



( I O ) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90141 B

(51) *Classificação Internacional: (Ed. 5)*  
G01N033/564 A G01N033/567 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.03.29	(73) <i>Titular(es):</i> HOECHST JAPAN LIMITED 10-16, 8-CHOME, AKASAKA MINATO-KU, TOKYO JP
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.03.30 JP 63/74468	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.10	(72) <i>Inventor(es):</i> TOMOFUMI JITSUKAWA JP
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 01/94 1994.01.03	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ELEMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES

(57) *Resumo:*

[Fig.]

Descrição referente à patente de invenção de HOECHST JAPAN LIMITED, alemã, industrial e comercial, com sede em 10-16, 8-chome, Akasaka, Minato-ku, Tokyo, Japão, (inventor: Tomofumi Jitsukawa residente no Japão), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ELEMENTO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLÉARES"


Descrição

Processo para a preparação de um elemento analítico para a determinação de anticorpos antinucleares.

Antecedentes da Invenção

1. Domínio da invenção

A presente invenção proporciona um método para a preparação de um dispositivo para a determinação de um anticorpo antinuclear e um dispositivo preparado desse modo. Por meio da utilização do dispositivo de acordo com a invenção, é possível determinar fácil e simplesmente com grande rigor um anticorpo antinuclear no sangue ou no fluido do corpo, sendo por conseguinte o dispositivo utilizável para o diagnóstico de doenças autoimunes, particularmente numa primeira selecção. Como a invenção pode proporcionar a análise a baixo custo e com um procedimento simples, a determinação de anticorpo antinuclear que tem sido até aqui realizada apenas em casos especiais torna-se de larga utilização na inspecção geral de saúde; e este facto permite o diagnóstico e o tratamento de



doenças autoimunes nas fases iniciais.

## 2. Técnica anterior

Detecta-se muitas vezes um anticorpo antinuclear em altas concentrações no sangue de pacientes com doenças autoimunes tal como lupus eritematoso sistémico (LES), esclerose sistemática progressiva (ESP), artrite reumatóide (AR), síndrome de Sjogren (SSj), dermatomiosite (DM), polimiosite (PM) e doença do tecido conectivo mista (DTCM).

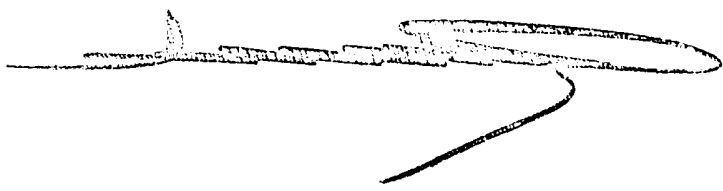
São conhecidos mais de 20 anticorpos antinucleares diferentes contra uma variedade de antígenos presentes no núcleo da célula, tais como o anticorpo anti-ADNdc ou anti-ADNcs, anticorpo anti-histona, anticorpo anti-proteína nuclear não histona, anticorpo anticentrómero, anticorpo anti-U1-RNP e anticorpo anti-Sm. Como é o caso com o anticorpo anti-ADNdc ou anti-ADNcs na presença do qual é baseado o diagnóstico para LES, cada anticorpo antinuclear é conhecido pelo relacionamento com várias doenças autoimunes e a detecção de tal anticorpo é útil para o diagnóstico da doença autoimune.

O método padrão mais corrente para detectar o anticorpo antinuclear é a técnica do anticorpo fluorescente [uma revisão: "Rinsho Kensa" (Ensaio Clínicos), vol. 30, Nº 7, 1986, PP. 684-728\_7. Para além disso são mencionados métodos como imunodifusão, RIA, ELISA e hemaglutinação. Na técnica de anticorpo fluorescente uma fatia de tecido ou células de uma estirpe estabelecida fixada numa lâmina de vidro são usados como material antigénico. A presença ou ausência de anticorpo antinuclear num espécimen tal como sangue são observados usando técnica de microscópio fluorescente para determinar o padrão de coloração e deste modo a natureza do anticorpo antinuclear. A utilização da técnica é largamente aceite no diagnóstico de doenças autoimunes porque a relação entre a coloração padrão de fluorescência e o anticorpo antinuclear tem sido

exaustivamente investigada. O método da fluorescência, contudo, é vantajoso devido ao facto de que o julgamento rigoroso depende muito mais do operador uma vez que a avaliação apenas pode ser feita visualmente, as soluções fluorescentes são bastante instáveis e difíceis de manejar, e a sensibilidade do microscópio de fluorescência e as condições de exame ao microscópio influenciam o julgamento.

Em seguida foi desenvolvido a técnica de ELISA (análise de imunoabsorvência ligada a enzima), pela qual as variações entre indivíduos são mais pequenas, cujas operações são fáceis e simples e que produz resultados quantitativos. A técnica de ELISA para o anticorpo antinuclear está de um modo geral dividida em duas classes. Um dos métodos ELISA usa antígenos purificados separados dos núcleos das células tal como uma variedade de ADN, proteína de histona de ARN e proteína de não histona, purificados e fixados num suporte plástico pelo qual o anticorpo antinuclear pode ser identificado. Uma vez que é incómodo conduzir ELISA para todos os antígenos nucleares, a técnica de ELISA é usada na maioria das vezes para selecção secundária junto com ou independentemente do método da fluorescência.

Principalmente para a selecção primária para rapidamente detectar a presença de uma larga variedade de anticorpos antinucleares desenvolveu-se uma técnica de ELISA na qual um antígeno nuclear extraível (ANE) é fixado sobre um suporte plástico (R. Warlow et al. "Diagnostic Immunology", vol. 2, pp. 154-160, 1984). Nesta técnica utiliza-se um antígeno nuclear de um tecido como o fígado ou de uma estirpe de células solubilizado ou extraído com um ácido. Contudo, a técnica tem falhado muitas vezes na detecção de um anticorpo antinuclear contra um antígeno nuclear que é insolúvel ou não extraível por um ácido. A avaliação de acordo com a técnica não é por conseguinte concordante com a avaliação dada pela técnica padrão do anticorpo fluorescente em alguns casos.



Para além disso, em 1987 um pedido de patente por V.L. Lipp et al. com o título "método e dispositivo para detectar um anticorpo antinuclear" foi exposto ao público (Japanese Patent Laid Open Sho 62-32363) em que o núcleo é suportado num suporte sólido por secagem de modo que o antigene insolúvel é dectetável.

A técnica requer contudo operações complicadas nas quais não somente o núcleo mas também o antigene (SN) e o ANE produzidos pelo tratamento com um surfactante e subsequentemente por ondas ultrasónicas são preparados e os três combinados são suportados num suporte sólido. Usa-se na técnica soro não diluído como material de ensaio o que dá como resultado uma sensibilidade mais baixa. O uso directo de soro não diluído permite também detectar reacções secundárias relacionadas com uma enorme quantidade de anticorpos não específicos que contaminam o material de ensaio. Além do mais, na especificação da publicação acima citada exposta não é dado qualquer exemplo da determinação real para um material de ensaio como o sangue de pacientes com doenças autoimunes. Por conseguinte, um melhoramento adicional é considerado necessário para o uso prático.

#### Resumo da Invenção

Um dos objectivos da presente invenção é proporcionar um método que compreende preparar um dispositivo para ELISA para medir o anticorpo antinuclear por processos simples. Outro objectivo é fornecer um dispositivo para detecção de anticorpos antinucleares com grande rigor.

#### Descrição Pormenorizada da Invenção

De acordo com a presente invenção, o núcleo da célula é fixado a um suporte contactando directamen-

te a suspensão do núcleo de células com o suporte para absorver os núcleos de células no suporte, separando o suporte da suspensão e tratando-o com uma solução de acetona 50 a 90 % para fixar os núcleos das células no suporte.

Os núcleos das células usados na presente invenção pertencem a estirpes de células de animais superiores, particularmente de origem humana. Mencionam-se como estirpes de células particularmente preferidas as estirpes HEp-2, W11-2, A-549, PC-13 e ZR-751. A preparação das suspensões dos núcleos de células é descrito abaixo.

As células são cultivadas por métodos conhecidos pelos especialistas na matéria, separadas, lavadas com uma solução tampão isotônica e em seguida suspensas numa solução tampão hipotônica de concentração de sal reduzida para as dilatar até um grau tal que as células não sejam rompidas. As células dilatadas são delicadamente rompidas por uma simples operação de homogeneização de modo que os núcleos das células são produzidos relativamente intactos.

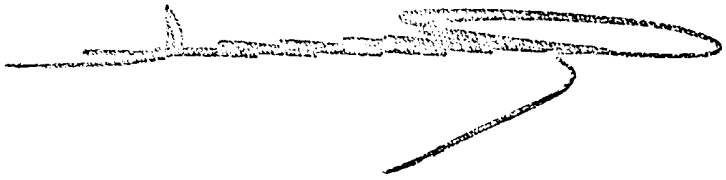
Como soluções tampão isotônicas usadas no processo da presente invenção são mencionadas a solução tampão de Tris, a solução tampão de fosfato e semelhantes. As soluções tampão hipotônicas adequadas são aquelas que têm uma concentração de sal na gama de 1/2 para 1/15 da solução isotônica. É preferível romper as células num grau de 90 % ou mais por uma operação de homogeneização. Em adição à operação de homogeneização, o tratamento ultrassônico é também adequado para romper as células.

A solução de células rompidas assim obtidas é centrifugada para separar a fracção de núcleos. A fracção de núcleos assim isolada é ressuspendida na acima mencionada solução hipotônica acima mencionada para preparar a suspensão de fracção de núcleos.

A concentração de fracção na suspensão é de preferência de  $2 \times 10^5$ /ml ou mais em termos de núcleos de células.

A suspensão de fracção de núcleos de células é posta directamente em contacto com um suporte, de preferência um suporte de plástico, para absorver a reacção de núcleos no suporte. Como suportes de plástico são usados os de polistireno, polistireno com tratamento de superfície, polivinilos e semelhantes. Encontra-se comercialmente disponível uma placa de polistireno com 96 alvéolos para ELISA e é convenientemente usada na forma sob a qual se apresenta. O suporte pode ser de qualquer feitio, tal como tubo de ensaio ou placa. A fixação da suspensão da fracção de núcleos ao suporte de plástico pode ser efectuada deixando em repouso à temperatura ambiente durante 30 a 120 minutos. A temperatura e o tempo podem variar dentro duma gama apropriada. Se se emprega uma placa para ELISA com alvéolos, a suspensão da fracção de núcleos pode ser dividida pelos alvéolos seguida por um descanso por um período de tempo conveniente.


Em seguida separam-se o suporte de plástico e a suspensão da fracção de núcleos e trata-se o suporte de plástico com uma solução de acetona de 50 a 90 % para fixar nele a fracção de núcleos. Se se empregar uma placa para ELISA com alvéolos, a suspensão da fracção de núcleos é removida por meios adequados tais como sucção, e em seguida distribui-se pelos alvéolos uma solução de acetona de 50 a 90 % na mesma quantidade da suspensão das fracções de núcleos. Usualmente, deixando em repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos ou mais tempo obtém-se como resultado a fixação dos núcleos das células no suporte de plástico. Os núcleos das células não se soltam com a lavagem. Se a lavagem é feita depois da remoção da suspensão dos núcleos das células dos alvéolos, os núcleos das células serão arrastados; por conseguinte a lavagem é usualmente indesejável. Contudo, a lavagem pode ser feita se o número de núcleos de células a serem suportados pelo suporte



se destina a ser controlado. É desejável empregar uma solução a 85 % como a solução de acetona. O uso de uma solução de acetona numa concentração de 90 % ou superior é indesejável porque o suporte de plástico seria danificado pela acetona. Enquanto que a utilização de acetona é preferível em solução aquosa, uma parte da água pode ser substituída por um solvente polar tal como álcool etílico. A temperatura e o tempo para o tratamento podem variar numa gama adequada. O tratamento com a acetona de acordo com a presente invenção não dá só como resultado a fixação de núcleos de células no suporte mas também facilita a aproximação de anticorpos antinucleares a antígenos nucleares no interior do núcleo dissolvendo a membrana fosfolipídica do núcleo da célula. Esta circunstância contribui enormemente para melhorar o rigor da análise.

Estes tratamentos dos núcleos de células que são suportados pela placa ELISA de plástico preparada na presente invenção permite a determinação do anticorpo antinuclear na qual o soro diluído 1:100 é usado satisfatoriamente, com boa sensibilidade bem como com baixo ruído pertencente a anticorpos não-específicos que co-existem no produto para o ensaio não-diluído. Quando esta placa é empregue, a presença ou ausência de anticorpo antinuclear em doentes com doenças autoimunes podem ser detectadas com grande rigor sem aplicação de antígeno nuclear (AN) e de ANE como acontecia na Japanese Patente Open Sho 62-32363. Contudo, o ANE ou semelhantes podem também ser transportados no suporte no sentido de facilitar a detecção. Neste caso, o ANE é absorvido na placa preparada de acordo com o método da invenção pondo-a em contacto com o ANE.

A detecção de anticorpo antinuclear usando o suporte de plástico que suporta o núcleo na presente invenção pode ser realizada da mesma maneira como com o método de ELISA no qual o antígeno nuclear extraído é suportado num suporte de plástico.



Na realidade, o soro a ser analisado é feito reagir adicionando-o aos alvéolos de plástico nos quais os núcleos celulares estão suportados de acordo com a invenção, remove-se o soro que não reagiu por lavagem, em seguida por exemplo, anticorpo de imunoglobulina anti-humano de coelho ou proteína G marcada com peroxidase de rábano bastardo (PRB) são feitos reagir para formar uma ligação com o anticorpo anti-nuclear ligado com os núcleos de células, e depois da lavagem, o PRB é corado com o corante tetrametilbenzidina (TMB).

De acordo com a presente invenção produz-se uma placa de plástico para detectar um anticorpo anti-nuclear com grande rigor e por processos simples. A placa de plástico assim produzida pode ser armazenada sem diminuição da sua eficácia durante um ano ou mais se conservada a temperatura baixa e humidade reduzida.

A invenção será descrita em pormenor com referência a um exemplo e a uma análise exemplificativa.

#### Exemplo

(Cultura de células)

Como fonte para preparar as fracções de núcleo das células eucarióticas, adquiriu-se à ATCC (American Type Culture Collection) uma estirpe de células HEp-2 com origem em células do epiteloma de laringite humana (ATCC CCL23). As células HEp-2 conseguidas são cultivadas no meio FBS-RPMI 1640 a 10 % e a cultura é armazenada congelada rapidamente. Para preparar realmente o núcleo celular, as células armazenadas congeladas são descongeladas e cultivadas durante cerca de uma semana, recuperando-se  $1 \times 10^8$  células. Para retirar as células do balão de cultura utilizou-se solução tampão de EDTA a 0,02 % - fosfato (PBS) (preparada dissolvendo 14,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 40,0 g de NaCl e 1,0 g de KCl em água destilada, ajustando o pH e o volume da solução a

7,2 e 5 litros, respectivamente, dissolvendo adicionalmente EDTA.2Na.2H<sub>2</sub>O e submetendo a solução a esterilização por autoclave)

(Extração e fixação do núcleo de célula)

Em solução tampão de Tris (TBS) (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4) foram suspensas  $1 \times 10^8$  células HEP-2. Fez-se a lavagem com duas porções de 50 ml de TBS e separaram-se as células como precipitados por separação centrífuga realizada sob  $500 \times g$  durante 5 minutos. As células foram suspensas em 20 ml de uma solução tampão hipotônica (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,01 M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4) e deixou-se repousar a suspensão em gelo durante 15 minutos. As células foram rompidas num homogeneizador Downes.

Depois de se confirmar por microscópio a ruptura de 90 % ou mais, de preferência 95 % ou mais, das membranas celulares, as células rompidas foram de novo submetidas a separação centrífuga sob  $2000 \times g$  durante 10 minutos. As fracções de núcleo constituindo o resíduo foram suspensas na mesma solução tampão hipotônica como acima de maneira a proporcionar uma concentração de  $2 \times 10^5$ /ml em termos de núcleos de células e colocaram-se 50  $\mu$ l da suspensão em cada um dos alvéolos da microplaca de plástico (comercialmente disponível, por exemplo, de Nunc). A placa de plástico foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. O sobrenadante da suspensão colocada foi então removido completamente por sucção por meio de um processador de ELISA ou de um dispositivo semelhante (por exemplo, Modelo BEP-II de Behring). Então, para cada um dos alvéolos deitaram-se 50  $\mu$ l de uma solução aquosa de acetona a 85 % seguida de repouso à temperatura ambiente durante 10 minutos. A solução de acetona foi removida por sucção e a placa de plástico foi seca num secador. A placa de plástico de suporte de núcleos de células assim preparada, quando embalada num material de embalagem tal como Suran Wrap, pode ser armaze

nada a 4°C durante um período de 6 meses ou mais.

#### Análise Exemplificativa

Adicionou-se a uma placa de plástico, à qual se tinham fixado núcleos de células, soro humano obtido de indivíduos normais (37 casos) ou de doentes com doenças autoimunes (71 casos) em amostras diluídas a 1:100 numa quantidade de 40 µl por alvéolo. O soro humano foi diluído com um diluente preparado por dissolução de caseína em solução tampão de Tris-HCl 0,01 M/NaCl 0,15 M (pH 7,4 contendo NaN<sub>3</sub> a 0,1 % como agente antimicrobiano) até à saturação. Depois da adição das amostras diluídas de soro deixou-se a placa em repouso à temperatura ambiente durante aproximadamente uma hora e em seguida removeu-se o sobrenadante que não reagiu de cada alvéolo por sucção. Os alvéolos foram lavados três vezes com uma solução de lavagem (uma solução aquosa diluída imediatamente antes de usar 20 vezes a partir da solução mãe que contém 1,3 mg/ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,3 mg/ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mg/ml de monolaurato de polioxietileno-sorbitano). Em seguida, adicionaram-se cada alvéolo 40 µl de solução de marcação preparada dissolvendo proteína G marcada numa solução de caseína (idêntica ao diluente excepto no que respeita ao uso de fenol a 0,2 % como agente antimicrobiano) numa concentração de 5 mg/ml. A proteína G é uma proteína que reage especificamente com a imunoglobulina, a qual pode ser adquirida de Cosmo Bio K.K.. Deixaram-se os alvéolos em repouso à temperatura ambiente durante aproximadamente uma hora e em seguida removeu-se a solução marcada que não reagiu de cada alvéolo por sucção e nova lavagem de cada alvéolo com a solução de lavagem.

A cada célula foram em seguida adicionados 50 µl de uma solução corante de tetrametilbenzidina (TMB) (uma solução aquosa misturada imediatamente antes de usar de solução aquosa cromogénica e solução aquosa de substrato na razão de 1:10. A solução quosa cromogénica contém 5 mg/ml de

tetrametilbenzidina, 0,2 mg/ml de fenoximetilpenicilina potássica e 3,2 µg/ml de cloridrato. A solução aquosa de substrato contém 0,27 mg/ml de ureia-peróxido de hidrogénio, 13,1 mg/ml de hidróxido de sódio e 1,64 µl/ml de ácido acético). Depois de deixar em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos, fez-se terminar a reacção adicionando 50 µl de ácido sulfúrico 0,5 N e mediu-se a absorvância a 450 nm.

Os resultados são apresentados no desenho em anexo. Na figura, um círculo aberto ou fechado representa uma espécie. O círculo aberto indica a absorvância para cada espécie no caso em que se efectuou o método de ELISA de acordo com a técnica anterior usando antigene solubilizado (ANE) como um contróle e o círculo a cheio indica o caso em que se onde utiliza o dispositivo da presente invenção. (I) neste caso em que se fizeram determinações para o soro de pacientes com doenças autoimunes que tinham sido positivas pela técnica do anticorpo fluorescente usando uma lâmina de vidro com células HEP-2 fixadas, o que era um processo padrão até agora. (II) é o caso em que se fez a determinação num soro humano normal e (III) é o caso onde se fizeram determinações no soro de pacientes com doenças autoimunes que tinham sido negativas pela técnica do anticorpo fluorescente. Os círculos abertos mais frequentemente encontrados na região da absorvância baixa indicam uma sensibilidade pobre do dispositivo de acordo com a técnica anterior.

Enquanto que se observou um coeficiente de correlação de 85 a 95 % entre o julgamento positivo ou negativo de acordo com a técnica de ELISA usando a placa contendo a fracção de núcleo da presente invenção e o julgamento de acordo com a técnica do anticorpo fluorescente, observou-se um coeficiente de correlação mais baixo de 60 a 70 % no julgamento entre a técnica de ELISA de acordo com a técnica anterior que usa ANE e a técnica do anticorpo fluorescente. Para além disso observou-se uma correlação alta entre o valor medido

por ELISA da presente invenção e a intensidade de coloração por fluorescência desenvolvida.

#### Breve Descrição do Desenho

A figura mostra resultados das determinações do anticorpo antinuclear em amostras de soro usando o aparelho da presente invenção (círculos abertos) e uma técnica de acordo com a técnica anterior (círculos cheios), respectivamente.

#### REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de um dispositivo para determinar um anticorpo anti-nuclear caracterizado por compreender as fases de pôr em contacto uma suspensão de núcleos de células com um suporte para absorver os núcleos das células no suporte, separar o suporte da referida suspensão e tratar a superfície do suporte com uma solução de acetona de 0 a 90 % para fixar os núcleos das células no suporte.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a suspensão de núcleos de células ser colocada em alvéolos dum suporte de plástico, se deixar em seguida à temperatura ambiente por um período de 30 a 120 minutos para absorver os núcleos das células no suporte de plástico, remover o sobrenadante não adsorvido dos alvéolos, colocar nos alvéolos uma solução de acetona de 50 a 90 % e deixar em repouso à temperatura ambiente por um período de 10 minutos ou superior para fixar os núcleos das células no suporte.



- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por as células lavadas com uma solução isotónica serem suspendidas numa solução hipotónica preparada de modo tal que a concentração de sal se situe na gama de 1/2 para 1/5 da solução isotónica, esmagar as células num homogeneizador até uma proporção de 90 % ou superior,

suspender novamente na referida solução hipotónica as fracções de núcleo obtidas por separação centrífuga da solução que contém as células esmagadas,

verter em alvéolos dum suporte de plástico a suspensão das fracções dos núcleos e em seguida deixar à temperatura ambiente por um período de 30 a 120 minutos para absorver as fracções de núcleo no suporte de plástico,

remover dos alvéolos o sobrenadante não absorvido,

verter nos alvéolos uma solução de acetona de 50 a 90 % e em seguida deixar à temperatura ambiente por um período de 10 minutos ou superior para fixar as fracções dos núcleos no suporte de plástico,

remover dos alvéolos a solução de acetona e

secar os alvéolos ao ar.

- 4ª -

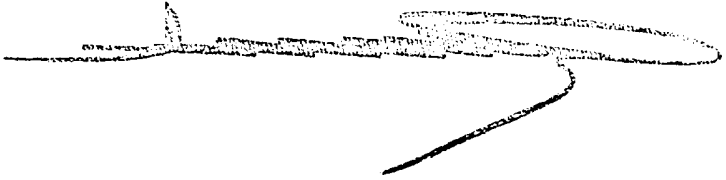
Dispositivo para a determinação dum anticorpo anti-nuclear caracterizado por ser preparado de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi apresentado no Japão em 30 de Março de 1988, sob o número Sho-63-74468.

Lisboa, 29 de Março de 1989

o AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a cursive name.



RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM ELEMENTO ANALITICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de um dispositivo para determinar um anticorpo anti-nuclear que compreende as fases de pôr em contacto uma suspensão de núcleos de células com um suporte para absorver os núcleos das células no suporte, separar o suporte da referida suspensão e tratar a superfície do suporte com uma solução de acetona de 50 a 90 % para fixar os núcleos das células no suporte.

•  
•  
•

90141

