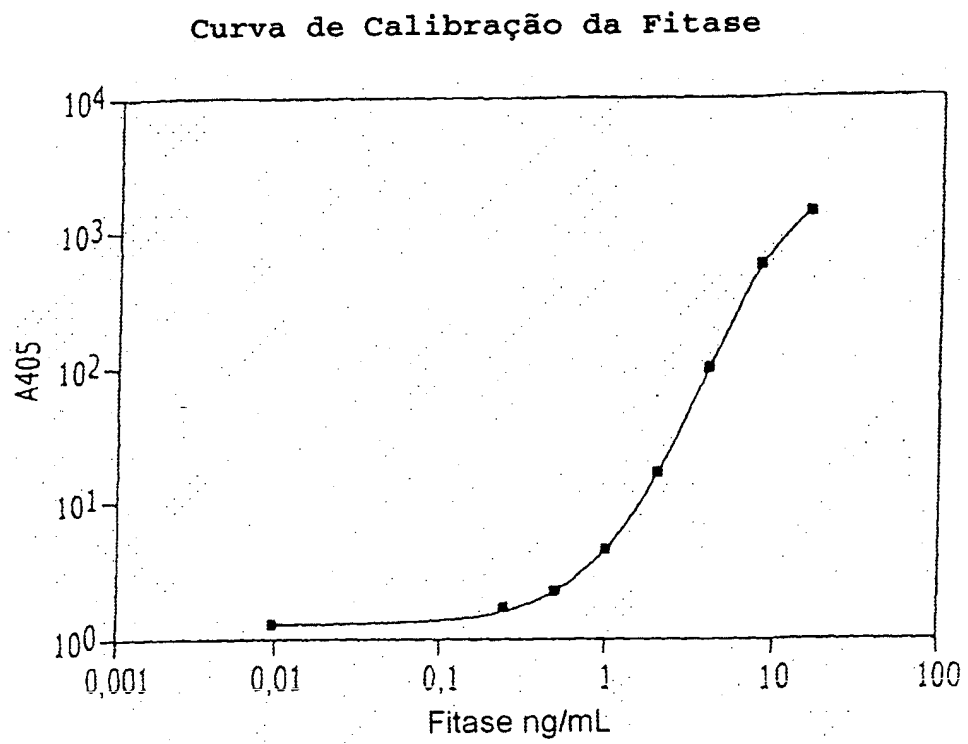
- a) um meio de extrair a fitase Quantum[®] de uma amostra;
- b) um suporte sólido compreendendo um anticorpo antifitase primário ligado ao suporte sólido;
- c) um anticorpo antifitase secundário; e
- d) um anticorpo de detecção capaz de se ligar imunologicamente ao anticorpo secundário e em que o anticorpo de detecção está marcado com uma etiqueta detectável.

33. Estojo, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a etiqueta detectável é uma enzima.

34. Estojo, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a enzima de detecção é fosfatase alcalina, peroxidase ou β -galactosidase.

35. Estojo, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a enzima produz um produto reacional solúvel ou insolúvel.

36. Estojo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um substrato para a enzima.



Actividade Residual de Nov9X Após Incubação a 99°C
04-28-03, TAM Purificada por FPLC Lote # PHY-PP9XR-

PB200L

Comparação da Actividade contra os Dados de ELISA

Fig. 1

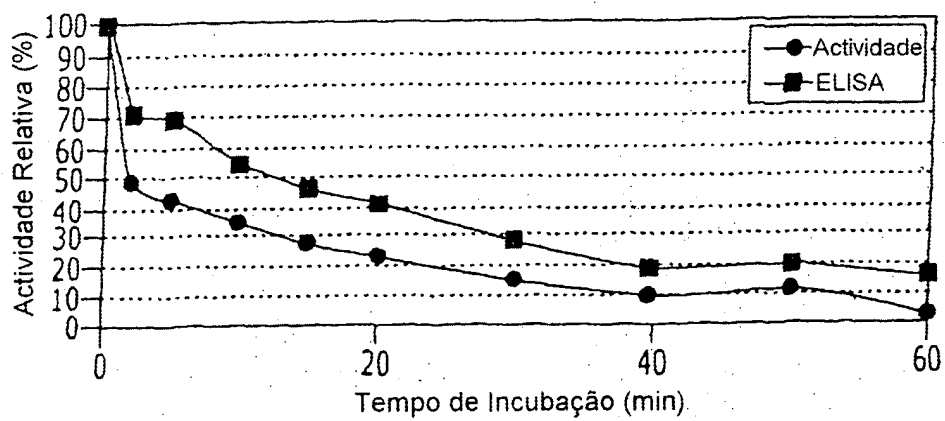


Fig. 2

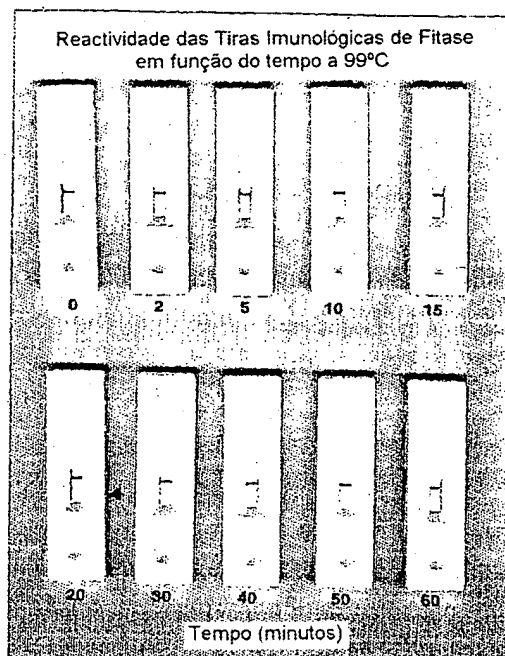


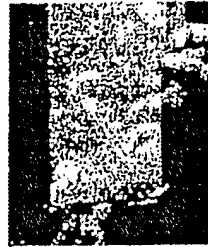
Fig. 3



1. Encher o tubo até à marca 15.



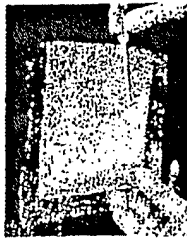
2. Adicionar alimento ao saco de extracção.



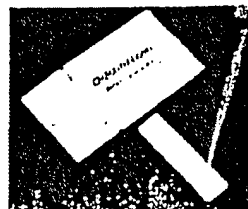
3. Adicionar o tampão de extracção ao saco.



4. Esperar 10 min, depois cortar saco a meio.



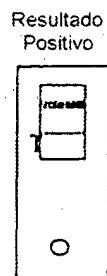
5. Retirar extracto com a pipeta



6. Adicionar algumas gotas ao poço da amostra.



7. Esperar 5 min. e ler em seguida os resultados.



Janela de Resultado

Poço de Amostra

Fig. 4

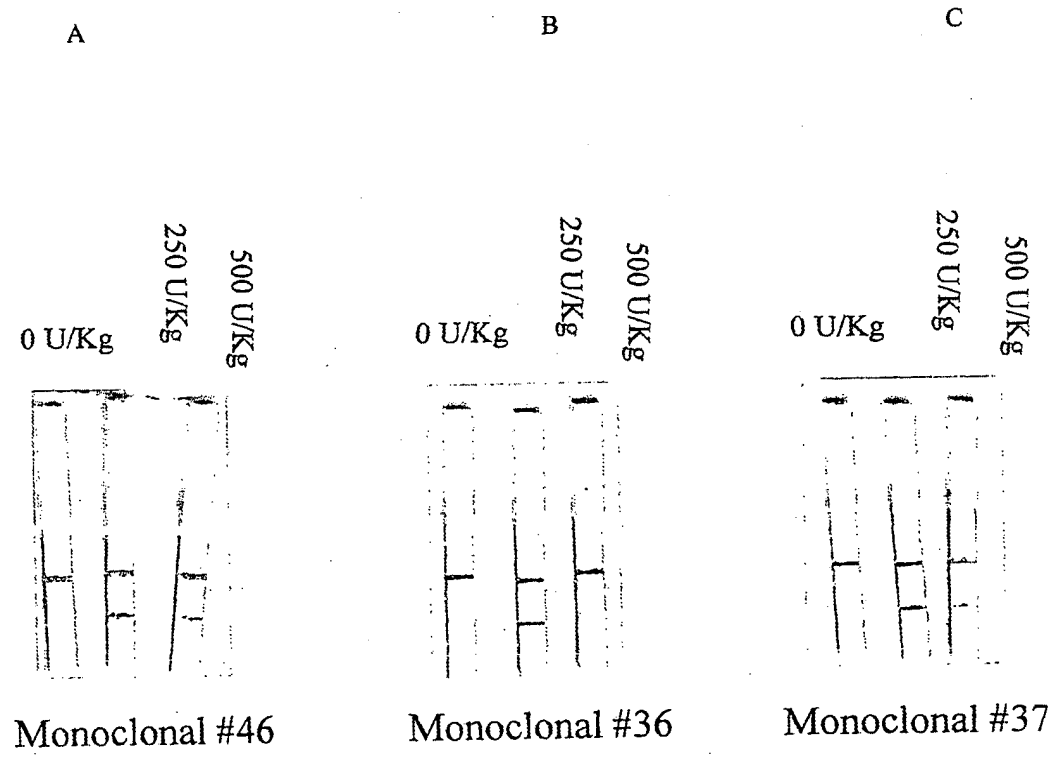


Fig. 5

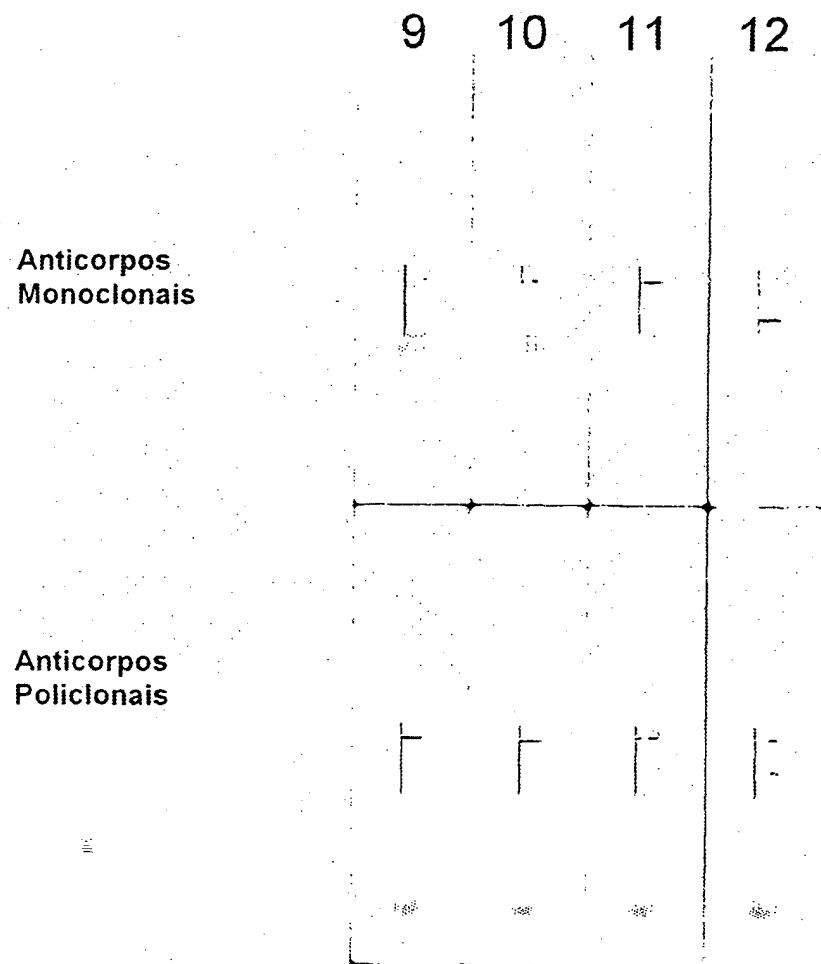


Fig. 6

Curva de Calibração da Fitase

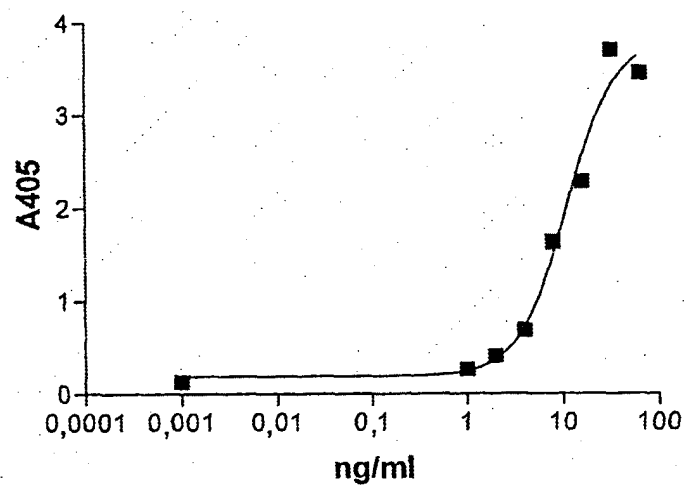


Fig. 7

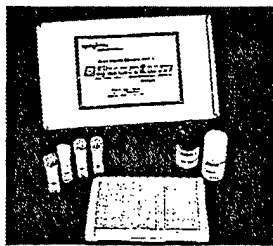


8A

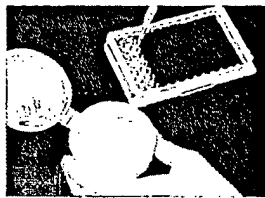
8B

8C

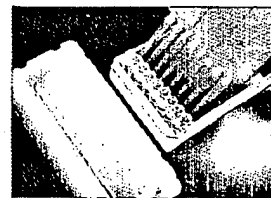
8D



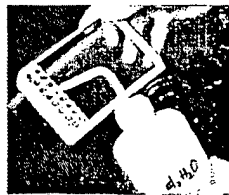
8E



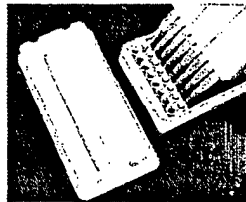
8F



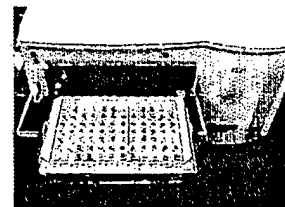
8G



8H



8I



8J



8K

Fig. 8

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPO MONOCLONAL, FRAGMENTO DE LIGAÇÃO, SUPORTE SÓLIDO, COMPOSIÇÃO, LINHAGEM DE CÉLULAS DE HIBRIDOMA, IMUNOENSAIOS E ESTOJOS DE DETECÇÃO DOS MESMOS".**

A presente invenção refere-se a área de imunologia e mais especificamente refere-se aos anticorpos monoclonais antifitase, métodos de imunoensaio, kits e reagentes, para a detecção de uma fitase de ou derivada da fitase de *E. coli*, em particular, a fitase Quantum[®]. A invenção refere-se ainda a linhagens de células de hibridoma que produz anticorpos monoclonais antifitase.