



19

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério da Indústria e do Comércio
Instituto Nacional da Propriedade Industrial



<p>(12) PEDIDO DE PRIVILÉGIO</p> <p>(30) Prioridade unionista:</p>	<p>A</p> <p>(11) (21) Número: PI 8603630 31.07.86</p> <p>(22) Data do depósito:</p> <p>(51) Int. Cl. 4 A 61 K 39/005 C 07 K 15/04</p>
<p>(43) Data da publicação do pedido: (RPI) 15.03.88 (RPI 908)</p> <p>(46) Data da Publicação das reivindicações</p>	<p>(54) Título: <i>Processo de purificação das gli-coproteínas GP57, GP51, e GP25 de formas epimastigotas de trypanosoma cruzi.</i></p>
<p>(71) Depositante: <i>Universidade Federal do Rio de Janeiro. (BR/RJ).</i></p> <p>(72) Inventor(es): <i>Julio Scharfstein e Lucia Mendonça Previato.</i></p> <p>(74) Procurador: <i>Monsen, Leonards & Cia. Rua Teófilo Otton, 63-10º andar-RJ.</i></p> <p>(23) Complementação da Garantia de Prioridade Data:</p>	<p>(80) Pedido Depositado via PCT - Referências:</p> <p>(85) Data do início da fase nacional:</p> <p>(86) Pedido internacional:</p> <p>(87) Publicação internacional:</p> <p>(81) Países designados:</p> <p>(82) Países eleitos:</p> <p>Comunicado pela RPI nº de</p> <p>(62) Desdobramento (origem) No Data:</p>
<p>(67) Resumo:</p>	

Relatório Descritivo da Patente de Invenção
"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DAS GLICOPROTEÍNAS GP57, GP51,
E GP25 DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE TRYPANOSOMA CRUZI".

A presente invenção refere-se a processo de
5 obtenção de antígenos de valor diagnóstico para a Doença
de Chagas.

A aplicação de testes sorológicos específicos
para a detecção de doadores de sangue infectados pelo
protozoário Trypanosoma cruzi é reconhecidamente uma
10 prioridade para a Saúde Pública, nos países afetados pela
Tripanosomiase Americana (Doença de Chagas). O problema
alcança gravidade nas grandes cidades, como consequência
do intenso fluxo de migrantes, provenientes de áreas
endêmicas, para o perímetro urbano. Sobre isso, se
15 sobrepõe a doação de sangue remunerada, que opera como
fator selecionador de indivíduos de baixa renda, entre os
quais inevitavelmente estão incluídos os migrantes.

A natureza assintomática da forma crônica da Doença de
Chagas (maioria dos casos) dificulta o diagnóstico, que
20 depende sobretudo de métodos sorológicos. A inespecifici-
dade dos testes convencionais, a dificuldade de padroniza-
ção de certos ensaios, são fatores que limitam a sua

aplicação em larga escala. Essas limitações poderão ser efetivamente solucionadas com a utilização de antígenos bioquimicamente definidos, tal como proposto para a glico proteína GP25, ou produtos estruturalmente relacionados

5 com esta. O processo de isolamento e purificação destas moléculas faz parte do pedido de patente PI 8304073, data do de 29-07-1983, em nome da Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Engenharia da UFRJ (COPPE). Estudos sub

seqüentemente realizados em nosso laboratório ("Trypano-
10 soma cruzi: characterization and isolation of a 57/51000
molecular weight glycoprotein expressed by epimastigotes
and bloodstream Trypomastigotes", de autoria de J.

Scharfstein, M. Schechter, M. Senna, J. M. Peralta,
L. Mendonça-Previato, e M. A. Miles, J. Immunol., no pre-

15 lo) indicam que as formas moleculares GP57 e GP51 correspondem a produtos antigenicamente relacionados com GP25.

Em face disto, a elaboração de testes diagnósticos com GP57 ou GP51 torna-se factível, constituindo-se em alternativa para GP25, conforme proposto no pedido de patente

20 já referido. Para este fim, foi desenvolvido um novo método de purificação para o antígeno, baseado na aplicação de cromatografia líquida de rápido desempenho (FPLC, Fast Performance Liquid Chromatography).

Processo de Isolamento e Purificação

25 O cultivo de células foi feito de acordo com o método já descrito. O processo descrito nesse pedido se aplica a qualquer extrato de T.Cruzi, e independe das con-

78600630

dições de cultivo adotadas. As células são colhidas e lavadas por centrifugação com salina fosfatada, e submetidas em seguida a vários ciclos de congelamento/descongelamento em meio aquoso, tamponado ou não, suplementado com 5 uma mistura de inibidores de proteases (PMSF, TPCK, TLCK, Leupeptin, Anti-pain, Pepstatin, Iodo Acetamida). As células rompidas são removidas por centrifugação. O sobrenadante recolhido é congelado à -20°C, ou imediatamente processado como descrito a seguir. Este sobrenadante (ou 10 frações deste obtidas após precipitação com soluções ácidas leves, ou com polietilenoglicol, ou com sulfato de amônia saturado) são submetidos a gel filtração em colunas SUPEROSE 12 TM (ou resina de filtração com propriedades similares) para corridas de rápido desempenho. Para 15 cromatografias lentas, resinas convencionais do tipo Sephacryl S-200, Sephacryl S-300, Sephadex G100 ou G200, Sepharose 4B, 6B, ou Bio-Gel P10-P300 podem ser utilizadas. As frações eluídas com volume efluente aproximadamente igual ao da albumina bovina (PM 68000), no caso de 20 GP57 e GP51, ou com volume efluente próximo ao estabelecido para cadeia leve de Ig (PM 25000), no caso de GP25, são selecionadas, acumuladas, e dialisadas contra o tampão Tris 20 mM, pH 7,7, ou tampão de força iônica equivalente. Essas preparações são em seguida aplicadas a resina 25 Mono Q (ou resina de troca iônica com propriedades similares, tais como: DEAE-Sephadex, DEAE-Sephacel, DEAE-Celulose) para troca iônica de alto desempenho. As proteí-

28600630

nas são eluidas com um gradiente de NaCl, de 0 à 1 M, tamponado com Tris 20 mM, pH 7,7. Os picos de proteína eluidos com 0,25-0,35 M NaCl contêm Gp57 e/ou Gp51, em alta proporção. O processo acima descrito pode ser realizado, alternativamente, através do processamento do extrato bruto em resinas de troca iônica como acima descrito. As frações eluidas com gradiente de NaCl (faixa de 0,25-0,4 M) são recolhidas, concentradas, e fracionadas em coluna superose 12 M ou produto similar, como descrito na primeira etapa do procedimento anterior. O procedimento acima, quando realizado com extratos aquosos obtidos sem a adição de inibidores de protease, propicia o isolamento de GP25.

A presença de contaminantes minoritários nas preparações de GP57/51 pode ser eliminada submetendo-se a preparação à uma coluna de afinidade utilizando na matriz sólida lectinas específicas para as unidades D-manose e D-galactose, ou ainda anticorpos policlonais ou mesmo monoclonais anti-GP25. Os抗ígenos GP25, GP57, e/ou GP51 podem ser especificamente eluidos destas colunas com açúcares (caso das lectinas), soluções ácidas, ou agentes caotrópicos (para eluição de coluna de afinidade com anticorpos anti-GP25). A preparação obtida através dos métodos acima referidos pode ser aplicada no desenvolvimento de testes sorológicos usando técnicas de aglutinação, ensaios imunoenzimáticos, ou radioisométricos.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de purificação das glicoproteínas GP57, GP51 e GP25 de formas epimastigotas de *Trypanosoma Cruzi*, caracterizado pelo fato de compreender as etapas 5 de:
- a) crescer amostras Y de formas epimastigotas de *Trypanosoma Cruzi* em qualquer meio axênico apropriado;
 - b) centrifugar as células, lavar com uma solução de salina fosfatada, e congelar as mesmas a -20°C;
 - 10 c) descongelar as células rapidamente em meio aquoso tamponado na presença de inibidores de enzimas proteolíticas e submete-las a vários ciclos de congelamento e descongelamento;
 - d) remover os agregados celulares por centrifugação, recolher a fração solúvel, e congelar a solução a -20°C;
 - 15 e) fracionar o extrato obtido na etapa d em coluna de gel-filtração, as frações eluidas com volume efluente aproximadamente igual ao da albumina bovina (PM 68000), 20 no caso de GP57 e GP51, ou com volume efluente próximo ao estabelecido para cadeia leve de Ig (PM 25000), no caso de GP25, sendo selecionadas e dialisadas contra tampão de

226.026.30

equilíbrio adequado para cromatografia de troca aniónica;

f) cromatografar a preparação obtida como descrito em e em coluna de troca iônica e selecionar as frações contendo GP57 e/ou GP51, ou ainda GP25 purificadas.

5 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas e e f são invertidas de modo que o extrato obtido na etapa d é primeiramente cromotografado em coluna de troca iônica e as frações contendo GP57 e/ou GP51 e/ou GP25 parcialmente purificadas são selecionadas e concentradas.

10 3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as referidas glicoproteínas concentradas são fracionadas em coluna de gel-filtração para obtenção das mesmas em um alto grau de pureza.

15

200.006.30

1

R E S U M O

Patente de Invenção "PROCESSO DE PURIFICAÇÃO
DAS GLICOPROTEÍNAS GP57, GP51, E GP25 DE FORMAS EPIMASTI
GOTAS DE TRYPANOSOMA CRUZI".

5 Utilizando-se as glicoproteínas GP57 E/OU
GP51, E/OU GP25 do trypanosoma cruzi purificadas pelos
métodos descritos, pode-se diagnosticar a infecção chagá-
sica através de teste sorológico no qual o referido anti-
geno é acoplado a matrizes sólidas ou suportes particula-
10 dos de natureza diversa, seguido de incubação com o soro
teste, e revelação da reação por aglutinação direta, ou
por métodos colorimétricos ou radioisotópicos propiciados
pela aplicação de anti-globulina humana conjugada.