

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 86 643

REQUERENTE: DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION, norte-americana, com sede em Califórnia, Estados Unidos da América, e NIPPON DPC, norte-americana, com sede em 5700 West 96th Street, Los Angeles, Califórnia 90045, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: "MÉTODO DE MEDIDA DE ANTICORPOS ANTI-DNA".

INVENTORES: Masahide Kawamura

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Japão em 30 de Janeiro de 1987, sob o nº 19970/87.

S. G. (27.3)

[Handwritten signature]

MEMÓRIA DESCRIPTIVA

Resumo

O presente invento diz respeito ao método e equipamento ("Kit") de ensaio para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos por um método imunológico usando uma marca de dsDNA sem fragmentos de ssDNA contaminantes, caracterizado por a marca de dsDNA ser preparada por técnicas de DNA recombinante e possuir um

=====

DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION
"METODO DE MEDIDA DE ANTICORPOS ANTI-DNA"

tamanho constante de kpb bem definidas e uma determinada actividade específica e por tal dsDNA marcado ser usado como traçador no referido método imunológico.

Os soros de pacientes que sofrem de lupus eritematoso sistémico (SLE) contêm auto-anticorpos que podem reagir com uma variedade de componentes nucleares incluindo ácidos nucleicos, proteínas nucleares e várias combinações de DNA de cadeia dupla(dsDNA) e de DNA de cadeia simples (ssDNA). Alguns reagem com bases ou nucleotídeos individuais, com guanina e com sequências oligo(dt) e mesmo com polinucleotídeos sintéticos. Schwartz, R.S. e Stollar, D.J. Clin. Invest. 75:321(1985). Isenberg, D.A., Madaio, M.P., Reichlin, M., Schoenfeld, Y., Ranch, J., Stollar, D. e Schwartz, R.S., Lancet, 25 de Agosto 1984. Ainda, estes auto-anticorpos reagem com抗igenios do tipo lípido complexo como sejam cardiolipina e outros fosfolípidos das membranas de plaquetas, antipoli (ADP-ribosse), histonas e com proteoglicanos; nomeadamente, ácido briurónico e sulfato de condroitina. No entanto, a reacção de anticorpos com dsDNA ou DNA nativo (nDNA) é a principal marca serológica desta doença e a capacidade para medir dsDNA mostrou-se particularmente útil no diagnóstico e controlo da actividade da doença.

Têm sido idealizados muitos métodos de ensaio para detectar e semi-quantificar dsDNA em pacientes com SLE. Estes métodos usados para identificar estes auto-anticorpos têm incluído difusão em gel, Seligmann, M., C.R. Acad. Sci. (Paris), 245:243 (1957); fixação do complemento; Robbins, W.C., Holman, H.R., Deicher, H. e Kunkel, H.G., Proc. Soc. Exp. Biol. (NY), 96:575 (1957); anafilaxia cutânea passiva; Deicher, H.R.G., Holmann, H.R., Kunkel, H.G. e Ovarg, Z., J. Immunol. 84:106 (1960); aglutinação com bentonite, Bozicavich, J., Nason, J.P. e Kayhoe, D.E., Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 103:636 (1960); hemaglutinação; Jokinen, E.J. e Julkunen, H., Ann. Rlseum. Dis. 24:477 (1965); radioelectroforese; Bickel, Y.B., Barnett, E.V. e Pearson C. M. Clin. Exp. Immunol. 3:641 (1968); radioensaços usando ^3H ou ^{125}I ; Wold, R.T., Yonng, F.E., Tan, E.M. e Farr, R.S. Science 161:806 (1968); e imunoensaços com

enzimas; Rubin, R.L. Joslin, F.G. e Tan, E.M. J. Immunol. Methods 63:359 (1983). A maior parte, senão todos, os métodos atrás referidos carecem de especificidade e de sensibilidade. Em muitos casos são relatados falsos positivos devido à falta de especificidade diagnóstico que não permite diferenciar SLE de outras doenças do tecido conjuntivo.

Verificou-se que os radioensaios e imunoensaios com enzimas têm dado uma correlação aceitável com o grau e gravidade dos estados de SLE. No entanto, estes métodos imunológicos isam todos preparações marcadas de nDNA derivado do timo de vitela que está altamente polimerizado com fragmentos de DNA de peso molecular elevado e comprimento variável, em média cerca de 20 quilopares de bases. Estas preparações contêm igualmente quantidades variáveis de ssDNA.

Estas moléculas de DNA de 20 kpb muitas vezes ligam-se inespecificamente a proteínas circulantes do plasma, enquanto que o ssDNA contaminante nestas preparações se liga ao C₃q do complemento.

Assim, estes métodos imunológicos convencionais para medição de anticorpos contra dsDNA (nDNA) geralmente requerem pré-tratamento da amostra de soro ou de plasma a 56C durante 30 minutos para inactivar o C₃q do complemento antes da reacção imunológica entre o DNA traçador e os anticorpos anti-DNA circulantes.

Nas condições ideais, preferencialmente uma molécula de IgG circulante anti-DNA liga-se apenas a uma ou a duas moléculas de dsDNA marcado de um dado comprimento e sem contaminantes, particularmente ssDNA.

Com esta finalidade foram projectadas técnicas in vivo para preparar dsDNA marcado (especialmente marcado com ¹²⁵I) através da introdução de ¹²⁵I-

-desoxicitidina em células HeLa. No entanto, estes métodos de marcação in vivo não produzem dsDNA marcado com um grau de pureza elevado devido aos contaminantes de ssDNA normalmente encontrados em tais preparações como sub-produtos.

De acordo com este invento, os anticorpos circulantes anti-DNA presentes em fluidos biológicos são medidos, por exemplo, por radioensaio usando um traçador bem definido de ^{125}I -ds DNA com um determinado número de quilopares de bases, preparado por técnicas de DNA-recombinante e sem quaisquer contaminantes de ssDNA. O plasmídeo para a preparação in vitro de tal traçador, parâmetros de ensaios e o "kit" para medição dos anticorpos anti-DNA são aqui descritos seguidamente.

Sumário do invento

Resumidamente o presente invento comprehende um método para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos por um método imunológico usando uma marca de dsDNA sem fragmentos de ssDNA, em que a marca de dsDNA é preparada por técnicas de DNA recombinante, tendo um comprimento constante de kpb bem definidas e uma determinada actividade específica, e tal do DNA marcado sendo usado como traçador no referido método imunológico.

O invento também comprehende um "kit" de ensaios para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos por um método imunológico usando uma marca de dsDNA sem fragmentos de ssDNA, em que a marca de dsDNA é preparada por técnicas de DNA recombinante, tendo um comprimento constante de kpb bem definidas e uma determinada actividade específica, e tal dsDNA marcado sendo usado como traçador no referido método imunológico.

Constitui um objectivo do presente invento ultrapassar as desvantagens referidas atrás nos métodos imunológicos e em particular radioensaios com dsDNA marcado em ^{125}I e outros ensaios com dsDNA marcado.

Em geral, constitui um objectivo deste invento, proporcionar um novo método para medição de títulos anti-DNA em fluidos biológicos.

É também um objectivo geral deste invento proporcionar um novo "kit" de ensaio para efectuar as medições em fluidos biológicos previamente discutidos.

Estes e outros objectivos e vantagens deste invento serão aparentes a partir da discussão mais detalhada que se segue, acompanhada dos desenhos juntos.

Descrição detalhada do invento

O objectivo do presente invento é projectar uma molécula de dsDNA de pares de bases bem definidos, com um determinado comprimento e de modo a que tal preparação não tenha ssDNA contaminante. Tal preparação quando marcada com uma sonda produtora de um sinal (iodo 125, marca enzimática, marca fluorescente ou marca quimiluminescente ou bioluminescente) terá uma actividade específica bem definida, será estável e ligar-se-á especificamente a anticorpos circulantes anti-DNA em soro ou plasma SLE.

Para se conseguir tal objectivo construiu-se um DNA de plasmídeo que foi preparado a partir de Escherichia coli sem conter ssDNA. Este plasmídeo foi cortado com uma enzima de restrição adequada para produzir dsDNA de um determinado comprimento que não exceda 1,5 kpb a ser usado como material traçador. O presente plasmídeo usado no presente invento divulgado é preparado a partir de E.coli sendo no entanto possível usar qualquer outro organismos adequados contendo plasmideos, tais como Bacillus subtilis, Pseudomonas putida e Saccharomyces cerevisiae. Outros organismos contendo plasmideos serão obvios para os familiarizados com a matéria. Ainda, dsDNA obtido por sintese química pode também ser usado para atingir os objectivos do presente invento.

Este invento será descrito detalhadamente com referência aos exemplos que se seguem os quais são apresentados apenas com fins ilustrativos.

Exemplo 1

Preparação de DNA de plasmídeo, pNDPC 1

A Figura 1 mostra um mapa de enzimas de restrição do DNA de plasmídeo, pNDPC 1 que é usado nos exemplos deste invento.

O plasmídeo pNDPC 1 foi construído como se segue: pUC18 (Yarnisch-Perron, C. et.al, Gene 33:103(1985) foi parcialmente digerido com Cfr I ou Ban I e depois autoligado por DNA ligase de T4 como se mostra na Figura 1. As marcas selectivas foram Ap e lac. pNDPC com 2431 pares de bases foi inserido em E.coli K12 JM 109 por processos convencionais e a bactéria cultivada num meio LB (1% de triptona, 0,5% de extracto de levedura, 2,5% NaCl). O plasmídeo foi então purificado por processos regulares.

O pNDPC1 foi então cortado com a enzima de restrição Cfr I ou Bam I numa solução aquosa contendo tampão 10mM Tris-HCl pH8,5 e contendo 7mM MgCl₂, 20mM NaCl e 7mM 2-mercaptoetanol. O dsDNA obtido usando Cfr I continha fragmentos de 0,9 e 1,4 kpb enquanto que o dsDNA obtido usando Ban I continha fragmentos de 1,1 e 1,2 kpb.

Exemplo 2

Iodinação do dsDNA do Exemplo 1

Os métodos de iodinação in vitro para marcação de moléculas de DNA recombinante incluem "nick-translation", polinucleotídeo cinase, DNA polimerase fragmento grande (enzima klenow), DNA polimerase de T4 e desoxi-transferase terminal (TdT).

O método de "nick-translation" dá a actividade específica mais elevada mas algum do dsDNA marcado parece dar origem a ssDNA e portanto é inadequado para os presentes fins. Por outro lado, os métodos de iodinação usando polinucleotídeo cinase, enzima klenow, DNA polimerase de T4 ou TdT em que os terminais do DNA são marcados, produzem traçadores de actividade moderada comparado com o método de "nick-translation", mas não originam fragmentos de ssDNA. Estes métodos de iodinação ou marcação são portanto os preferidos para este invento mas não devem ser considerados restrictivos. Outros métodos de marcação serão obvios para os familiarizados com a matéria.

O dsDNA (1,1-1,2 kpb) obtido no Exemplo 1, supra, foi dissolvido numa solução aquosa contendo tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,2 e contendo $MgSO_4$, 1 mM ditiotreitol, 500 ug/ml de albumina de soro bovina. Adicionou-se dGTP, dATP e dTTP, 1mM de cada e 1 mCi de ^{125}I -dCTP e 25 unidades de DNA polimerase de T4, fragmento grande (enzima Kelenow) e deixou-se decorrer a reacção, à temperatura ambiente durante 30 minutos.

O DNA iodinado foi ainda purificado por precipitação em 3,1 ml de acetato de sódio 3M pH 5,2 em etanol a 99,5 (0,1:3) a 80°C durante 30 minutos, depois centrifugado a 15.000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e dissolveu-se o precipitado em 1 ml de tampão 10 mM Tris, 1mM EDTA e 10 mM NaCl pH 7,5, tornou-se a precipitar com acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol a 99,5% como atrás. Rejeitou-se novamente o sobrenadante e lavou-se o precipitado com etanol a 70% e secou-se.

O DNA iodinado foi ressuspenso em solução aquosa de borato de sódio 50 mM, 15 mM EDTA e 0,01% de azida de sódio de modo a ter-se uma concentração final de 0,1 μ li/ml. A solução resultante foi usada como traçadora com uma actividade específica de 0,3 μ li/pmole.

Exemplo 3

Processo para testar anticorpos circulantes anti-DNA

Tendo preparado uma marca bem definida de ^{125}I -ds DNA com determinados kpb e actividade específica, capaz de se ligar especificamente a imunoglobulinas circulantes anti-DNA possuímos a base de um método para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em amostras de soro.

O método de radioensaio que se segue é a execução preferida do presente invento mas não é no entanto, restrictivo:

Prepararam-se calibradores anti-DNA a partir de um soro de um paciente que sofria de SLE e diluiram-se seriadamente em soro humano sem anticorpos anti-DNA. Os calibradores foram referenciados relativamente a um outro radioensaio produzido pela Amersham Corporation, Amersham England. Os calibradores foram expressos arbitrariamente em unidades/ml (u/ml).

O dsDNA marcado com ^{125}I foi diluido como se mostrou atrás para dar 75000 cpm por 200 μl de volume.

25 μl de cada calibrador e a amostra foram pipetados para tubos de ensaio de 12 x 75 mm aos quais se adicionou 200 μl de ^{125}I -ds DNA. Após incubação durante 2 horas a 37°C, adicionou-se 1,0 ml de solução a 50% de sulfato de amónio aquoso para separar o traçador ligado à imunoglobulina do traçador livre não ligado. Após centrifugação a 2000 x g durante 15 minutos a fracção ligada foi separada da fracção livre por decantação dos tubos. Con-

tou-se o precipitado e leram-se as concentrações das amostras dos pacientes, relativamente à curva de calibração onde as contagens ligadas presentes na amostra do paciente são directamente proporcionais às unidades de actividade dos títulos anti-DNA

Exemplo 4

Efeito de Csq do complemento

Testaram-se dez amostras normais pelo método deste invento antes e depois do tratamento pelo calor a 56°C durante 30 minutos para inactivar o complemento, C₃q, usando dois traçadores. O traçador 1 foi o ¹²⁵I-ds DNA do Exemplo 2, supra, e é a execução preferida deste invento. O traçador 2 foi um ¹²⁵I-ss DNA preparado como se segue: o ds DNA recombinante (1,1 a 1,2 kpb) concentrado do Exemplo 1, supra, foi aquecido a 95°C durante um minuto, arrefecido em gelo e deixado reagir à temperatura ambiente antes da iodinação, com ¹²⁵I como descrito no Exemplo 2, supra. O DNA resultante de cadeia simples e iodinado (¹²⁵I-ss DNA) foi então diluído no tampão traçador e usado no ensaio.

O resultado desta experiência está resumido abaixo:

Traçador: 1. ^{125}I -dsDNA 2. ^{125}I -ssDNA

B/T

Média \pm SD

Amostras (N=10)

Não tratado $4,5 \pm 0,3$ $36,7 \pm 2,2$

Tratado, 56C 30 min $4,4 \pm 0,3$ $21,2 \pm 6,7$

Os resultados mostram claramente que o traçador de DNA de cadeia dupla, traçador 1, ^{125}I -dsDNA, não é afectado pela presença do complemento no soro de pacientes. Por outro lado, o traçador DNA de cadeia simples, traçador 2, ^{125}I -ssDNA é bastante afectado.

Todos os 9 individuos normais testados tinham resultados anti-DNA abaixo de 6U/ml, conforme medido pelo método deste invento, enquanto todos, excepto um, os 28 pacientes com SLE activo (96,4%) tinham resultados de 20 U/ml ou superiores. O paciente excepção com SLE activo tinha um nível anti-DNA de 5,7 U/ml. Em adição, 30 dos 48 pacientes com SLE inactivo (62,5%) tinham resultados acima de 6U/ml.

Dos 46 pacientes com perturbações do tecido conjuntivo que não SLE, apenas dois (4,4%) tinham níveis anti-DNA acima de 6U/ml.

Um nível de decisão estabelecido aproximadamente no limite superior do normal tornaria assim máxima a sensibilidade para SLE activo nesta população minimizando ao mesmo tempo o número de resultados positivos em pacientes com perturbações diferentes de SLE.

Tendo descrito totalmente o invento pretende-se que ele seja limitado apenas pelo âmbito legal das reivindicações apensas.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1a. - Método e equipamento ("kit") de ensaio para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos por um método imunológico usando uma marca de dsDNA sem fragmentos de ssDNA contaminantes, caracterizado por a marca de dsDNA ser preparada por técnicas de DNA recombinante e possuir um tamanho constante de kpb bem definidas e uma determinada actividade específica e por tal dsDNA marcado ser usado como traçador no referido método imunológico.

2a. - Método para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o referido dsDNA marcado ter um comprimento constante de 1,1 a 1,2 kpb mas que pode variar entre cerca de 0,2 e 3,0 kpb.

3a. - Método para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o referido dsDNA marcado ser marcado apenas nos seus terminais usando uma enzima tal como DNA polimerase fragmento grande (enzima klenow), polinucleotídeo cinase, DNA polimerase de T4 ou desoxittransferase terminal.

4a. - Método para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por o referido dsDNA ser marcado com uma substancia radioactiva, uma enzima, uma substancia fluorescente, uma substancia quimioluminescente ou bioluminescente.

5a. - "kit" de ensaio para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos por um método imunológico usando marca de dsDNA sem fragmentos de ssDNA contaminantes, caracterizado por a marca de dsDNA ser preparada por técnicas de DNA recombinantes e possuir um comprimento constante de kpb bem definidas e uma determinada actividade específica e por tal dsDNA marcado ser usado como traçador no referido método imunológico.

6a. - "kit" de ensaio para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por o referido dsDNA marcado ter um comprimento constante de 1,1 a 1,2 kpb mas podendo variar entre cerca de 0,2 e 3,0 kpb.

7a. - "kit" de ensaio para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a referida marca de dsDNA ser marcada apenas nos seus terminais usando uma enzima tal como fragmentos grandes da DNA polimerase (enzima klenow), polinucleotideo cinase, DNA-polimerase de T4 ou desoxittransferase terminal.

8a. - "kit" de ensaio para medição de títulos de anticorpos anti-DNA em fluidos biológicos de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por a marca ser uma substancia radioactiva, uma enzima, uma substancia fluorescente, uma substancia quimioluminescente ou bioluminescente.

Lisboa, 28 de Janeiro de 1988

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.^o
1200 LISBOA

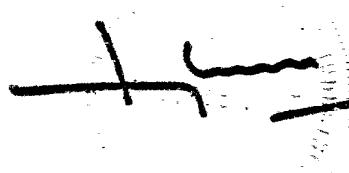


Figura 1

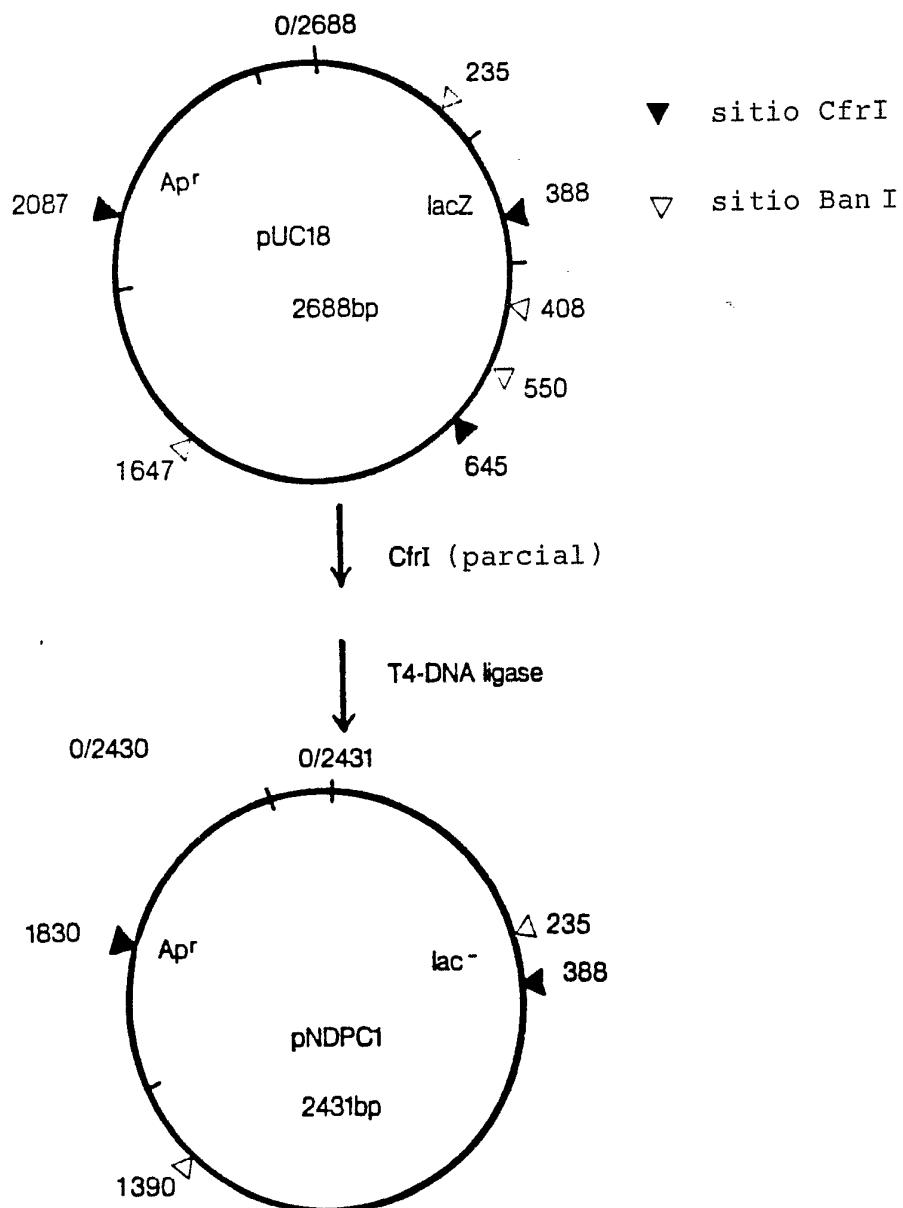
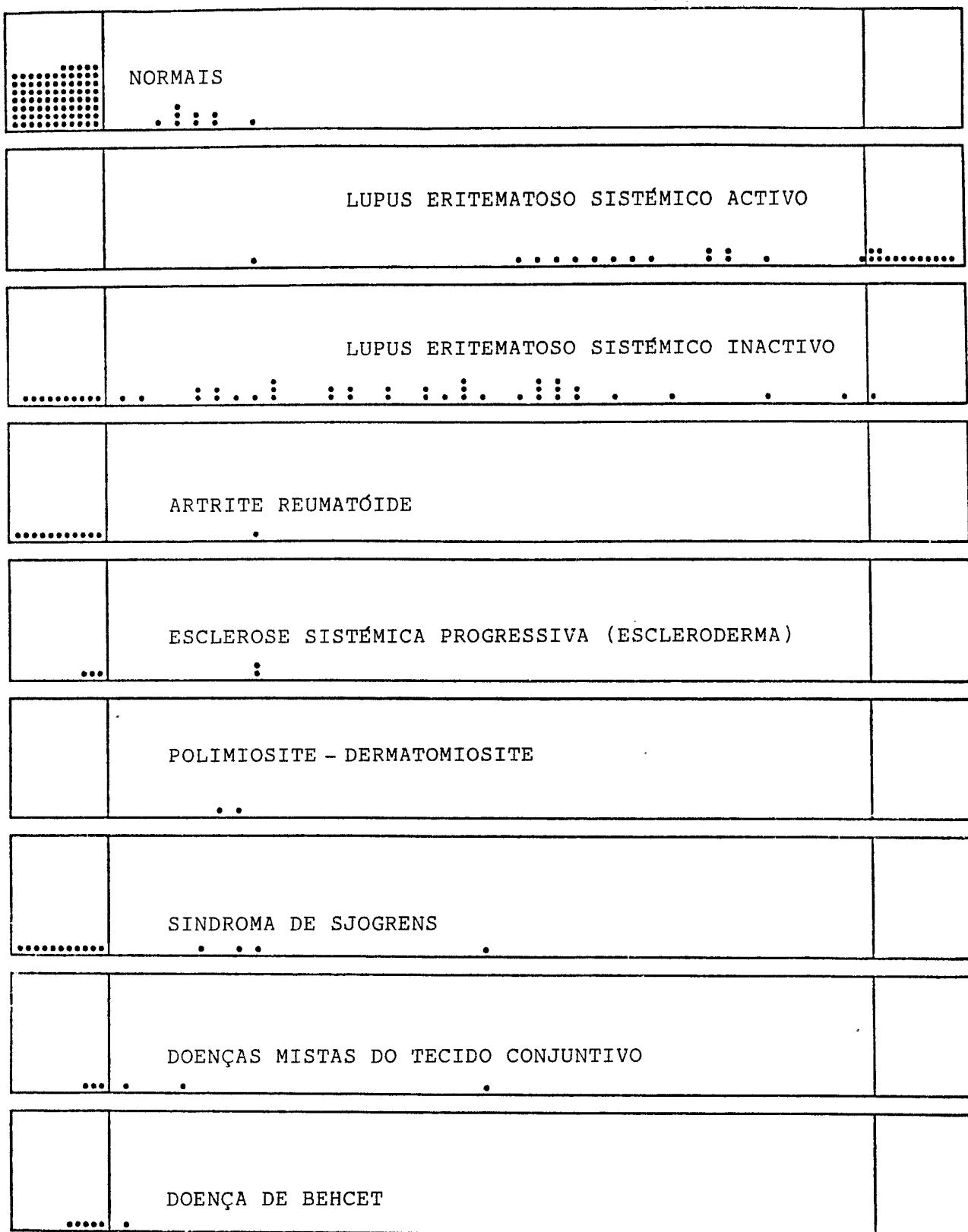


Figura 2

Combigen Anti-DNA



Abaixo 3 5 10 20 40 100 Acima
3 5 10 20 40 100