



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0915086-2 B1



(22) Data do Depósito: 05/06/2009

(45) Data de Concessão: 12/05/2020

(54) Título: DETECÇÃO DO USO DE CANABIS

(51) Int.Cl.: G01N 33/94; G01N 33/68; C07K 16/16; G01N 33/542.

(30) Prioridade Unionista: 12/06/2008 FI 20085579.

(73) Titular(es): TEKNOLOGIAN TUTKIMUSKESKUS VTT.

(72) Inventor(es): TAKKINEN, KRISTIINA; SÖDERLUND, HANS; PULLI, TIMO.

(86) Pedido PCT: PCT FI2009050481 de 05/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/150295 de 17/12/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/12/2010

(57) Resumo: DETECÇÃO DO USO DE CANABIS É descrito um parceiro de ligação, especialmente um fragmento de anticorpo que reconhece especificamente um complexo imune antígeno-anticorpo entre anti-THC e THC (tetrahydrocannabinol). O parceiro de ligação facilita um imunoenensaio homogêneo não competitivo para a detecção do uso de cannabis. É também descrito um kit de teste compreendendo o parceiro de ligação. Preferivelmente, o imunoenensaio é aplicado para teste em estrada de salina de motoristas suspeitos.

DETECÇÃO DO USO DE CANABIS

Campo da Invenção

A invenção provê meios para aperfeiçoar imunoenaios
5 para a detecção do uso de cannabis. Em particular a
invenção refere-se a um parceiro de ligação, especialmente
um fragmento de anticorpo que é capaz de ligar um complexo
imune entre tetrahydrocannabinol (THC) e um anticorpo anti-
THC. A invenção está direcionada também para um kit de
10 teste compreendendo o parceiro de ligação, e ao uso do dito
parceiro de ligação para detecção do uso de cannabis.
Adicionalmente, a invenção refere-se a um imunoenasiao, onde
o dito parceiro de ligação é utilizado. Ainda
adicionalmente, a invenção está direcionada para um
15 polinucleotídeo que codifica o dito parceiro de ligação, e
a uma célula hospedeira capaz de o expressar.

Antecedente Técnico da Invenção

O abuso de drogas é uma ameaça grave especialmente na
20 segurança de trânsito, e, desta forma, um número de
ensaios foi desenvolvido para o teste conveniente de drogas
viciantes. Muitos dos testes são imunoenaios, e são
principalmente imunoenaios competitivos, que geralmente
são menos específicos que os não competitivos. Kerrigan e
25 Phillips compararam, por exemplo, 12 ELISAs ("enzyme linked
immunosorbent assay" - ensaio imunoabsorvente ligado a
enzima) comercialmente disponíveis para opiatos,
metanfetamina, benzodiazepinas, metabólitos da cocaína,
fenciclidina e canabinóides em sangue total e urina
30 (Kerrigan S., & Phillips, W., 2001 Clinical Chemistry
47(3):540-547). O formato do teste era imunoenasiao
competitivo, e os resultados não foram totalmente
satisfatórios produzindo alguns resultados falsos e
reatividade cruzada indesejada.

Drogas viciantes podem ser testadas não apenas a partir de sangue e urina, mas também a partir de saliva, que é a matriz de teste de escolha para teste em estradas. Lo Muzio *et al.* testaram um teste de varredura imunológica comercial rápido para a detecção de drogas na urina, e compararam duas matrizes biológicas: uma não convencional, saliva, e uma tradicional, urina. Encontraram que as amostras de saliva eram negativas no teste imunológico para canabis, THC, benzodiazepinas, e anti-depressivos tricíclicos embora a análise de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS) tenha revelado baixas concentrações destes, e concluíram que o kit de teste deveria ser aperfeiçoado antes de ser utilizado com saliva (Lo Muzio L., *et al.*, 2005, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18(3):567-573).

O documento WO 2004/046733 descreve um imunoensaio para testar analitos pequenos tais como drogas viciantes. O ensaio utiliza um primeiro anticorpo específico para o analito, e um segundo anticorpo específico para um complexo imune (IC) entre o primeiro anticorpo e o analito de maneira a aumentar a sensibilidade e especificidade de um ensaio. O anticorpo anti-IC utilizado foi obtido a partir de uma biblioteca de apresentação em fago de fragmento de anticorpo humano naive por pré-incubação dos fagos apresentados com o primeiro anticorpo ligado para separar aqueles que se ligam ao primeiro anticorpo como tal, após o que os fagos não ligados foram separados e incubados com uma mistura de analito e primeiro anticorpo imobilizado de maneira a selecionar os fagos que se ligam ao complexo imune formado entre o primeiro anticorpo imobilizado e o analito, mas não ao anticorpo como tal. Resultados muito bons para a determinação de morfina em saliva foram obtidos.

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) é o composto parental da cannabis, e é rapidamente metabolizado a 11-nor- Δ^9 -THC-COOH ou 11-OH- Δ^9 -THC o qual pode ser determinado na urina. Desta forma, o uso de cannabis é preferivelmente detectado

5 por ensaio de Δ^9 -THC na saliva, que é uma indicação melhor do uso recente que quando os metabólitos são detectados na urina. Entretanto, se tornou difícil desenvolver um teste rápido para este analito, e os kits de teste no mercado não são suficientemente sensíveis.

10 A patente US 6.326.156 e Ullman et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci 90:1184-1189 descrevem um imunoensaio utilizando anticorpos anti-IC para aumentar a afinidade e especificidade de anticorpos primários. Nestes documentos, foi desenvolvido um anticorpo anti-IC secundário, que liga

15 anticorpo anti-analito primário que é combinado com o analito, mas que não liga o anticorpo primário ou o analito separadamente. É descrito um anticorpo que reconhece um complexo imune de um anticorpo para tetrahydrocannabinol (THC). O anticorpo anti-IC foi obtido utilizando-se um

20 anticorpo anti-IC rotulado por afinidade como imunógeno e seleção de um anticorpo anti-IC cuja ligação foi aumentada pela presença de Δ^9 THC. Alguma reatividade cruzada com, por exemplo, metabólitos de THC foi observada, a qual é indesejável em análise forense de droga. Os anticorpos

25 foram preparados por técnica de hibridoma convencional, a qual os torna muito grandes para aplicação em imunoenaios homogêneos.

Kintz P. et al. testaram um dispositivo comercial para o teste de drogas na saliva, e compararam os

30 resultados com os resultados da análise GC-MC, e encontraram que o dispositivo de teste identificou apenas um motorista exposto ao THC, enquanto que 18 motoristas testaram positivos com GC-MC. Concluíram que uma limitação

atual do uso desta amostra para teste em estrada é a ausência de um imunoenensaio adequado que detecte o composto parental (THC) em concentrações suficientemente baixas (Kintz P., et al., 2005. J. Anal. Toxicol. 29(7):724-727).

5 Os imunoenensaio atuais para a determinação do uso de cannabis não são satisfatórios, isto é, devido à baixa especificidade e sensibilidade. Desta forma, existe uma necessidade por um teste para uso de cannabis fácil, rápido e confiável, o qual possa ser utilizado, por exemplo, para
10 teste em estrada e preferivelmente para a análise de amostras de fluido oral, que sejam não invasores, fáceis de realizar, e possam ser realizados sob supervisão intensiva. A presente invenção atente pelo menos parte destas necessidades.

15

Sumário da Invenção

A presente invenção provê um novo reagente que facilita a detecção rápida e confiável do uso de cannabis. O reagente é uma proteína capaz de reconhecer
20 especificamente um complexo imune formado entre canabinóide e anti-canabinóide. Mais especificamente, a presente invenção provê um parceiro de ligação compreendendo as regiões determinantes complementares (CDRs) de um anticorpo de cadeia leve e cadeia pesada, onde as ditas regiões de
25 cadeia leve apresentam as seqüências de aminoácidos 23-35, 51-57 e 93-100 da SEQ ID NO.: 3, e as ditas regiões de cadeia pesada apresentam as seqüências de aminoácidos 29-35, 50-60 e 99-109 da SEQ ID NO.: 4.

A invenção adicionalmente provê um kit de teste
30 compreendendo o parceiro de ligação para a detecção de um canabinóide em uma amostra do corpo tomada de uma pessoa a ser testada por ter utilizado cannabis. Devido à alta especificidade e sensibilidade e preferivelmente tamanho pequeno do parceiro de ligação, é especialmente adequado

para um imunoenensaio homogêneo não competitivo que pode ser utilizado, por exemplo, na estrada para teste da saliva de motoristas suspeitos de uso de canabis.

Ainda adicionalmente, a invenção provê um imunoenensaio para a detecção de um analito em uma amostra tomada de um corpo, pelo que a amostra é reagida com um par reagente compreendendo um primeiro parceiro de ligação que se liga especificamente ao analito, e um segundo parceiro de ligação que se liga especificamente ao complexo do analito e o primeiro parceiro de ligação, e determinação da ligação do segundo parceiro de ligação ao dito complexo, indicando desta forma a presença do analito na amostra, onde o dito analito é um canabinóide, e o dito segundo parceiro de ligação compreende as regiões determinantes complementares (CDRs) de um anticorpo de cadeia leve e de cadeia pesada, onde as ditas regiões de cadeia leve apresentam as seqüências de aminoácidos 23-35, 51-57, e 93-100 da SEQ ID NO.: 3, e as ditas regiões de cadeia pesada apresentam as seqüências de aminoácidos 29-35, 50-60 e 99-109 da SEQ ID NO.: 4.

Ainda adicionalmente, a invenção provê um polinucleotídeo que codifica o parceiro de ligação, e uma célula hospedeira capaz de expressar o parceiro de ligação. O polinucleotídeo é DNA ou RNA.

Realizações vantajosas da invenção são apresentadas nas reivindicações dependentes.

Outros objetos, detalhes e vantagens da invenção ficarão claros a partir dos desenhos, descrição detalhada e exemplos a seguir.

30

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra as seqüências de aminoácidos da cadeia leve do anti-THC T3 Fab (SEQ ID NO.: 1), e cadeia pesada do anti-THC T3 Fab VH-CH1 (SEQ ID NO.: 2). São

indicadas as três regiões determinantes complementares CDR1, CDR2 e CDR3 de cada uma das ditas cadeias de imunoglobulina.

5 A Figura 2 mostra as seqüências de aminoácidos de cadeia leve do complexo imune anti-T3+THC Fab 104 (SEQ ID NO.: 3), e cadeia pesada do complexo imune anti-T3+THC Fab 104 (SEQ ID NO.: 4). São indicadas as três regiões determinantes complementares CDR1, CDR2 e CDR3 de cada uma das ditas cadeias de imunoglobulina.

10 A Figura 3 mostra os resultados do teste THC TR-FRET obtidos com a combinação de anti-THC T3 Fab e complexo imune anti-T3+THC Fab 104 para várias drogas e metabólitos de drogas.

15 **Descrição Detalhada**

Canabinóide é um nome geral de moléculas terpen-fenólicas encontradas em plantas de cannabis *Cannabis sativa*. Mais geralmente, engloba um grupo de moléculas, as quais são estruturalmente relacionadas ao

20 tetrahydrocannabinol (THC) e que se ligam ao receptor canabinóide. O THC é o canabinóide psicoativo principal da cannabis, e é sinônimo com Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e D9-tetrahydrocannabinol (D9-THC), os quais podem todos serem utilizados de forma intercambiável aqui. O THC é

25 metabolizado no corpo a 11-nor-D9-THC-COOH ou 11-OH-D9-THC, que são exemplos de outros canabinóides. O parceiro de ligação da invenção reconhece especificamente um complexo imune entre THC e anti-THC, pelo que a reação com os metabólitos é significativamente menor.

30 O parceiro de ligação da invenção pode ser utilizado em um ensaio sanduíche para a detecção de THC em uma amostra, pelo que a amostra é reagida com um par reagente compreendendo um primeiro parceiro de ligação que se liga especificamente a THC, e um segundo parceiro de ligação que

é capaz de reconhecer especificamente um complexo imune entre THC e anti-THC, e que é o parceiro de ligação da invenção. A ligação do segundo parceiro de ligação ao complexo imune entre o primeiro parceiro de ligação e o THC
5 indica a presença de THC na amostra.

"Parceiro de ligação" conforme utilizado aqui é usualmente uma proteína ou polipeptídeo, tal como anticorpos incluindo fragmentos de anticorpo que apresentam as propriedades de ligação desejadas. Um anticorpo é uma
10 molécula de imunoglobulina e pode pertencer a qualquer uma das classes IgG, IgM, IgE, IgA ou IgD; IgG e IgM sendo as mais freqüentemente utilizadas. Preferivelmente, os parceiros de ligação são fragmentos de anticorpo compreendendo o sítio de ligação a ligante, tal como
15 fragmento Fab, ou scFv. O fragmento conhecido como fragmento Fab (fragmento de ligação a antígeno) consiste em um domínio variável e constante de uma cadeia leve de imunoglobulina covalentemente ligada por uma ponte dissulfeto ao primeiro domínio variável e constante de uma
20 cadeia pesada de imunoglobulina. Fv (domínio variável) significa as regiões variáveis de uma molécula de imunoglobulina que são responsáveis pela ligação ao ligante. ScFv (Fv de cadeia única) significa uma molécula em que os domínios variáveis da cadeia pesada e leve de um
25 anticorpo são ligados por um peptídeo para formar uma cadeia polipeptídica única sintetizada a partir de uma molécula de mRNA única. As regiões variáveis de uma cadeia pesada e cadeia leve de imunoglobulina são em conjunto responsáveis pela ligação ao ligante. O ligante é uma
30 substância à qual o parceiro de ligação se liga, em conexão com anticorpos é um antígeno ou hapteno.

Os parceiros de ligação são convenientemente preparados utilizando-se uma biblioteca de parceiro de ligação de apresentação em fago recombinante, por exemplo,

como descrito no documento WO 2004/046733. quando o primeiro parceiro de ligação foi selecionado, é complexado com seu ligante e este complexo é utilizado para selecionar o segundo parceiro de ligação a partir da biblioteca recombinante. O primeiro parceiro de ligação sem o ligante é utilizado como contra-seleção. O segundo parceiro de ligação deve reconhecer apenas complexos, não o primeiro parceiro de ligação livre nem o antígeno livre de forma significativa.

10 Uma biblioteca de anticorpo de apresentação em fago pode ser construída por clonagem dos domínios de imunoglobulina que codificam cDNAs em um vetor de apresentação em fago apropriado. O DNA que codifica milhões de variantes de fragmentos de anticorpo é clonado em batelada no vetor como parte da proteína de capa do fago. Grandes bibliotecas contendo milhões de fragmentos de anticorpos com diferentes especificidades podem ser obtidas por transformação dos vetores em bactérias. O cultivo das bactérias leva à expressão dos fragmentos de anticorpos apresentados em fagos em sua superfície. O gene para o anticorpo apresentado é carregado pelo genoma do fago, desta forma ligando o genótipo com o fenótipo. a ligação física entre a proteína apresentada e seu DNA permite a varredura de um vasto número de variantes da proteína, cada uma ligada a seu DNA correspondente, por um procedimento de seleção *in vitro* simples chamado de "panning". Em sua forma mais simples, o "panning" é conduzido por incubação do conjunto de variantes apresentadas em fago com o ligante de interesse que foi imobilizado em um veículo, retirando por lavagem o fago não ligado, e eluindo especificamente o fago ligado por ruptura da ligação ao ligante. O fago eluído é então amplificado *in vivo*. O processo é repetido várias vezes, resultando no enriquecimento gradual do conjunto de fagos em favor das

seqüências de ligação mais fortes. Após cerca de 3 a 6 rodadas de seleção e amplificação, os melhores clones são seqüenciados e transformados em uma célula hospedeira para expressão posterior. A célula hospedeira pode ser uma
5 célula eucariótica ou procariótica, por exemplo, uma célula de levedura, animal, vegetal ou de inseto ou uma célula bacteriana. Pode mesmo ser uma célula de hibridoma, que após a transformação produz um anticorpo monoclonal recombinante. O parceiro de ligação recombinante ou pelo
10 menos parte deste pode ser também produzido sinteticamente.

O par reagente compreendendo um primeiro parceiro de ligação que reconhece canabinóide, e um segundo parceiro de ligação que reconhece um complexo imune entre o canabinóide e o dito primeiro parceiro de ligação torna factível um
15 ensaio sanduíche não competitivo para canabinóides. O sanduíche pode ser detectado por todos os imunoenaios padrão. Um parceiro pode ser imobilizado em um veículo, tal como um poço de micro-título ou uma pérola. Um sanduíche é formado na presença de analito e o outro
20 parceiro de ligação. O sanduíche pode ser detectado, por exemplo, pela utilização de anticorpos secundários ou por rotulagem de pelo menos um dos parceiros de ligação. O rótulo pode ser qualquer rótulo convencional, tal como um rótulo radioativo, uma enzima, ou um composto fluorescente.
25 O ensaio pode ser, por exemplo, ELISA ou FIA.

Uma grande vantagem de um par reagente compreendendo o parceiro de ligação da presente invenção é que possibilita um imunoensaio homogêneo, isto é, um imunoensaio que é conduzido em solução. A ausência de
30 etapas de imobilização e de lavagem torna o ensaio extremamente simples. O ensaio homogêneo provê uma ferramenta excelente e conveniente para testes unilaterais, por exemplo, a serem utilizados pela polícia em motoristas, etc. O imunoensaio provido pela invenção é até dez vezes

mais sensível que os ensaios competitivos presentemente no mercado. A amostra a ser analisada pode ser qualquer amostra de fluido corporal, tal como sangue, soro ou urina, mas preferivelmente é um fluido oral tal como saliva. O analito é preferivelmente THC.

Um imunoenensaio homogêneo preferido é um baseado em transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET), para uma revisão ver Szöllosi J. et al., 1998, Communications in Clinical Cytometry, 34: 159-179. Na FRET, energia de um fluoróforo molecular (doador) é excitada a um estado de alta energia e transferida para um outro fluoróforo (receptor) por meio de acoplamento intermolecular dipolo-dipolo. Isto é possível apenas se a distância entre o doador e o receptor é curta (10-100 Å) e o espectro de fluorescência do doador e o espectro de absorção do receptor parcialmente se sobrepuserem. A transferência de energia é então detectada como uma alteração na fluorescência. Freqüentemente é utilizada fluorescência resolvida no tempo (Hemmilä I. et al., 1988, Clin. Chem. 34:2320-2322).

A FRET pode ser aplicada à presente invenção por rotulagem de dois parceiros de ligação, que preferivelmente são fragmentos de anticorpos, com fluoróforos que formam um par doador-receptor de FRET. Quando os parceiros de ligação e o analito são pequenos, os fluoróforos ficam muito próximos, e um sinal de FRET mensurável é obtido.

Alternativamente, o imunoenensaio para uso de canabis pode ser, por exemplo, um teste sanduíche convencional em poços de micro-título ou um teste de fluxo lateral.

O parceiro de ligação da invenção pode ser incluído em um kit de teste, que pode conter adicionalmente quaisquer outros reagentes necessários para o ensaio juntamente com instruções para uso. Preferivelmente, o kit de teste contém também um primeiro parceiro de ligação para

ligar o analito. Mais preferivelmente o dito parceiro de ligação compreende as regiões determinantes complementares (CDRs) de uma cadeia leve cadeia pesada de anticorpo, onde as regiões de cadeia leve apresentam as seqüências de aminoácidos 24-35, 51-57, e 90-98 da SEQ ID NO.: 1, e as ditas regiões de cadeia pesada apresentam as seqüências de aminoácidos 27-36, 51-66 e 99-107 da SEQ ID NO.: 2. Preferivelmente, o kit de teste compreende reagentes para a realização de um ensaio não competitivo homogêneo, tais como, por exemplo, reagentes necessários para um teste TR-FRET. O kit pode compreender adicionalmente soluções reacionais, tampões, soluções de lavagem e meios de detecção, tais como rótulos e opcionalmente um fluorômetro.

A realização do teste pode ser tal que os reagentes estão no poço de uma placa micro-título e são adicionadas diluições em série da amostra. Em um modo preferido, por exemplo, para uso no campo policial, os reagentes estão na forma seca em um vaso. Saliva é adicionada, a qual dissolve os reagentes e o resultado pode ser lido sem processos adicionais.

Preferivelmente, o kit de teste compreende reagentes para o ensaio de múltiplas drogas viciantes, tais como reagentes para o ensaio, por exemplo, de morfina, codeína, heroína, anfetamina, metanfetamina, cocaína, barbituratos e benzodiazepinas. Neste caso o kit de teste pode compreender pares reagentes múltiplos fisicamente separados uns dos outros, por exemplo, na forma de um micro-arranjo ("*microarray*"), pelo que as drogas múltiplas podem ser testadas simultaneamente a partir de uma única amostra de saliva.

O parceiro de ligação da invenção compreende três CDRs de uma cadeia leve de anticorpo apresentando a seqüências da SEQ ID NO.: 3, e três CDRs de uma cadeia pesada de anticorpo apresentando a seqüência da SEQ ID NO.:

4. De acordo com uma realização da invenção o parceiro de ligação compreende toda a região variável, isto é, a parte de ligação a ligante de dita cadeia leve (VL) e da cadeia pesada (VH). Desta forma, pode conter os aminoácidos 1-111 da SEQ ID NO.: 3 e os aminoácidos 1-120 da SEQ ID NO.: 4. Em particular, o dito parceiro de ligação compreende as seqüências de aminoácidos da SEQ ID NO.: 3 e SEQ ID NO.: 4. Correspondentemente, o primeiro parceiro de ligação pode compreender toda a região variável da SEQ ID NO.: 1, e da SEQ ID NO.: 2, isto é, os aminoácidos 1-108 da SEQ ID NO.: 1 e os aminoácidos 1-118 da SEQ ID NO.: 2. Especialmente compreende as seqüências de aminoácidos das SEQ ID NOs.: 1 e 2. Variações e modificações menores de qualquer uma das seqüências ou sub-seqüências apresentadas no relatório descritivo e reivindicações também estão dentro do escopo da invenção, desde que não afetem a atividade ligante das proteínas. Tais variações e modificações incluem especialmente substituições conservativas de aminoácidos.

A invenção é ilustrada pelos exemplos não limitantes a seguir.

Exemplo 1

Desenvolvimento de anti-THC Fab

Camundongos foram imunizados com BSA conjugado com THC (Fitzgerald) em adjuvante de Freund, e amostras de soro foram testadas após segundo reforço, e o camundongo mostrando a melhor resposta contra o antígeno em ELISA direta foi selecionado para ser a fonte de uma biblioteca de apresentação em fago de anticorpo. Uma biblioteca de apresentação em fago de fragmento de anticorpo foi construída, fagos específicos para THC foram enriquecidos, e o fragmento do gene Fab de clones individuais foi isolado, expresso e caracterizado como descrito no

documento WO 2004/046733. Anti-THC T3 Fab foi escolhido para ensaio posterior.

A seqüência de aminoácidos da cadeia leve de anti-THC T3 Fab é apresentada como SEQ ID NO.: 1, e a cadeia VH-CH1 de anti-THC T3 Fab é apresentada como SEQ ID NO.: 2. As CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia leve de Fab correspondem aos aminoácidos 24-35, 51-57 e 90-98 da SEQ ID NO.: 1. As CDR1, CDR2 e CDR3 da cadeia pesada de Fab correspondem aos aminoácidos 27-36, 51-66 e 99-107 da SEQ ID NO.: 2. Os aminoácidos nº 1-108 da SEQ ID NO.: 1 representam a região variável da cadeia leve, e os aminoácidos nº 1-118 da SEQ ID NO.: 2 representam a região variável da cadeia pesada. Os aminoácidos nº 109-215 da SEQ ID NO.: 1 representam a região constante da cadeia leve kapa de camundongo, e os aminoácidos nº 119-221 da SEQ ID NO.: 2 representam a região CH₁ constante de camundongo da cadeia pesada. As seqüências de aminoácidos do anti-THC T3 Fab são também mostradas na Figura 1.

20 **Exemplo 2**

Desenvolvimento de um anticorpo anti-complexo imune para o complexo imune de anti-THC Fab e THC.

Seleção do anticorpo específico para o complexo imune a partir de uma biblioteca de apresentação em fago scFv humano naive.

O fragmento T3 Fab foi biotinilado com o kit ImmunoPure Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce). O anticorpo biotinilado foi purificado e o tampão foi trocado para PBS com colunas Econo-Pac 10DG (Bio-Rad, CA, EUA). 200 µl de uma biblioteca de apresentação em fago scFv humano naive (cadeia leve Kapa ou Lambda) em BSA/PBS foram pré-incubados com 10 µl de pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina (Dynal, M-280) e 0,5 µg de T3 Fab biotinilado durante uma noite a +4°C. A biblioteca de

apresentação em fago scFv humano naive foi construída a partir de linfócitos reunidos de 50 indivíduos saudáveis. O tamanho da biblioteca foi estimado como sendo de 1×10^8 clones. A biblioteca de apresentação em fago scFv humano naive contém os genes V_H específicos de IgM combinados ou com os genes V_L específicos para kapa ou para lambda. Os fagos não ligados foram separados das pérolas e 100 μ l destes foram incubados com 100 ng de THC, 500 ng de T3 Fab biotinilado, e 5 μ l de pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina por 1 h à temperatura ambiente em um agitador. O branco para o procedimento de seleção foi implementado de maneira similar, mas omitindo o THC da reação de ligação. As pérolas magnéticas foram lavadas cinco vezes com 0,5 ml de PBS e os fagos ligados foram eluídos com 100 μ l de HCl (pH 2,2) por 30 minutos. Os fagos eluídos foram neutralizados com Tris 1M e foram infectados em células de *E. coli* XL-Blue. As células foram cultivadas e os fagos foram purificados como descrito no documento WO 2004/046733. Após três rodadas de "panning" foi observado o enriquecimento, quando a quantidade de fagos eluídos foi comparada com a quantidade de fagos eluídos do poço de branco controle. O enriquecimento de ligantes específicos do complexo imune, formado por T3 Fab e THC, foi também claramente observado em um ELISA de fago quando os conjuntos de fagos eluídos das rodadas seletivas foram testados e pela análise dos clones de fago scFv individuais.

Caracterização dos clones individuais

Os clones de fago scFv individuais se ligando especificamente ao complexo T3+THC foram tomados, seqüenciados, expressos e testados. O clone 104 foi escolhido para exame posterior. Uma vez que os scFvs eram susceptíveis à agregação durante a expressão e purificação,

o clone específico para o complexo imune 104 foi convertido a um fragmento Fab por clonagem das regiões do gene da cadeia leve lambda humana e das regiões CH1 constantes de IgG1 aos genes V_L e V_H , respectivamente. Uma ponta do terminal C contendo seis resíduos de histidina foi inserida no terminal C de CH1 para purificação por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC). O fragmento Fab 104 foi clonado no vetor de expressão pKktac e a seqüência foi verificada. A seqüência de aminoácidos da cadeia leve do anti-T3+THC complexo imune Fab 104 é apresentada como SEQ ID NO.: 3 e a região Fab VH-CH1-6His-Tag como seqüência SEQ ID NO.: 4. Os aminoácidos nº 1-111 da SEQ ID NO.: 3 representam a região variável da cadeia leve, e os aminoácidos nº 1-120 da SEQ ID NO.: 4 representam a região variável da cadeia pesada. Os aminoácidos nº 112-216 da SEQ ID NO.: 3 representam a região constante da cadeia leve lambda humana, e os aminoácidos nº 121-223 da SEQ ID NO.: 4 representam a região constante da região CH₁ da cadeia pesada humana. Os seis resíduos de histidina no terminal C da região constante de cadeia pesada facilitam a purificação do fragmento Fab por cromatografia de afinidade de metal imobilizado (IMAC).

Expressão e purificação de Fab 104

O vetor de expressão do fragmento Fab 104 foi transformado na cepa de produção RV308 de *E. coli*. As células foram inoculadas em 25 ml de meio TB (extrato de levedura 12 g/l, peptona de soja 24 g/l, KH_2PO_4 2,31 g/l, K_2HPO_4 12,54 g/l, glicerol 5 g/l, pH 7,1) com 100 µg/ml de ampicilina e glicose 2% e foram incubadas durante a noite a +37°C em um agitador. A partir da cultura de uma noite um inóculo de 6 ml foi adicionado em dois frascos Erlenmeyer contendo 300 ml de TB com 100 µg/ml de ampicilina. As células foram incubadas a +37°C em um

agitador até atingir OD₆₀₀ de 4 após o que 0,3 ml de IPTG 1M e 100 µg/ml de ampicilina foram adicionados à cultura e a incubação foi mantida pela noite a +37°C em um agitador. O sobrenadante do meio de cultura foi utilizado para a purificação do fragmento Fab 104. As células foram centrifugadas a 4000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi derramado em um frasco limpo. O sobrenadante foi tratado com 2 mg/ml de DNaseI para remover o DNA cromossômico residual por uma hora a +37°C. Uma vez que o Fab 104 apresenta um 6xHis-tag em seu terminal C, pode ser purificado por cromatografia por afinidade de metal imobilizado (IMAC). O Fab 104 foi purificado por sefarose quelante de Ni²⁺ (Amersham Pharmacia Biotech). A pureza do Fab 104 foi verificada com SDS-PAGE.

15

Exemplo 3

Um imunoenensaio de transferência de energia de ressonância fluorescente resolvida no tempo homogênea (TR-FRAT) para THC

O fragmento Fab T3 anti-THC foi rotulado com európio com o kit de quelato LANCE Eu-W1024 ITC (Wallac). O tampão do T3 rotulado foi trocado para Tris 50 mM, pH 7,8, 0,9% de NaCl. O anti-T3 + THC complexo imune fragmento Fab 104 foi rotulado com Alexa Fluor 647 pelo kit de rotulagem de proteína Alexa Fluor (Molecular Probes, Inc.).

Foram adicionados 1 µg de anti-THC T3 Fab rotulado com Eu e 1,5 µg de anti-complexo imune Fab 104 rotulado com Alexa Fluor 647 a poços de micro-título em 60 µl de saliva. 40 µl de amostras de saliva contaminadas com 0, 3,75, 7,5, 15, 30, 60 e 120 ng/ml das seguintes drogas: D9-THC, 11-OH-D9-THC, 11-nor-D9-THC-COOH, heroína e anfetamina foram adicionadas aos poços. Após breve mistura, transferência de energia de ressonância fluorescente resolvida no tempo

(TR-FRET) foi medida pelo fluorômetro Victor V (Perkin Elmer Wallac). Os resultados são mostrados na Figura 3.

A amostra de saliva contaminada com THC produziu um alto valor de fluorescência, enquanto que os metabólitos de
5 THC produziram valores de fluorescência significativamente mais baixos, e a heroína e morfina produziram valores de fluorescência próximos à fluorescência de fundo detectada a partir do controle (T3 e fragmento 104 rotulados sem qualquer droga adicionada). O Fab 104 liga o complexo
10 imune formado entre T3 e THC com especificidade e sensibilidade extremamente altas. O teste é capaz de detectar THC muito abaixo do nível de corte (20 ng/ml de saliva) dos testes atualmente no mercado.

Embora uma estratégia para prover reagentes e ensaios
15 da invenção tenha sido descrita, numerosas variações e modificações se tornarão evidentes para um especialista no assunto.

REIVINDICAÇÕES

1. Fragmento de anticorpo que reconhece especificamente um complexo imune entre o
5 tetraidrocannabinol (THC) e anti-THC **caracterizado** por compreender as regiões determinantes da complementariedade (CDRs) de uma cadeia leve e uma cadeia pesada de anticorpo, em que as ditas regiões de cadeia leve apresentam as sequências de aminoácidos 23-35, 51-57 e 93-100 da SEQ ID
10 NO.: 3, e as ditas regiões de cadeia pesada apresentam as sequências de aminoácidos 29-35, 50-60 e 99-109 da SEQ ID NO.: 4.

2. Fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por compreender os
15 aminoácidos 1-111 da SEQ ID NO.: 3 e os aminoácidos 1-120 da SEQ ID NO.: 4.

3. Fragmento de anticorpo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** por compreender as sequências de aminoácidos das SEQ ID NO.: 3 e SEQ ID NO.:
20 4.

4. Kit de teste **caracterizado** por compreender o fragmento de anticorpo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 e outro fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao THC e compreendendo as
25 sequências de aminoácido de SEQ ID NO.: 1 e SEQ ID NO.: 2.

5. Kit de teste, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** por compreender reagentes para um imunoenensaio homogêneo não competitivo.

6. Kit de teste, de acordo com a reivindicação 5,
30 **caracterizado** por compreender reagentes para transferência de energia de ressonância fluorescente resolvida no tempo (TR-FRET).

7. Kit de teste, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, **caracterizado** por compreender reagentes para avaliar múltiplas drogas viciantes.

8. Uso do fragmento de anticorpo conforme definido em
5 qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em conjunto com um anticorpo que se liga especificamente a THC e compreende as sequencias de aminoácido de SEQ ID NO.: 1 e SEQ ID NO.:2, o uso **caracterizado** por ser para detectar THC em uma amostra de fluido corporal tirada de uma pessoa a ser testada por
10 ter utilizado cannabis.

9. Imunoensaio para detectar um analito em uma amostra de fluido corporal tirada de uma pessoa, em que a amostra é reagida com um par reagente compreendendo um primeiro fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao
15 analito, e um segundo fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao complexo do analito com o primeiro fragmento de anticorpo, e determinando a ligação do segundo fragmento de anticorpo ao dito complexo, indicando a presença do analito na amostra, o imunoensaio
20 **caracterizado** pelo dito analito ser THC, e o dito primeiro fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao THC compreender as sequencias de aminoácido de SEQ ID NO.: 1 e SEQ ID NO.:2 e o dito segundo fragmento de anticorpo compreender as regiões determinantes da complementariedade
25 (CDRs) de uma cadeia leve e uma cadeia pesada de anticorpo, em que as ditas regiões de cadeia leve apresentam as sequências de aminoácidos 23-35, 51-57 e 93-100 da SEQ ID NO.: 3, e as ditas regiões de cadeia pesada apresentam as sequências de aminoácidos 29-35, 50-60 e 99-109 da SEQ ID
30 NO.: 4.

10. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** por ser um imunoensaio homogêneo não competitivo, preferivelmente TR-FRET.

11. Imunoensaio, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 e 10, **caracterizado** pela amostra a ser analisada ser selecionada do grupo consistindo em sangue, urina e fluido oral.

5 12. Imunoensaio, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo THC ser determinado a partir de saliva.

Anti-THC T3 Fab

Cadeia leve de anti-THC T3 Fab

DVLTQSPPTMAASPGEKITTCSASSISSNYLHWYQQKPG
FSPKLLIYRTSNL~~ASGV~~PARFSGSGGTSYSLTIGT
MEAEADVATYYCQQGSSIP~~LIFGAGTKLEL~~KRADAAPT~~VSI~~
FPPSSEQLTSGGASVCF~~LNNFY~~PKDINVKWKIDG~~SERQN~~
GVLNSWTDQDSKDY~~SMSS~~TLTKDEYERHNSYTCEAT
HKTSTSPIVKSFNRNEC

anti-THC T3 Fab VH-CH1

AEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFN~~NYMV~~
WLRQTPEKRL~~EWASIS~~RRGGSTYY~~PDSV~~KGRF
TISRDNARNILNQ~~MSSL~~RSEDTAMY~~YCV~~RGI~~IVAG~~
DVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTN
SMVTLGCLVKGYFPEPV~~VTWN~~SGSLSSG~~VHT~~FP~~AV~~
LQSDLYTLSSSVTP~~SS~~TP~~SETV~~T~~CNVA~~HPASS
TKVDK~~KIV~~PRDCG

CDR1

CDR2

CDR3

Fig. 1

DESENHOS

Complexo imune Anti-T3+THC Fab 104

cadeia leve de Fab 104:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNY
VQWYQQRPGSAPTVIYEDNQRPSPGVDRFS
GSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYQCQSYDSS
NQVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSSEEL
QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA
GVEITTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHK
SYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

Fab 104 Fab VH-CH1-6His-Tag

QVQLVQSGTEVKKPGATVKISCKFSGDNFIDYYMHWV
KQAQGGKLEWLVDLGDGQTYYAEKFGHGRGTTADS
SRDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAAKAYRQGVMDVW
GGGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SWTVPPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKAEPKSC
HHHHH

CDR1
CDR2
CDR3

Fig. 2

Reatividade cruzada de THC-TR-FRET

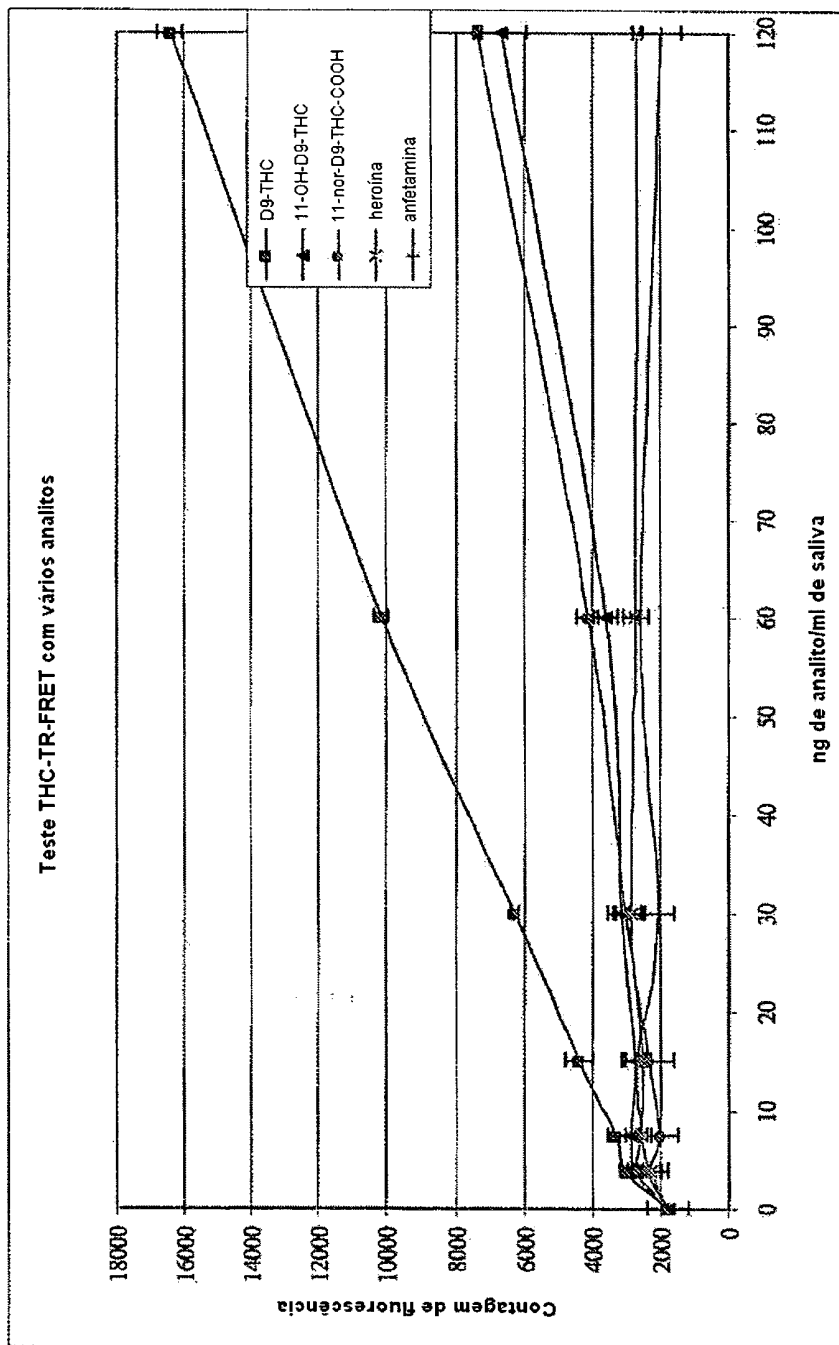


Fig. 3