

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 85 827

REQUERENTE: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, norte-americana (Estado de California), com sede em 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: "Processo para o ensaio de um marcador do metabolismo anormal de lípidos"

INVENTORES: Richard S. Smith, Doreen M. Hogle, Linda K. Curtiss, Joseph L. Witztum e Steven Young

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América em 29 de Setembro de 1986 sob o nº 913.140

66 715

SCRF 108.0-EPG:11

PATENTE Nº. 85 827

"Processo para o ensaio de um marcador
do metabolismo anormal de lípidos"

para que

SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION,
pretende obter privilégio de invenção
em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se a processos de ensaio de um marcador do metabolismo anormal de lípidos, compreendendo os passos de avaliar a quantidade de apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I humanas por unidade de volume de uma amostra de sangue e determinar a razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I na amostra por técnicas ELISA em conjugação com moléculas paratópicas monoclonais segregadas por hibridomas possuindo os números de acesso ATCC HB 8742, HB 8746, HB 9200 e HB 9201.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVA

Campo Técnico

O presente invento refere-se a um processo de ensaio para um marcador do metabolismo anormal de lípido e, em particular, refere-se a um processo de ensaio para a determinação da razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I numa amostra de sangue líquido. O invento refere-se finalmente a um sistema de diagnóstico destinado a efectuar o processo.

Antecedentes do Invento

A. Aterosclerose e Lipoproteínas

A aterosclerose é a doença em que o colesterol e outros lípidos, ao acumularem-se nas paredes das artérias, formam placas volumosas que inibem a circulação do sangue e que podem conduzir à formação de um coágulo, obstruindo uma artéria e causando doença trombótica ou embólica oclusiva, como por exemplo, ataque cardíaco ou apoplexia. Nos Estados Unidos, aproximadamente 50 por cento do total de mortes são provocadas por aterosclerose e pelas suas complicações secundárias.

A aterosclerose humana é definida como a acumulação de lípidos seleccionados, incluindo colesterol e células, nas paredes das artérias e com o tempo produz lesões oclusivas. Embora a etiologia da aterosclerose seja multi-factorial, um grande corpo de evidência clínica, patológica, genética e experimental sugere que anormalidades do metabolismo lipoproteico podem contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose. Estes lípidos são transportados na corrente sanguínea sob a forma de complexos lípido-proteína designados por lipoproteínas.

A aterosclerose e em particular a forma conhecida por doença coronária da artéria (CAD) é um problema de saúde importante. A aterosclerose e as doenças vasculares com ela relacionadas são responsáveis por 983 000 mortes em 1983; só o CAD é anualmente responsável por mais mortes que todas as formas de cancro combinadas. Nos Estados Unidos, ocorrem todos os anos



-3-

mais de 1 milhão de ataques cardíacos e morrem mais de quinhentas mil pessoas em resultado desta doença. Em custos directos para os cuidados de saúde, a CAD custa aos Estados Unidos mais de \$60 biliões por ano. Esta verba enorme fez concentrar a atenção em vias para identificar populações particulares em risco de CAD, de modo a poder controlar-se a doença através de dieta, modificação comportamental (exercício) e com agentes terapêuticos específicos.

Foram definidas quatro classes principais de partículas de lipoproteínas do plasma, associadas a colesterol, cuja origem é o intestino ou o fígado. Estas partículas estão envolvidas no transporte dos lípidos neutros, incluindo o colesterol e triglicéridos. Todas as classes de lipoproteínas do plasma têm apolipoproteínas associadas ao complexo lípido-proteína; e as apolipoproteínas desempenham papéis indispensáveis na função dessas lipoproteínas.

A primeira classe é a das quilomicrons. São as lipoproteínas maiores e são ricas em triglicéridos. O local de origem das quilomicrons é o intestino.

Embora as apolipoproteínas constituam, quantitativamente, uma pequena proporção da massa das quilomicrons, as apolipoproteínas A-I, A-II e A-IV são consideradas como estando significativamente associadas às quilomicrons e verificou-se a síntese intestinal destas apolipoproteínas A.

As quilomicrons também contêm apolipoproteína B-48, Quando as quilomicrons são expostas in vitro à lipoproteína do plasma ou de alta densidade (HDL), muito do complemento de quilomicron em apolipoproteínas A é perdido e as apolipoproteínas C e E são adquiridas. A produção intestinal das apolipoproteínas A (apo A) pode ser regulada por factores diferentes da absorção de gordura e da formação de quilomicron.

A classe seguinte de lipoproteínas é a das lipoproteínas de muito baixa densidade, VLDL. A partícula de VLDL é produzida no fígado e está envolvida no metabolismo dos triglicéridos e no transporte destes lípidos a partir do fígado. As



apolipoproteínas apo B-100 e apo E são os constituintes principais da partícula de VLDL.

A terceira lipoproteína é a chamada lipoproteína de baixa densidade (LDL) e é um produto específico do catabolismo de VLDL. A apolipoproteína predominante na partícula LDL é a apolipoproteína B-100 ou apo B-100.

Os resultados do, já clássico, estudo de Framingham (1971) mostram uma correlação nítida entre o risco de contração da CAD e os níveis de colesterol no soro. Este estudo demonstrou também que o aumento do risco de contração da CAD está associado a níveis elevados de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Recentemente, um estudo conduzido pela Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial (1984) demonstrou que se podem reduzir os níveis de colesterol no plasma e de colesterol de LDL com um regime combinado de dieta e drogas e que esta redução do colesterol do plasma tem como resultado uma redução da incidência de mortalidade por CAD.

A LDL é a principal lipoproteína portadora de colesterol no plasma. A LDL é uma partícula esférica, grande, cujo núcleo lípido é composto por cerca de 1500 moléculas de colesterol cada uma delas ligada a uma cadeia comprida de ácido graxo por uma ligação éster. Este núcleo de ésteres de colesterol é envolvido por uma camada de fosfolípido, moléculas de colesterol não esterificadas e uma só molécula de apolipoproteína B-100. Os fosfolípidos são dispostos de modo que as cabeças hidrofílicas fiquem no exterior, permitindo que a LDL fique, em suspensão hidratada, no sangue ou nos fluidos extracelular.

O colesterol é distribuído às células na LDL, através de um receptor específico da LDL, e é libertado das partículas de LDL em lisosomas onde pode controlar o metabolismo do colesterol nas células. Uma acumulação de colesterol intracelular modula três processos.

No primeiro processo, reduz a capacidade da célula pro-



-5-

duzir o seu próprio colesterol impedindo a síntese de uma enzima, HMG CoA redutase, que catalisa um passo da via biossintética do colesterol. A supressão da enzima deixa a célula dependente do colesterol externo proveniente da incorporação de LDL mediada pelo receptor.

No segundo processo, a entrada de colesterol, proveniente da LDL, promove o armazenamento de colesterol na célula, ativando uma enzima denominada lipoproteína aciltransferase. Esta enzima esterifica ácidos gordos em moléculas de colesterol em excesso, produzindo ésteres de colesterol que são depositados em gotículas de armazenamento.

No terceiro, e o mais significativo, a acumulação de colesterol nas células conduz a um mecanismo de regeneração que faz a célula parar de sintetizar novos receptores de LDL. Assim, as células ajustam o seu complemento de receptores externos de modo que seja introduzido, nas células, colesterol suficiente para responder às várias necessidades das células, mas de modo a não as sobrecarregar. Por exemplo, os fibroblastos que se dividem activamente, necessitando assim de novo material de membrana, mantêm um complemento máximo de receptores de LDL de cerca de 40 000 por célula. Em células que não estão em crescimento, a entrada de colesterol começa a acumulá-lo, o sistema de regeneração reduz a produção de receptor e o complemento de receptores é dez vezes reduzido.

Por outro lado, foi mostrado que outra lipoproteína de circulação, a partícula de lipoproteína de densidade elevada (HDL) está implicada num estado de colesterol elevado, associado a um risco menor de aterosclerose. A apolipoproteína A-I é uma proteína estrutural e antígeno da partícula de HDL. A quantidade de HDL proporciona uma correlação inversa com a incidência prevista de aterosclerose.

A lipoproteína de densidade elevada (HDL) contém duas apolipoproteínas principais, a apolipoproteína A-I (apo A-I) e a apolipoproteína A-II (apo A-II). A apo A-I é o componente proteico principal de toda a HDL de primata. Todas as partículas de HDL contêm apo A-I e por conseguinte a imuno-quantifica

-6-

ção de HDL envolve geralmente a quantificação de apo A-I. Cerca de 80% das partículas de HDL contêm também apo A-II, mas não existe referência sobre partículas de HDL contendo apenas apo A-II.

Uma função da apo-I é a activação da enzima de plasma, lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT). Esta enzima é necessária para a esterificação de colesterol livre na HDL, para transporte para o fígado. Na ausência de apo A-I o colesterol no sangue não é esterificado e deste modo o colesterol não é removido do sangue. O papel específico desempenhado pela apo A-II no metabolismo de HDL não foi ainda definido.

Diversos estudos mostraram que níveis elevados de HDL estão correlacionados com incidência reduzida de CAD. Alguns autores especularam que a HDL remove o colesterol de locais periféricos, por exemplo das paredes das artérias, atribuindo assim propriedades anti-aterogénicas à HDL. Concentrações elevadas de colesterol de HDL estão correlacionadas com um metabolismo de lipido relativamente normal e com uma menor incidência e/ou uma gravidade menor da doença cardiovascular, ao passo que níveis elevados de colesterol de LDL estão associados a um metabolismo de lipido anormal e a um aumento do risco de CAD. Para o cuidado correcto a ter com pacientes com hiperlipidemia (excesso de lípidos no sangue) e com pacientes de risco especial relativamente à CAD, é desejável determinar frequentemente os níveis de colesterol de LDL e de HDL. Até agora, os ensaios de colesterol de HDL têm sido incómodos e não rigorosos na determinação dos níveis de HDL no sangue.

B. Estrutura e Função da Lipoproteína

É importante entender-se que o colesterol não está livre no plasma mas é transportado por lipoproteínas para locais tissulares no corpo. O colesterol pode ser obtido por síntese celular directa ou por dieta. No entanto, o colesterol só pode ser removido do hospedeiro pelo fígado onde é convertido em ácidos de bile e excretado.

As quilomicrons transportam colesterol dietético e tri-



-7-

glicéridos para o fígado para processamento subsequente, enquanto que a LDL distribui colesterol aos tecidos extra-hepáticos, incluindo as artérias coronárias. Assim, a lipoproteína, LDL/apo B-100, está envolvida na deposição de colesterol "mau" nos tecidos periféricos. Pelo contrário, a lipoproteína, HDL/apo A, remove colesterol "bom" dos tecidos e faz voltar o colesterol para o fígado onde ele é excretado.

Historicamente, foram desenvolvidos muitos sistemas para isolar e caracterizar lipoproteínas. Estas técnicas baseiam-se geralmente nas propriedades físico-químicas das partículas de lipoproteína. As duas técnicas mais frequentemente usadas são a ultracentrifugação e a electroforese.

A ultracentrifugação de gradiente diferencial de densidade aproveita-se do facto das lipoproteínas serem mais leves ou menos densas que outras proteínas de plasma, e é muito fácil em bora muito moroso e incómodo, separar uns dos outros os quilomícrons (as lipoproteínas mais leves), VLDL, LDL e HDL. As técnicas electroforéticas têm sido úteis para a classificação de pa cientes com hiperlipidemias. Contudo, estas técnicas não são realizadas facilmente num laboratório clínico comum.

Pode também observar-se que a quantificação simples do colesterol do sangue ou triglicéridos não proporciona ao médico informação acerca das lipoproteínas específicas que transportam estes lípidos e da sua quantificação.

C. As Lipoproteínas de Plasma

Foram definidas quatro classes principais de lipoproteínas de plasma; i.e. quilomícrons, VLDL, LDL e HDL e existem com certeza subclasses destas. Todas as lipoproteínas têm ori gem no intestino ou no fígado ou em ambos e parecem ter uma es trutura pseudomicelar. Os lípidos neutros e, particularmente, os ésteres de colesterol e triglicéridos são mantidos no núcleo das lipoproteínas numa forma solúvel e estável através de inter acções com os constituintes polares de superfície, apolipoproteínas e fosfolípidos.

O colesterol não esterificado está também presente nes-

-8-

tes complexos. A sua polaridade situa-se entre a dos lípidos neutros (ésteres de colesterilo e triglicéridos) e a das apolipoproteínas e fosfolípidos mais polares e pode ser encontrado tanto no núcleo como na superfície.

Uma superfície exterior consistindo em apolipoproteínas, colesterol não esterificado e fosfolípidos rodeia um núcleo, insolúvel em água, de ésteres de colesterilo e triglicéridos, protegendo os lípidos apolares do meio aquoso. Este conceito estrutural geral é suportado por estudos de dispersão de raio-X de pequeno ângulo e por outros métodos físicos nos quais foi usada uma diversidade de sondas para explorar a estrutura das lipoproteínas. Uma função importante das lipoproteínas de plasma é assim a solubilização e transporte dos lípidos neutros.

D. As Apolipoproteínas

As apolipoproteínas são os componentes proteicos isentos de lípidos das lipoproteínas de plasma, sendo obtidas por tratamento das lipoproteínas intactas isoladas, com solventes orgânicos, detergentes ou agentes caotrópicos. Nem todas as proteínas capturadas com lipoproteínas têm necessariamente um papel no transporte de lípido. Um exemplo pertinente é o reconhecimento recente de que as proteínas amilóides A do soro, reagentes de fase aguda, são transportadas em plasma ligado a HDL. Estas proteínas de baixo peso molecular podem consistir em até 30% de apo-HDL, em estados inflamatórios, mas é questionável que elas desempenhem papéis específicos no transporte de lípidos.

1. Apolipoproteína A-I

(a) A Proteína

A apolipoproteína A-I (apo A-I) é uma proteína com interesse no presente invento. A apo A-I é discutida abaixo.

A apo A-I é o componente proteico principal de todas as HDL de primata, está presente em todas as partículas de HDL e há múltiplas, p.e. 7-8 moléculas de apo A-I por partícula de

-9-

HDL. Foi referido que ela se encontra presente, em quantidades relativamente menores, em quilomicrons, VLDL e LDL, assim como, que constitui cerca de 60-80 por cento do total da massa de proteínas de HDL.

A Apo A-I consiste numa cadeia simples de 243 a 245 resíduos; não contém cistina, cisteína, leucina ou hidrato de carbono; e existe em diversas isoformas. A apo A-I tem um conteúdo alfa helicoidal de cerca de 55 por cento, no estado isento de lípido, que aumenta para 75 por cento após ligação a fosfolípido. Foram identificados nesta apolipoproteína ciclos de repetição de 11 resíduos helicoidais. Foi sugerido que estas unidades representam uma cadeia simples ancestral que, por duplicação genética, gerou uma unidade repetida com 22 resíduos. Estas unidades têm homologia de sequências afim e crê-se que representam regiões de ligação a lípidos na proteína.

A Apo A-I é um activador potente de LCAT, uma enzima do plasma que catalisa a conversão do colesterol e fosfatidilcolina em éster de colesterilo e lisofosfatidilcolina, respectivamente. Verificou-se que regiões específicas de ligação a lípidos da apo A-I activam LCAT e esta actividade têm sido associada à propriedade de ligação a lípidos. Como foi anteriormente referido, o fígado e o intestino sintetizam apo A-I, mas as suas contribuições relativas para o conteúdo total no plasma e os factores que modulam a produção de apo A-I não estão bem definidas.

Tipicamente, mais do que cerca de 90 por cento de apo A-I do plasma estão associados a HDL, menos de cerca de 1 por cento a VLDL e LDL e cerca de 10 por cento ou menos estão associados à fracção de plasma isenta de lipoproteína. As quantidades de apo A-I em cada tipo de partícula diferem das que são referidas nas informações e que parecem ser função das técnicas usadas na separação das partículas.

(b) Importância Clínica das Lipoproteínas com Apo A-I

A medição do constituinte proteico principal de HDL,

-10-

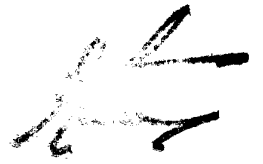
apo A-I, é clinicamente importante. Os resultados de vários estudos demonstraram que os níveis de apo A-I são menores em pacientes com CAD. Esta observação realça o papel protector de apo A-I de plasma neste grupo de pacientes.

Os resultados de vários estudos sugerem que medindo rigorosamente o nível de apo A-I é possível fazer uma prognose individual para o metabolismo anormal de lípidos, aterosclerose e especificamente para a CAD. Para um exame recente a 2416 crianças, ver Freedman et al. (1986) New Eng. J. Med. 315:721-726. Contudo, não tem sido possível utilizar apenas a quantidade de apo A-I, como marcador para o metabolismo anormal de lípidos, apenas devido à dificuldade da sua medição rigorosa e precisa. Deste modo, embora os níveis de apo A-I relativamente elevados tenham tendência para serem correlacionados com o metabolismo normal de lípidos e os níveis relativamente baixos com o metabolismo anormal de lípidos e com CAD, não foi apresentada nenhuma linha de demarcação nítida entre pessoas normais e pessoas com CAD diagnosticada.

Como se referiu anteriormente, tem-se verificado ser extremamente difícil quantificar rigorosa e precisamente a apo A-I num sistema de imunoensaio clinicamente útil como p.e. um radio-imunoensaio (RIA), um imunoensaio ligado a enzima (ELISA), um electro-imunoensaio (EIA), uma imunodifusão radial (RID) ou por imunonefelometria (INA). Para a variância nos valores apresentados usando diversas técnicas ver por exemplo o Quadro 1 de Steinberg et al. (1983) Clin. Chem. 29/3:415-426.

Uma das razões alegadas para estas dificuldades analíticas é a de que a molécula de apolipoproteína A-I está presente no plasma e no soro fazendo parte de uma grande partícula bioquimicamente heterogénea, na qual alguns dos locais antigénios (epítomos) estão ocultos e mascarados. Em consequência, muitos investigadores têm utilizado tratamentos de desmascaramento para as suas amostras de modo que os epítomos normalmente ocultos fiquem desmascarados e disponíveis para imunorreacção.

Steinberg et al. (1983) Clin. Chem. 29:415-426 discutem também o desmascaramento por tratamento de uma amostra de san-



-11-

gue, p.e. de plasma ou de soro, com agentes desnaturantes como ureia, tetrametil-ureia e guanidina, agentes tensio-ativos como dodecilsulfato de sódio e monolaurato de polioxietileno sorbitano (20) (Tween 20), aquecimento por exemplo a 52 graus C durante 3 horas e a 37 graus C durante 2 horas e com solventes orgânicos de deslipidação como p.e. misturas de etanol e éter dietílico, metanol e éter dietílico, clorofórmio e metanol e análogos. Podem ser encontrados mais tratamentos específicos de desmascaramento nos trabalhos de Maciejko et al. (1982) Clin. Chem. 28:199-204 (agente tensio-activo); Koren et al. (1985) Clin. Chim. Acta 147:85-95 (solvente orgânico); e Bury et al. (1985) Clin. Chem. 31:247:251 (37°C, 2 horas).

Alguns dos investigadores anteriores e outros investigadores utilizaram também preparações de anticorpo policlonal para ajudar a evitar a heterogeneidade aparente de apo A-I como a que existe no plasma e no soro. Maciejko et al. (1982) Clin. Chem. 28:199-204; Koren et al. (1985) Clin. Chim. Acta 147:85-95; Bury et al. (1985) Clin. Chem. 31:247-251; e Fesmiere et al. (1984) Clin. Chem. 30:712-716. É evidente que a utilização de anticorpos policlonais num imunoensaio quantitativo, clinicamente útil, acarreta consigo o inconveniente de diferenças na "attendant" de actividade de anticorpo no uso de soros de diversos animais e também de diferenças na imuno especificidade de lotes de soro diferentes.

Por outro lado, áparte as moléculas paratópicas monoclonais utilizadas aqui, nenhum outro investigador descreveu anticorpos monoclonais que imunorreagem, de modo essencialmente igual, com partículas de HDL e com apo A-I, assim como imunorreagem com essencialmente toda a apo A-I presente em HDL numa amostra. Assim, Curtiss et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2982-2998 apresentaram um anticorpo monoclonal designado por AI-7 que imunorreagiu de modo quase igual com apo A-I e com HDL, mas que só era capaz de imunoprecipitar cerca de 60 por cento da apo A-I ou HDL radiomarcados que se sabe estar presente nas amostras ensaiadas.

-12-

2. Apolipoproteína B-100

(a) A Proteína

Uma espécie de apo B sintetizada no fígado, denominada apolipoproteína B-100 (apo B-100), é reconhecida e ligada por receptores celulares de LDL. Ao ligarem apo B-100, estes receptores ligam partículas de LDL e extraem-nas do plasma. A LDL é deste modo incorporada nas células e quebrada, permitindo que o seu colesterol sirva as necessidades de cada célula. A interacção entre apo B e receptor de LDL desempenha assim um papel principal na remoção de colesterol de LDL da corrente sanguínea, e todas as partículas de LDL contêm apo B-100.

(b) Importância Clínica de Lipoproteína com apo B-100

Ao contrário do que acontece com apo A-I e HDL, níveis elevados de apo B têm sido associados ao metabolismo anormal de lípidos e com CAD enquanto que quantidades inferiores têm tendência para serem correlacionados com normalidade e um risco menor de contrair a doença. As partículas de quilomícron contêm uma proteína apo B principal, designada por apolipoproteína B-48, que é também um produto do gene de apo B-100 [Young et al. (1986) J. Biol. Chem. 261:2995-2998] e que partilha pelo menos um epítipo reactivo cruzadamente com apo B-100. As partículas de VLDL e LDL contêm apo B-100. Das duas proteínas, a apolipoproteína B-100 (apo B-100) parece ser a mais importante relativamente ao metabolismo anormal de lípidos e à CAD.

Recentemente, vários investigadores têm sugerido que os níveis de apo B-100 no plasma podem ser mais prenunciadores relativamente ao risco de CAD do que os níveis de colesterol de LDL no plasma. Sniderman et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:604-608. Como acontecia para a HDL e apo A-I, não foi determinada uma linha de demarcação nítida, a partir apenas do nível de apo B-100 ou LDL, que possa mostrar que uma pessoa possui metabolismo anormal de lípidos ou um risco aumentado relativamente à CAD.

-13-

Têm sido referidos muitos tipos de imunoensaios para apoproteína B de plasma utilizando anti-soros contendo anticorpos específicos, incluindo RIA competitivos de fase fluida e de fase sólida, ELISA, RIA e outros. Os problemas que limitam a aplicação difundida destes imunoensaios para apo B têm sido a reprodutibilidade e a qualidade e especificidade dos anti-soros usados. Resenhas dos problemas metodológicos de cada um dos vários tipos de ensaios para apo B são encontradas em Currey et al. (1978), Clin. Chem. 24:280-286 e Rosseneu et al. (1983), Clin. Chem. 28:427:433.

Vários investigadores têm referido o desenvolvimento de painéis de anticorpos monoclonais contra apo B humana, para utilização no estudo da sua estrutura antigénica e do seu papel no metabolismo de lipoproteína. Além disso, houve referências à utilização de anticorpos monoclonais anti-apo B para medir níveis de apo B no plasma em RIA de fase fluida. Pattol et al. (1983) Clin. Chem. 29:1898-1903; Maynard et al. (1984) Clin. Chem. 30:1620-1624 e Young et al., (1986) Clin. Chem. 32:1484-1490. E um grupo referiu ainda a utilização de uma mistura de anticorpos monoclonais anti-apo B num ensaio de imunodifusão radial relativo à apo B de plasma. Marconvina et al. (1985) Clin. Chim. Acta 147:117-125. Contudo, estas técnicas de ensaio padecem da necessidade de incubações prolongadas, centrifugações repetidas e/ou utilização de materiais radioactivos.

3. Moléculas Paratópicas Monoclonais como Reagentes para Apo A-I e B-100

A utilização de anticorpos monoclonais ou das suas porções de locais de combinação, i.e. moléculas paratópicas, como reagentes para a determinação da presença de apo A-I ou B-100 em amostras de sangue humano é atraente porque, uma vez obtidos, estes reagentes podem ser produzidos em quantidades relativamente grandes com uma qualidade consistente evitando-se assim o problema da inconsistência associado aos anticorpos policlonais. No entanto, existe uma série de factores que combatem o uso de uma molécula paratópica monoclonal particular co-

-14-

mo componente nesses sistemas de ensaio.

Usando um anticorpo monoclonal como exemplo de uma molécula paratópica monoclonal, a arte diz que um anticorpo monoclonal pode ser demasiado imuno específico para ser útil, isto devido à heterogeneidade antigénica dos seus antígenos alvo. Por exemplo, a especificidade dos anti-soros convencionais contendo anticorpos policlonais depende do consenso de centenas de milhares de anticorpos diferentes que se ligam a determinantes antigénicos cubrindo a maior parte ou toda uma proteina antigénica, o que se tem mostrado útil em ensaios de apo A-I. Como resultado, pequenas alterações na estrutura do antígeno, devidas a polimorfismo genético, heterogeneidade de glicosilação ou desnaturação ligeira ou outra reacção, terão geralmente pouco efeito na ligação do anticorpo policlonal. Do mesmo modo, um maior ou menor subconjunto de anticorpos de anti-soros policlonais ligará geralmente antígenos que foram modificados ou desnaturados.

Pelo contrário, os anticorpos monoclonais ligar-se-ão geralmente a um determinante antigénico (epítopo) na molécula de antígeno. Se por qualquer razão, esse determinante é alterado, o anticorpo pode continuar a ligar-se ou pode não se ligar. Se isto constitui um problema ou uma vantagem dependerá das circunstâncias individuais. Se, como acontece no caso presente, o anticorpo monoclonal se destina a ser usado num ensaio de diagnóstico de uma apolipoproteína, uma pequena variação antigénica nessa proteína pode causar erros graves. Assim, por exemplo, Tsao et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:15222-15228 e Mao et al. (1983) 29:1890-1897 referiram que alguns anticorpos monoclonais, específicos para moléculas de apo B, se ligam a epítomos que não são expressos em todas as partículas de LDL. Nitidamente, estes anticorpos não seriam úteis para quantificar a apo B-100 total presente no plasma ou no soro.

A heterogeneidade antigénica de apoproteínas A-I foi discutida anteriormente. A heterogeneidade da apo B-100 está, igualmente, bem documentada. Por exemplo, verificou-se que a expressão do epítopo em apo B é modulada por (1) a composição



-15-

dos lípidos associados, (2) a temperatura da imunorreacção, (3) o grau de isolamento de LDL do seu ambiente nativo e (4) a expressão genética entre indivíduos.

Em segundo lugar, devido à sua especificidade única, a utilização sucedida de um anticorpo monoclonal (Mab) depende frequentemente da sua afinidade com o antígeno alvo. Por exemplo, embora um Mab possa ter afinidade suficiente para ser útil para ligar antígeno de fase sólida e líquida, estando o próprio Mab na fase líquida, o mesmo anticorpo pode não ser útil como anticorpo ligado à fase sólida ou seja, pode não ser útil para se ligar ou reter o antígeno em solução.

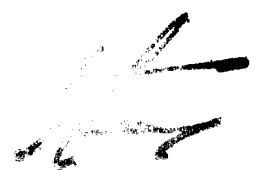
Os problemas indicados anteriormente são problemas gerais na utilização de anticorpos monoclonais. Os especialistas reconheceram assim, que é essencial testar e caracterizar os anticorpos monoclonais em qualquer sistema de ensaio em que eles sejam usados. Ver Goding, James W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, New York (1983), páginas 40-46.

Breve Sumário do Invento

O presente invento refere-se a um processo, aperfeiçoado, de ensaio de um marcador de metabolismo anormal de lípidos, assim como a um sistema de diagnóstico, geralmente sob a forma de conjunto, para realizar esse processo.

Nesse ensaio, são medidas as quantidades de apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I numa unidade de volume de uma amostra de sangue de pessoa e é determinada a razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I, como grandeza sem unidades.

O melhoramento presente compreende ensaiar uma primeira alíquota de uma amostra de sangue líquido humano, contendo apolipoproteína, para a determinação da quantidade de apolipoproteína B-100, misturando a primeira alíquota de amostra líquida num suporte sólido que consiste essencialmente na matriz sólida com primeiras moléculas paratópicas monoclonais, ligadas à fase sólida, que imunorreagem com apolipoproteína B-100 e que



-16-

são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746, para formar uma mistura de fases sólida-líquida. A superfície do suporte sólido tem os locais de ligação não específica de proteína bloqueados. Esta mistura é mantida sob condições de ensaio biológico, durante um período de tempo predeterminado que seja suficiente para que as primeiras moléculas paratópicas imunorreajam com apolipoproteína B-100 presente na alíquota de amostra e para que se forme um imunorreagente ligado à fase sólida que contenha essencialmente toda a apolipoproteína B-100 presente na alíquota de amostra.

A apolipoproteína B-100 na primeira alíquota de amostra líquida descrita acima é também misturada com segundas moléculas paratópicas monoclonais de fase líquida que imunorreagem com apolipoproteína B-100, que são segregadas por um dos hibridomas com os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746 mas que não foram utilizadas nos passos de mistura anteriores; i.e., moléculas paratópicas monoclonais segregadas pelo hibridoma (dos dois hibridomas anteriores) que não foi usado para moléculas paratópicas ligadas à fase sólida e que estão ligadas operativamente a um meio indicador enzimático, para formar uma segunda mistura. Esta segunda mistura é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado, suficiente para que as segundas moléculas paratópicas formem um imunorreagente com essencialmente toda a apolipoproteína B-100 presente na alíquota de amostra. A fase sólida e a fase líquida que se formam, após mistura de ambas as moléculas paratópicas e formação de imunorreagentes são separadas e é determinada a quantidade de imunorreagente contendo apolipoproteína B-100 ligado a um meio indicador, presente na fase sólida separada, e em consequência a quantidade de apolipoproteína B-100 numa unidade de volume da amostra.

Numa concretização preferível, os dois passos de mistura anteriores são realizados de modo essencialmente simultâneo e os dois passos de manutenção são realizados em conjunto. Assim, as primeiras moléculas paratópicas e as segundas moléculas paratópicas ligadas a enzima são misturadas com a amostra

-17-

praticamente em simultâneo, sendo a mistura de fases líquida-sólida resultante mantida por um período de tempo suficiente para que ambas as moléculas imunorreajam com essencialmente toda a apolipoproteína B presente na amostra.

No segundo ensaio utiliza-se uma segunda alíquota da amostra de sangue líquido de pessoa que contém apolipoproteína A-I e que está isenta de tratamento desmascarante. A segunda alíquota de amostra líquida é aqui misturada com o suporte sólido que consiste essencialmente numa matriz sólida possuindo terceiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida, que imunorreagem com uma apolipoproteína A-I e que são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 9200 ou HB 9201, para formar uma terceira mistura de fases sólida-líquida. A superfície do suporte sólido possui também locais de ligação não específica de proteína bloqueados. A terceira mistura de fases sólida-líquida é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado que seja suficiente para que as terceiras moléculas paratópicas imunorreajam com essencialmente toda a apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra e formem um imunorreagente ligado à fase sólida que contém essencialmente toda a apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra.

A mesma segunda alíquota de amostra líquida contendo apolipoproteína A-I é misturada com quartas moléculas paratópicas monoclonais, que imunorreagem com apolipoproteína A-I, que são segregadas por um dos hibridomas com os números de acesso ao ATCC HB 9200 ou HB 9201 mas que não foram utilizadas nos passos de mistura anterior, i.e. as moléculas paratópicas que não foram usadas como parte do sólido e que estão ligadas operativamente a um meio indicador enzimático, para formar uma quarta mistura. A quarta mistura é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado que seja suficiente para que as quartas moléculas paratópicas ligadas a um meio indicador formem um imunorreagente com essencialmente toda a apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra. As fases sólida e líquida que se formam após mistura

-18-

de ambas as moléculas paratópicas anteriores e formação de imunorreagentes, são separadas e determina-se a quantidade de imunorreagente, contendo apolipoproteína A-I ligada a um meio indicador, presente na fase sólida separada e consequentemente, a quantidade de apolipoproteína A-I numa unidade de volume de amostra.

É também preferível que os dois passos de mistura anteriores sejam realizados essencialmente em simultâneo e que os dois passos de manutenção anteriores sejam realizados em conjunto. Assim, as moléculas paratópicas ligadas à fase sólida, as moléculas paratópicas ligadas a enzima e a alíquota de amostra são de novo misturadas em conjunto de modo essencialmente simultâneo e mantidas até que as fases sólida e líquida sejam separadas.

Nas concretizações particularmente preferidas, os ensaios anteriores, para apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I, são realizados utilizando as concretizações preferidas, de modo que em cada ensaio, as moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida, as moléculas paratópicas monoclonais ligadas a um meio indicador enzimático em fase líquida, e a alíquota de amostra sejam misturadas essencialmente em simultâneo e em seguida, sejam mantidas durante um período de tempo suficiente para que ambas as moléculas paratópicas, em cada mistura, imunorreajam com substancialmente toda as respectivas apolipoproteínas B-100 ou A-I presentes em cada mistura.

Em qualquer dos ensaios anteriores é preferível que as moléculas paratópicas monoclonais, ligadas à fase sólida, nomeadas em primeiro lugar, sejam as segregadas pelo hibridoma com o número de acesso ao ATCC HB 8746 e que as terceiras moléculas paratópicas ligadas à fase sólida sejam as segregadas pelo hibridoma com o número de acesso ao ATCC HB 9200.

Numa outra perspectiva deste invento inclui-se um sistema de diagnóstico, tipicamente na forma de conjunto. Este sistema contém pelo menos embalagens ou recipientes separados, cada um dos quais tem um dos tipos de moléculas paratópicas monoclonais discutidos anteriormente numa quantidade suficiente pa

-19-

ra realizar uma determinação da razão entre apo B-100 e apo A-I. Um tipo de moléculas paratópicas do par que imunorreage com apo B-100 e um tipo de moléculas paratópicas do par que imunorreage com apo A-I estão ligadas operativamente a um meio indicador enzimático.

Mais preferivelmente, as respectivas moléculas paratópicas monoclonais que não estão ligadas aos respectivos meios indicadores são ligadas, cada uma separadamente, matrizes de fase sólida para formar suportes separados de fase sólida. As superfícies de cada um destes suportes tem locais não específicos de ligação de proteína bloqueados. As matrizes sólidas destes suportes sólidos constituem o recipiente ou embalagem para as respectivas moléculas paratópicas.

É evidente que embora se tenham atribuído números às moléculas paratópicas, i.e., primeiras, segundas, terceiras e quartas, assim como as embalagens que as contêm no sistema de diagnóstico, esses números foram utilizados apenas para identificação e não são indicativos da ordem pela qual são misturadas as moléculas paratópicas numa alíquota de amostra ou pela qual os conteúdos das embalagens são utilizados. É também evidente que apesar de se terem atribuído às misturas, descritas anteriormente, números semelhantes aos das moléculas paratópicas que são misturadas, não é necessário que essas misturas sejam formadas pela ordem citada. Assim, por exemplo, a mistura da segunda alíquota, descrita anteriormente, com as terceiras e quartas moléculas paratópicas monoclonais pode ocorrer antes da mistura da primeira alíquota já descrita com as primeiras e segundas moléculas paratópicas. Do mesmo modo, como se disse anteriormente, as primeiras e segundas moléculas paratópicas podem ser misturadas essencialmente em simultâneo.

O presente invento apresenta vários benefícios e vantagens. De entre estes benefícios e vantagens ressalta o facto de que da utilização dos processos de ensaio descritos em seguida resulta a obtenção de um marcador rigoroso e seguro para o metabolismo anormal de lipídios que está correlacionado com a doença da artéria coronária (CAD).

-20-

Outro benefício e vantagem do presente invento é o de que os seus ensaios podem ser realizados com o rigor e precisão desejados num período de tempo relativamente curto, p.e. no período de 1 hora, se se desejar.

Ainda um outro benefício e vantagem do presente invento é o de que embora os seus processos proporcionem medições muito rigorosas e precisas relativamente à apo B-100, apo A-I e ao marcador da razão, estas medições são conseguidas sem a utilização de elementos radioactivos e sem os malefícios que o uso desses elementos produz normalmente.

Outras vantagens e benefícios do presente invento tornar-se-ão evidentes para os especialistas com a leitura da descrição detalhada do invento que se segue.

Breve Descrição dos Desenhos

Nas Figuras que fazem parte da exposição:

a Figura 1 é um gráfico que mostra a percentagem de ligação de partículas de LDL marcadas com ^{125}I (ordenadas) em função das concentrações molares crescentes de anticorpo monoclonal MB47 [abcissa; concentração Ab (MB47)], obtido a partir de um radio-imunoensaio (RIA) de fase fluida;

A LDL foi preparada a partir de plasma reunido de dez pacientes (-----) ou a partir de plasma de um paciente normolipidémico (——). O plasma foi obtido por plasmaforese de pacientes após um período de jejum de aproximadamente 12 horas;

a Figura 2 contém dois gráficos. O gráfico A ilustra a capacidade que tem uma quantidade constante, conhecida, de moléculas MB47 marcadas com peroxidase de rábano (HRPO-MB47) para imunorreagir com apo B-100 reagente fixada à fase sólida, na presença de quantidades crescentes de moléculas MB24. A ordenada é expressa em unidades de densidade óptica relativa, enquanto que a abcissa o é em unidades de microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de proteína de anticorpo não marcada, adicionada como competidor;

misturou-se praticamente em simultâneo uma quantidade

-21-

constante ($20 \mu\text{g}$) de moléculas MB47 acopladas a HRPO, com quantidades crescentes de moléculas MB47 não marcadas (●) ou de moléculas MB24 (▲) não marcadas e com apo B-100 reagente ligada à fase sólida (LDL). As misturas foram mantidas a 25 graus C durante um período de tempo de três horas, permitindo-se assim que as moléculas paratópicas MB24 e MB47 reagissem imunologicamente com apo B-100 reagente e formassem um imunorreagente ligado à fase sólida. A quantidade de MB47 marcada ligada à fase sólida foi então ensaiada como se descreve na parte sobre ELISA competitivo na Secção de Materiais e Processos;

o gráfico A mostra que a presença, na mistura de imunor reacção de quantidades crescentes de moléculas paratópicas MB47, não marcadas, faz decrescer, correspondentemente, a quantidade de moléculas MB47 marcadas, ligadas como imunorreagente de fase sólida. Assim, MB47 não marcado compete com MB47 marcado relativamente a LDL;

o gráfico A mostra também que quantidades crescentes de moléculas MB24 não marcadas não fazem decrescer, significativamente, a quantidade de MB47 marcada, ligado como imunorreagente de fase sólida. Deste modo, moléculas MB24, não marcadas, não competem com moléculas MB47 marcadas relativamente à ligação com LDL;

o gráfico B mostra que se obtêm resultados semelhantes usando moléculas de MB24 marcadas com HRPO e moléculas MB47 não marcadas. As moléculas paratópicas MB47 e MB24 ligam-se assim a epítomos diferentes que estão suficientemente afastados, na superfície de apo B-100, para permitir a ligação das duas moléculas a uma só molécula de apo B-100 sem competição estereoa e sem inibirem a ligação uma da outra;

a Figura 3 contém dois gráficos A e B. O gráfico A ilustra a capacidade de uma quantidade constante, conhecida, ($0,375 \mu\text{g/ml}$) de moléculas AI-10 marcadas com peroxidase de rábano para imunorreagir com apo A-I reagente fixada à fase sólida na presença de quantidades crescentes de moléculas AI-10 (▲) e AI-11 (■) não marcadas. A ordenada é expressa em unidades de densidade óptica ao passo que a abcissa O está em uni

-22-

dades de microgramas (μg) de anticorpos monoclonais competidores, não marcados, adicionados. Este estudo é semelhante ao discutido relativamente à Figura 2 e os seus pormenores são apresentados na Secção de Processos e Materiais.

O gráfico A mostra que quantidades crescentes de moléculas AI-10 não marcadas, na mistura de imunorreacção, fazem decrescer, correspondentemente, a quantidade de AI-10 marcada, ligada como imunorreagente de fase sólida. Deste modo, AI-10 não marcada compete com AI-10 marcada relativamente a apo A-I.

O gráfico A mostra também que quantidades crescentes de moléculas AI-11 não marcadas não fazem decrescer, significativamente, a quantidade de moléculas AI-10 marcadas, ligadas como imunorreagente de fase sólida. Assim, moléculas AI-11 não marcadas não competem com moléculas AI-10 marcadas relativamente à ligação com apolipoproteína A-I.

O gráfico B mostra que são obtidos resultados semelhantes usando HDL como antígeno, com uma quantidade constante ($0,375 \mu\text{g/ml}$) de moléculas AI-10 marcadas com HRPO e moléculas de AI-11 não marcadas (■) e moléculas de AI-10 (▲). As moléculas AI-10 e AI-11 ligam-se portanto a epítomos diferentes que estão suficientemente afastados na superfície de apo A-I ou de apo A-I em HDL para permitir a ligação de ambas as moléculas de anticorpo monoclonal a uma só molécula apo A-I sem competição estereia e sem inibição da ligação uma da outra.

Descrição Detalhada do Invento

I. Discussão Geral

A. Definições

O termo "anticorpo" refere-se a uma molécula que é um membro de uma família de proteínas glicosiladas chamadas imunoglobulinas que se podem combinar especificamente com um antígeno. Este anticorpo combina-se com o seu antígeno por uma interacção específica de ligação imunológica entre o determinante antigénico do antígeno e o local de combinação de anticorpo no anticorpo.

-23-

Um "local de combinação de anticorpo" é a porção estrutural de uma molécula de anticorpo constituída por regiões variáveis e hipervariáveis de cadeias pesadas e leves que ligam, especificamente, antígeno. Usando a nomenclatura de Jerne (1974) Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 125C:373-389, um local de combinação de anticorpo é geralmente referida como "paratopo".

As porções de polipéptido, contendo o local de combinação de anticorpo (contendo paratopo), de anticorpos são as porções de moléculas de anticorpo que contêm o paratopo e que se ligam a um antígeno e incluem, por exemplo, as porções Fab, Fab', F(ab')₂ e F(v) dos anticorpos. As porções Fab e F(ab')₂ de anticorpos são preparadas pela reacção proteolítica de, respectivamente, papaína e pepsina, em anticorpos substancialmente intactos, usando processos conhecidos. Ver por exemplo Patente U.S. nº. 4 342 566 de Theofilopolous e Dixon. As porções de anticorpo Fab' são também conhecidas e são produzidas a partir das porções F(ab')₂ seguindo-se a redução das pontes dissulfuradas que ligam as duas porções de cadeia pesada, p.e. com mercaptoetanol, e em seguida por alquilação do mercaptano de proteína resultante com um reagente como iodoacetamida. Preferem-se os anticorpos intactos e utilizam-se estes para ilustrar as moléculas monoclonais ligandos deste invento.

Historicamente, a palavra "antígeno" tem sido usada para designar uma entidade que está ligada a um anticorpo e também para designar a entidade que induz a produção do anticorpo. A acepção mais comum limita o significado de antígeno à entidade ligada por um anticorpo enquanto que a palavra "imunogénio" é usada para a entidade que induz a produção de anticorpo. Quando a entidade, discutida aqui, é imunogénica e antigénica, designar-se-à geralmente por "antígeno".

A expressão "determinante antigénico" refere-se à verdadeira porção estrutural do antígeno que é ligada imunologicamente por um local de combinação de anticorpo. A nomenclatura de Jerne redefine um determinante antigénico como um "epítopo".

A expressão "biologicamente activo" refere-se pelo menos



-24-

a capacidade de uma molécula proteica ligar especificamente antígeno ou local de combinação específica de anticorpo, embora possam estar também presentes na molécula outras capacidades gerais ou efectoras.

A actividade biológica de uma molécula paratópica, contendo um local de combinação de anticorpo, é evidenciada pela reacção imunológica do paratopo (local de combinação de anticorpo) com o seu epítipo (determinante antigénico) depois da sua mistura num meio aquoso para formar um imunorreagente, a valores de pH e força iónica pelo menos fisiológicos. De preferência, a actividade biológica ocorre sob condições de ensaio biológico, i.e., condições sob as quais uma molécula paratópica monoclonal, útil neste invento, se liga ao epítipo (determinante antigénico) a um valor de pH na gama de cerca de 5 a cerca de 9 e a forças iónicas entre a da água destilada e a do cloreto de sódio cerca de um molar e a temperaturas entre 4 graus C a cerca de 45 graus C. As moléculas paratópicas monoclonais úteis neste invento são todas biologicamente activas.

"ELISA" refere-se a um ensaio de imunossorvente ligado a enzima que utiliza um antígeno ou anticorpo ligado a uma fase sólida e um conjugado enzima-anticorpo ou enzima-antígeno para detectar e quantificar a quantidade de antígeno ou anticorpo presente numa amostra. Pode encontrar-se uma descrição da técnica de ELISA no Capítulo 22 da 4ª. Edição de Basic and Clinical Immunology de D. P. Sites et al., publicado por Lange Medical Publications de Los Altos, CA em 1982 e nas Patentes dos Estados Unidos da América n.ºs. 3 654 090; 3 850 752 e 4 016 043 que são aqui incorporados por referência.

"Enzima" refere-se a uma proteína capaz de acelerar ou produzir por acção catalítica alguma modificação num substrato para o qual é frequentemente específica.

"Imunorreagente" como se usa aqui refere-se ao produto de uma reacção imunológica, i.e., a entidade produzida quando um antígeno é ligado imunologicamente por um anticorpo ou por uma molécula contendo um paratopo. Um imunorreagente é assim um tipo específico de complexo formado entre moléculas.



-25-

Os termos "meio indicador", "meio indicador enzimático" ou "marcador" são aqui usados indistintamente, em várias formas gramaticais para designarem enzimas que estão directamente envolvidas na produção de um sinal detectável para indicar a sua presença. As moléculas paratópicas quando estão ligadas a marcadores enzimáticos são algumas vezes referidas como sendo moléculas paratópicas ligadas a enzima.

A expressão "anticorpo global" é usada para distinguir uma molécula completa, intacta, segregada por uma célula de outras moléculas, mais pequenas, que contêm também o paratopo necessário para a actividade biológica numa imunorreacção com um epítipo.

As moléculas paratópicas úteis no presente invento são moléculas paratópicas monoclonais. Um "anticorpo monoclonal" (Mab) é um anticorpo produzido por clones de um hibridoma que segrega apenas um tipo de molécula de anticorpo, e uma molécula paratópica monoclonal é um anticorpo monoclonal ou uma sua porção de polipéptido contendo um paratopo, como é discutido abaixo. A célula de hibridoma é fundida a partir de uma célula produtora de anticorpo e de um mieloma ou outra linha celular auto-perpetuadora. Estes anticorpos foram descritos pela primeira vez por Kohler e Milstein, Nature, 256, 495-497 (1975) cuja descrição é aqui incorporada por referência.

As expressões "molécula paratópica monoclonal" e apenas "molécula paratópica" são usadas indistintamente e colectivamente para referir a classe de moléculas que contêm um local de combinação de um anticorpo monoclonal e incluem um anticorpo monoclonal global, um anticorpo monoclonal substancialmente global e uma porção de um anticorpo monoclonal contendo um local de ligação de anticorpo. Os anticorpos monoclonais globais designados por MB47, MB24, AI-10 e AI-11 são moléculas paratópicas deste invento, assim como o são porções destes anticorpos que incluem o paratopo. Os termos "molécula paratópica monoclonal" ou só "molécula paratópica" são aqui usados sozinhos quando se pretende designar uma molécula biologicamente activa, genérica, contendo o paratopo dos anticorpos monoclo-

-26-

nais anteriores. Os termos MB47, MB24, AI-10 e AI-11 com ou sem as palavras "molécula paratópica" são usados quando se pretendem designar anticorpos globais específicos produzidos pelos hibridomas ATCC HB 8742, HB 8746, HB 9200 ou HB 9201.

As palavras "segregar" e "produzir" são frequentemente usadas indistintamente na arte para células a partir das quais são obtidas moléculas de anticorpo. As células que produzem anticorpos podem contudo não segregar essas moléculas no seu ambiente. As células de hibridoma, com interesse aqui, segregam anticorpos monoclonais no seu ambiente. Contudo, estas células são algumas vezes referidas com células "produtoras de anticorpos" e os seus anticorpos são por vezes referidos como tendo sido "produzidos" para que haja concordância com a frase utilizada na arte. Em relação às porções de polipéptido, contendo paratopo, dos anticorpos anteriores diz-se igualmente que são "produzidas" ou "segregadas" embora seja evidente que estas moléculas são preparadas a partir de anticorpos que são eles próprios "produzidos" ou "segregados".

O termo "sobrenadado" e "sobrenadante" são aqui usados indistintamente e referem-se ao meio líquido in vitro no qual as células são cultivadas. Os anticorpos monoclonais produzidos pelas culturas de hibridomas de interesse são segregados no seu ambiente de meio de cultura. O sobrenadado do meio de cultura para estas células é portanto uma fonte preferida de moléculas paratópicas monoclonais e é facilmente obtido livre a partir de células de hibridoma, por técnicas conhecidas. Exemplo dessas técnicas é a centrifugação a baixa velocidade para sedimentar as células do meio líquido. Alternativamente, as moléculas paratópicas monoclonais podem ser obtidas de fluido de ascite por tumor (fluido ascítico) de animais laboratoriais nos quais foi introduzido o tecido de hibridoma. Descrevem-se adiante os dois métodos.

A expressão "substancialmente em simultâneo" usada aqui em relação à mistura de três ou mais antígenos e componentes de molécula paratópica, para formar uma mistura de imunorreação significa que todos os componentes estão presente e são misturados numa só mistura uns dos outros, durante 15 minutos



-27-

e preferivelmente durante 5 minutos para mistura de quaisquer dois dos componentes.

A expressão "substancialmente toda", usada em relação à imunorreacção de uma molécula paratópica e seus antígenos de apolipoproteína B-100 como LDL ou de apolipoproteína A-I como HDL para formar um imunorreagente, significa que a molécula paratópica imunorreage com pelo menos cerca de 90 por cento do antígeno presente em solução, para formar o imunorreagente quando a molécula paratópica está presente em excesso. Na prática que é preferida a molécula paratópica forma um imunorreagente com mais de 95 por cento da molécula antigénica presente quando a molécula paratópica está também presente em excesso.

B. Hibridomas e Moléculas Paratópicas Monoclonais

O presente invento utiliza dois pares de moléculas paratópicas que são segregadas por quatro hibridomas. Um dos pares de moléculas paratópicas imunorreage com apolipoproteína B-100. O outro par imunorreage com apolipoproteína A-I.

Os hibridomas que segregam moléculas paratópicas que imunorreagem com apo B-100 possuem as designações laboratoriais HL130C2.3C5 e V82A6.1G4, e as moléculas paratópicas monoclonais globais segregadas por esses hibridomas são aqui geralmente designadas por MB47 e MB24, respectivamente. Cada uma das moléculas paratópicas segregadas por esses hibridomas imunorreage com mais de cerca de 90 por cento de ^{125}I -LDL e com um determinante antigénico conservado, separado e distinto em apo B-100. Como se pode observar do exame aos gráficos A e B da Figura 2, as moléculas paratópicas MB47 e MB24 ligam-se ambas a apo B-100, fazendo-o cada uma sem inibir substancialmente a imunorreacção da outra. Como foi salientado por Young et al. (1986) Clin. Chem., 32/8:1484-1490, MB47 reage apenas com apo B-100 enquanto que MB24 imunorreage com apo B-100, reagindo cruzadamente, também, com apo B-48 e também com apo B-26, um fragmento de apo B-100 como é discutido adiante.

O segundo par de hibridomas possui as designações laboratoriais H91H2.2H8 e H103D8.1D11 e segrega moléculas paratópi-

cas designadas por AI-10 e AI-11, respectivamente. Cada uma destas moléculas paratópicas AI-10 e AI-11 imunorreage com um determinante antigénico conservado em apo A-I e imunorreage com mais de 90 por cento de partículas de ^{125}I -HDL num ELISA de fase sólida. Como se observa do exame aos gráficos A e B da Figura 3, ambas as moléculas paratópicas AI-10 e AI-11 se ligam a apo A-I e HDL mas não interferem substancialmente com a ligação uma da outra.

Cada um dos quatro hibridomas anteriores foi depositado na American type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, de acordo com o Tratado de Budapeste para o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismo para Fins de Protecção de Patentes.

<u>Hibridoma</u>	<u>Designação da molécula para tópica</u>	<u>Número de acesso ao ATCC</u>	<u>Data do depósi to</u>
V82A6.1G4	M24	HB 8742	3/6/85
HL130C2.3C5	MB47	HB 8746	3/6/85
H91H4.2H8	AI-10	HB 9200	9/16/86
H103D8,1D11	AI-11	HB 9201	9/16/86

Os depósitos anteriores foram feitos em conformidade com os requisitos do Tratado de Budapeste os quais exigem que a duração do depósito deve ser de 30 anos a partir da data de depósito ou de 5 anos após o último pedido de depósito na entidade depositária ou durante a vida útil de uma Patente dos Estados Unidos da América que se inicia com este Pedido, optando-se pela mais longa. Far-se-à o reabastecimento em hibridomas se eles se tornarem não viáveis no depósito e serão tornados disponíveis ao público pelo ATCC após concessão de uma patente com base neste pedido.

Curtiss et al. (1982) J. Biol. Chem., 257:15213-15221 referiram anteriormente a produção e caracterização de moléculas paratópicas específicas ll apo B, incluindo as designadas por MB24 produzidas pelo hibridoma HB 8742. O hibridoma HB

-29-

8742 foi obtido fundindo esplenócitos de ratos imunizados com VLDL humana, com células de mieloma.

Mostrou-se que MB24 imunorreage com apo B-100 desnaturada presente em VLDL e LDL assim como com apolipoproteína B-26 desnaturada de LDL e uma proteína de LDL de elevado peso molecular, não identificada, nessa ocasião. Um estudo mais recente indicou que ela é ligada com apo B-48. Tsao et al. (1982) J. Biol. Chem. 15222-15228 mostraram que MB24 imunorreage com 100 por cento de antígeno de LDL nativo presente num RIA de fase fluída.

A fração IgG de fluido ascítico contendo MB24 gerada a partir de crescimento intraperitoneal de HB 8742 foi caracterizada por focalização isoelétrica (IEF). Como salientado em Curtiss et al., (1982) J. Biol. Chem., 257:15213-15221, a fusão foi realizada usando células de mieloma P3x63Ag8 que segregam uma imunoglobulina IgG₁k (proteína de mieloma). Deste modo, o fluido ascítico de HB 8742 demonstrou em IEF um padrão único de bandas múltiplas de proteínas representando moléculas de imunoglobulina contendo cadeias pesadas e leves, misturadas aleatoriamente, em adição ao anticorpo de IgG₁k de mieloma P3x63Ag8 e às moléculas paratópicas MB24.

O hibridoma HB 8746 produz moléculas paratópicas MB47 e formou-se fundindo esplenócitos de ratos imunizados com LDL e células de mieloma P3x63Ag8.653.1. Este anticorpo monoclonal e hibridoma foram referidos por Young et al. (1986) Arteriosclerosis 6:178-188. Esta variedade de linha celular progenitora de mieloma utilizada para preparar o hibridoma não segregava uma proteína de mieloma. A IEF de fluido ascítico de HB 8746 revela um padrão único de bandas de proteína representando as cadeias IgG2a pesadas e as cadeias kapa leves de MB47.

Assim, os hibridomas anteriores podem ser caracterizados em parte pelo padrão de IEF das moléculas paratópicas que segregam. Embora o hibridoma HB 8742 produza mais do que um tipo de molécula paratópica, as moléculas paratópicas úteis neste invento podem ser facilmente identificadas e isoladas através das suas capacidades de imunorreagir com epítipo (de-

terminante antigénico) em apo B-100.

As especificidades antigénicas de MB24 e de MB47 foram analisadas determinando as suas capacidades individuais para imunorreagirem com apoproteínas obtidas de quilomicrons, VLDL, LDL e HDL em vários ensaios. Os dados assim obtidos indicam que a MB47 e a MB24 imunorreagem com apo B-100 obtida a partir de LDL, VLDL e IDL mas não com apo B-48 de VLDL ou de quilomicrons e não imunorreagem também com HDL. Os fragmentos Fab de MB47 e de MB24 ligam-se também a LDL em RIA de fase sólida.

Estudos anteriores demonstraram a heterogeneidade antigénica em apo B-100. Isto é, alguns epítomos de apo B-100 não são expressos por todas as partículas de LDL. Assim, a mistura com um excesso de determinados anticorpos monoclonais num RIA de fase fluida não tem como resultado a ligação imunológica de todas as partículas de LDL radio-marcadas (^{125}I -LDL).

Para determinar se o epítomo reconhecido pelas moléculas de MB47 era uniformemente expresso por todas as LDL, estudou-se a capacidade que possui MB47 para se ligar imunologicamente a ^{125}I -LDL num RIA de fase fluida. Radiomarcaram-se LDL isoladas de plasma reunido de 10 pacientes normais e plasma de um só paciente normal, como se descreve adiante e misturaram-se com moléculas MB47 biologicamente activas, para formar uma mistura de imunorreacção. A mistura foi mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado, suficiente para que as moléculas MB47 se ligassem imunologicamente a apo B-100, em cada amostra, e formassem um produto de imunorreacção (imunorreagente).

A quantidade máxima de ^{125}I -LDL ligada por um excesso de moléculas paratópicas MB47 foi determinada por precipitação de todas as moléculas receptoras com IgSORB (The Enzyme Co., Boston, MA) e a quantificação das contagens associadas a ^{125}I -LDL, no precipitado, foi efectuada num contador gama. Os resultados, expressos em termos de percentagem de ^{125}I -LDL precipitada por ácido tricloroacético (TCA) e mostrados na Figura 1, demonstram que essencialmente toda a ^{125}I -LDL estava ligada pelo anticorpo, indicando que o epítomo reconhecido e ligado por



-31-

MB47 é expresso por todas as partículas de LDL.

No processo de ensaio deste invento, as primeiras e segundas moléculas paratópicas monoclonais devem ligar-se a epítomos diferentes da molécula de apo B-100 e estes epítomos devem estar suficientemente afastados de modo que a ligação de uma molécula paratópica não iniba, por impedimento estereo, a ligação da outra molécula paratópica. Examinou-se portanto a capacidade que possuem MB47 e MB24 para inibirem competitivamente as ligações, uma da outra, com apo B-100 reagente fixado à fase sólida.

Os resultados desse estudo, apresentados na Figura 2, indicam que MB24 não marcada, num excesso de 70 vezes, não inibiu significativamente a ligação entre MB47, marcada com peroxidase e apo B-100 reagente. De modo semelhante, MB47 não marcada, num excesso de 70 vezes, não inibiu significativamente a ligação entre MB24, marcada com peroxidase, e apo B-100. Assim, MB24 e MB47 ligam-se a epítomos diferentes em apo B-100, estando estes epítomos suficientemente afastados de modo que MB24 e MB47, na forma de anticorpos intactos, não inibem a ligação uma da outra com uma só molécula de apo B-100.

Os hibridomas produtores de moléculas paratópicas monoclonais AI-10 e AI-11 foram preparados a partir de duas fusões separadas de esplenócitos de rato com células de linha de mieloma de rato P3x63Ag8.653. Usou-se HDL humana como imunogénio. As moléculas AI-10 são da classe IgG2a enquanto que as moléculas AI-11 são da classe IgG1.

Como se observa de um exame à Figura 3, AI-10 e AI-11 imunorreagem ambas com apo A-I. Os valores da Figura 3 ilustram ainda que a imunorreacção de AI-10 ou de AI-11 com apo A-I ou com HDL não interfere com a imunorreacção do outro com esse antígeno.

Os estudos de ligação usando ^{125}I -HDL e ^{125}I -apo A-I foram efectuados usando técnicas de RIA semelhantes às descritas na generalidade em Curtiss et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 2982-2993. Os resultados desses estudos são apresentados no

-32-

Quadro 1, adiante, em termos de percentagens de radioactividade total precipitável por ácido tricloroacético (TCA)

QUADRO 1

Imunorreactividade de AI-10 e AI-11

<u>Moléculas¹</u> <u>paratópicas</u>	<u>Ligação máxima de antígeno (%)</u>	
	<u>¹²⁵I-HDL²</u>	<u>¹²⁵I-Apo A-I²</u>
AI-10 como:		
Sobrenadante	29,2	90,3
Ascite	92,6	—
Ascite por FPLC	86,0	70,2
AI-II como:		
Sobrenadante	88,6	42,0
Ascite	100,0	49,0
Ascite por FPLC	93,0	60,4

¹ Foram usadas moléculas paratópicas em fase fluída a partir de sobrenadante de cultura de células de hibridoma (Sobrenadante), fluído ascítico de rato (Ascite) e fluído ascítico purificado por cromatografia líquida rápida de proteína (ascite por FPLC).

² Percentagem de radioactividade precipitável por TCA.

Os valores do quadro ilustram a ligação relativamente elevada de AI-10 e AI-11 globais a HDL radiomarcada no ensaio de fase fluído utilizado. Estes valores reflectem também a instabilidade relativa da apo A-I e a resultante baixa ligação à própria apo A-I. Esta instabilidade relativa de apolipoproteína A-I criou a necessidade de utilização de HDL como padrão secundário no ensaio de apo A-I, como se discutirá mais adiante. Os valores anteriores mostram também uma ligação relativa



-33-

mente mais baixa de AI-11 a apo A-I em comparação com a ligação de AI-11 a partículas de HDL. No entanto, uma comparação entre valores obtidos utilizando o método ELISA para apo A-I com os valores obtidos por outras técnicas mais laboriosas indicam que o método ELISA detecta, quantitativamente, substancialmente toda a apolipoproteína A-I (HDL) presente nas amostras ensaiadas.

C. Marcador do Metabolismo Anormal de Lipidos

Como se observou anteriormente, vários estudos mostraram que existe uma correlação entre níveis elevados de LDL com níveis relativamente baixos de HDL e metabolismo anormal de lipidos conduzindo a CAD e assim a um risco aumentado da mesma. O metabolismo anormal de lipidos é também importante para se seguir o decurso da doença em pessoas às quais se diagnosticou CAD. Contudo, estes estudos não proporcionaram um marcador e uma linha de separação nítida entre pessoas normais e pessoas exibindo metabolismo anormal de lipidos.

Assim por exemplo, Kottke et al. (1986) Mayo Clin. Proc. 61:313-320 mediram em machos os níveis de apolipoproteínas A-I, A-II e B e colesterol de HDL e de triglicéridos, no soro, em função da idade e verificou que era necessária a utilização destas seis variáveis para distinguir com rigor os pacientes com CAD dos controlos assintomáticos. Estes investigadores utilizaram radio-imunoensaios para as suas determinações de apolipoproteínas.

Para a medição de valores de apo A-I por RIA Kottke et al. utilizaram anticorpos policlonais, um tempo de manutenção da amostra de anticorpo de 16 horas e um tratamento de desmascaramento com detergente. Foi utilizado um anticorpo monoclonal para a medição de apo B em RIA. Kottke et al. apresentaram valores médios de apo A-I no soro para pacientes normais e com CAD que não ultrapassam um desvio padrão. Os seus valores para apo B média no soro entre estes dois grupos ultrapassavam um desvio padrão. Estes investigadores não referiram uma razão dos seus valores para apo B e apo A-I.

-34-

Bentzen et al. (1982) Clin. Chem. 28:1951-1956, referiram ainda a utilização de uma razão entre colesterol de beta-lipoproteína (Colesterol de LDL) e colesterol de alfa-lipoproteína (colesterol de HDL) como marcador para indicar o risco que o paciente corre de ter apoplexia ou doença coronária do coração, comparando com a utilização do valor de colesterol de HDL sozinho. Evidentemente os valores de colesterol de lipoproteína são diferentes dos de LDL e apo B-100 ou dos de HDL e apo A-I, e o método usado por aqueles especialistas, baseado em cromatografia de afinidade em heparina-agarose, é bastante diferente do usado aqui.

II. O Processo Melhorado

De acordo com o presente invento a razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I numa amostra de sangue líquido é usada como marcador para o metabolismo anormal de lipídios em pessoas que não foram identificadas como possuidoras da doença e também para os pacientes a quem se diagnosticou CAD. Logo que a CAD ou o metabolismo anormal de lipídios é identificado pelo processo de ensaio a pessoa é geralmente tratada por terapia convencional, como por exemplo por exercício, dieta ou drogas específicas, como se conhece.

Neste processo utiliza-se uma amostra de sangue líquido. As amostras podem ser quer de plasma quer de soro uma vez que os resultados obtidos usando qualquer uma delas são estatisticamente não diferenciáveis. De facto, alguns resultados, referidos em seguida, usando o método foram obtidos usando valores médios obtidos em ensaios tanto com soro como com plasma. Independentemente de se usar plasma ou soro, a amostra de sangue líquido é preferivelmente obtida de pessoas que jejuaram durante pelo menos doze horas como se conhece na técnica. Esta amostra de sangue é referida como amostra "após jejum".

Foi surpreendente puderem obter-se resultados rigorosos e precisos utilizando os presentes processos ELISA com uma amostra de sangue líquido, como soro ou plasma, porque estes materiais para amostra contêm proteínas, lipídios e outros compostos



-35-

que se esperaria interferissem no ensaio. Ver por exemplo, Maggio, Enzyme-Immunoassay, CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, 1980, página 65.

No processo melhorado, deste invento, a amostra de sangue é dividida em pelo menos duas alíquotas. Uma alíquota de amostra é utilizada para a determinação de apo B-100 e a outra para a determinação de apo A-I.

Começando com a análise para a apolipoproteína B-100, forma-se uma primeira mistura de fases sólida-líquida misturando uma quantidade predeterminada de uma primeira alíquota de amostra de sangue líquido com um suporte sólido que consiste essencialmente numa matriz sólida possuindo primeiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida que imunorreagem com apo B-100. Essas primeiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida estão presentes em excesso relativamente à quantidade de apo B-100 prevista para a amostra e são segregadas por um dos hibridomas com os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746. Os locais de ligação não específica de proteína na superfície desse suporte sólido são bloqueados antes dessa mistura.

Essa primeira mistura de fases sólida-líquida é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado que é suficiente para que as primeiras moléculas paratópicas imunorreajam com a apolipoproteína B-100 presente na alíquota de amostra e formem um imunorreagente ligado à fase sólida que contém substancialmente toda a apolipoproteína B-100 presente na alíquota de amostra.

A apo B-100 da primeira alíquota de amostra é também misturada com segundas moléculas paratópicas monoclonais de fase líquida que imunorreagem com apolipoproteína B-100 para formar uma segunda mistura. Estas segundas moléculas paratópicas monoclonais são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746 mas não são as utilizadas na primeira mistura mencionada. Essas segundas moléculas paratópicas são também operativamente ligadas a um meio indicador enzimático.

-36-

A segunda mistura é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado suficiente para que as segundas moléculas paratópicas ligadas a uma enzima formem um imunorreagente que contém substancialmente toda a apolipoproteína B-100 na alíquota de amostra.

As fases sólida e líquida que resultam da mistura de ambas as moléculas paratópicas e da formação de imunorreagentes entre as moléculas paratópicas e apo B-100 são separadas, por exemplo, por lavagem e determina-se a quantidade de imunorreagente, contendo apolipoproteína B-100 ligada a um meio indicador, presente na fase sólida separada. Em virtude de cada uma das duas moléculas paratópicas monoclonais imunorreagir com essencialmente toda a apo B-100 presente na alíquota de amostra e porque pelo menos uma das moléculas paratópicas imunorreage com um epítipo conservado que não é reactivo cruzadamente, em apo B-100, a determinação da quantidade de apo B-100 ligada à enzima, no imunorreagente, proporciona a determinação da quantidade de apo B-100 presente na alíquota de amostra. A quantidade de apolipoproteína B-100 por unidade de volume de amostra pode ser facilmente calculada conhecendo o volume da quantidade predeterminada de alíquota de amostra de sangue líquido, originalmente utilizada.

A quantidade de apolipoproteína A-I é determinada usando uma segunda quantidade predeterminada de alíquota de amostra de sangue líquido. Contrariamente aos procedimentos utilizados por outros investigadores, à segunda alíquota de amostra de sangue líquido que não sofreu tratamento de desmascaramento como é usual na medição de apo A-I.

Seguem-se passos análogos aos descritos anteriormente para a apolipoproteína B-100 com a excepção de as terceiras e quartas moléculas paratópicas monoclonais segregadas por um dos hibridomas com os números de acesso ATCC HB 9200 ou HB 9201 serem utilizadas na segunda alíquota de amostra de sangue. Mantendo a analogia com os passos anteriormente descritos, misturaram-se terceiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida com uma segunda amostra de sangue, para formar uma



-37-

terceira mistura de fases sólida-líquida, mantendo-se essa terceira mistura de fases sólida-líquida como se descreveu anteriormente, para formar um imunorreagente ligado à fase sólida que contém essencialmente toda a apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra.

A apolipoproteína A-I na segunda alíquota de amostra é ainda misturada com moléculas paratópicas monoclonais de fase líquida, discutidas anteriormente, que não são as ligadas à matriz sólida e que estão operativamente ligadas a um meio indicador enzimático, para formar uma quarta mistura. Esta quarta mistura é mantida como se descreveu anteriormente, durante um período de tempo suficiente para que as quartas moléculas paratópicas monoclonais ligadas à enzima formem um imunorreagente com essencialmente toda a apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra.

As fases sólida e líquida que resultam dos passos de mistura e de manutenção são separadas e determina-se a quantidade de imunorreagente, contendo apolipoproteína A-I ligada a um meio indicador enzimático, presente na fase sólida separada, proporcionando assim a determinação da quantidade de apolipoproteína A-I na alíquota de amostra e por unidade de volume, como se discutiu anteriormente.

Cada um dos ensaios relativos à apo B-100 e apo A-I discutidos anteriormente pode ser realizado efectuando sequencialmente cada um dos passos de mistura e manutenção em cada ensaio, ou podem efectuar-se essencialmente em simultâneo os dois passos de mistura em cada ensaio, efectuando-se os dois passos de manutenção, em cada ensaio, em conjunto.

Quando se efectuam os passos sequencialmente é preferível que as moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida sejam misturadas e que se mantenha a mistura formada antes da mistura das moléculas paratópicas ligadas a um meio indicador enzimático e da manutenção desta mistura resultante. Quando se seguem os passos sequenciais preferidos, é ainda preferível separarem-se as fases líquida e sólida formadas e lavar-se a fase, sólida, para ajudar a assegurar a separação, an

-38-

tes de se misturarem as moléculas paratópicas ligadas a um meio indicador enzimático líquido, com a fase sólida separada e de se manter a mistura.

É ainda de notar que as moléculas paratópicas ligadas a um meio indicador enzimático podem ser as primeiras a ser misturadas com a alíquota de amostra apropriada. Quando se utiliza este procedimento para realizar o processo não existe separação de fases antes da mistura das moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida.

Preferivelmente para o ensaio de apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I, misturam-se separadamente e essencialmente em simultâneo as moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida, a alíquota de amostra de sangue e as moléculas paratópicas ligadas a um meio indicador enzimático e mantém-se em conjunto cada uma das misturas de fases sólida-líquida resultantes. Assim, cada mistura é mantida durante um período de tempo suficiente para que as duas moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida separada formem imunorreagentes ligados à fase sólida com substancialmente toda a apo B-100 e apo A-I, respectivamente, e para que as duas moléculas paratópicas ligadas a um meio indicador enzimático de fase líquida imunoreajam também com essencialmente toda a apo B-100 e apo A-I, respectivamente, nas respectivas alíquotas de amostra. Os imunorreagentes assim formados são designados por imunorreagentes sanduíche ligados à fase sólida. A fase líquida também está presente.

Obtêm-se resultados semelhantes usando nos respectivos ensaios, como moléculas paratópicas ligadas à fase sólida, qualquer das moléculas paratópicas monoclonais dos dois grupos de moléculas paratópicas. No entanto, a maior parte do trabalho que se discute aqui foi realizado usando as moléculas segregadas pelo hibridoma com o número de acesso ao ATCC HB 8746 (MB47) ligadas à matriz sólida quando se ensaiou apolipoproteína B-100 e as moléculas segregadas pelo hibridoma com o número de acesso ao ATCC HB 9200 (AI-10) ligadas à matriz de fase sólida quando se ensaiou apolipoproteína A-I. Além disso, é par

-39-

ticularmente preferido usar MB47 como moléculas paratópicas ligadas à fase sólida uma vez que estas moléculas não imunorream com apo B-48 que pode estar presente nos quilomicrons de amostras de sangue recolhidas sem jejum prévio ou em pessoas com níveis anormalmente elevados de quilomicrons. Assim, a ligação de quilomicrons ao suporte sólido, poderia interferir, em virtude do seu grande tamanho, com a ligação adicional de essencialmente toda a apo B-100 (LDL), mesmo quando a quantidade de moléculas paratópicas ligadas à fase sólida estivessem em excesso em relação a apo B-100 na amostra ensaiada.

Exemplos de matrizes sólidas úteis para os processos anteriores são bastante conhecidos na especialidade e incluem uma matriz sólida como placas de microtitulação com 96 cavidades vendidas sob a designação Falcon Microtest III Flexible Assay Plates (Falcon Plastics, Oxnard, CA) ou uma fita de microtitulação contendo doze cavidades dispostas numa fila, como as fitas vendidas sob a designação Immulon I e II (Dynatech, Alexandria, VA). As fitas ou placas de microtitulação são feitas de um material plástico transparente, preferivelmente poli(cloreto de vinilo) ou poliestireno. Matrizes sólidas alternativas para utilização num processo deste invento, descrito anteriormente, incluem esferas de poliestireno com um diâmetro de cerca de 1 micron a cerca de 5 milímetros, disponíveis em Abbott Laboratories, North Chicago, IL; tubos, barras ou almofadas de poliestireno, de qualquer tamanho conveniente; e látex de poliestireno cujas partículas de poliestireno têm um tamanho de cerca de 1 micron e podem ser separadas centrifugamente do restante do látex.

A matriz sólida pode também ser feita de uma variedade de materiais tal como dextrano reticulado p.e. Sephadex G-25, -50, -100, -200 e semelhantes vendidos por Pharmacia Fine Chemicals de Piscataway, NJ, agarose e agarose reticulada, p.e. Sepharose 6B, CL6B, 4B, CL46 e semelhantes vendidas também por Pharmacia Fine Chemicals.

O meio indicador enzimático é ligado directamente a uma molécula paratópica útil neste invento, para formar um conjugado

-40-

do. Note-se que as moléculas de enzima úteis ligadas a uma molécula paratópica estão operativamente ligadas. Assim, nem a função da enzima é substancialmente afectada pela ligação ou pela molécula paratópica nem a função da molécula paratópica monoclonal, à qual a enzima está ligada, é substancialmente afectada por essa ligação ou pela presença da enzima.

O meio indicador enzimático é uma enzima biologicamente activa como por exemplo peroxidase de rábano (HRPO) ou glucose-oxidase ou semelhante. Como se sabe, quando o meio indicador é uma enzima como a HRPO ou a glucose-oxidase são necessários reagentes adicionais para se visualizar a formação do complexo anticorpo-antígeno. Estes reagentes adicionais para HRPO incluem peróxido de hidrogénio e um precursor corante de oxidação como diaminobenzidina. Os reagentes adicionais úteis para glucose-oxidase incluem glucose e 2,2'-azino-di-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

As técnicas para ligar operativamente uma enzima a uma molécula paratópica, para formarem um conjugado, são conhecidas da técnica. Exemplos de técnicas são discutidos em Maggio, Enzyme-Immunoassay, Capítulo 4 por Kabakoff, CRC Press, Boca Raton, FL (1980), páginas 71-104.

As moléculas paratópicas monoclonais podem ser utilizadas no estado em que são obtidas a partir dos sobrenadantes de hibridoma ou como ascites. No entanto, é preferível utilizar-se moléculas paratópicas purificadas.

São conhecidos na técnica vários meios de purificação de moléculas paratópicas e que tipicamente utilizam técnicas cromatográficas. A técnica de purificação de eleição neste trabalho é a cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC).

Os conjugados de molécula paratópica ligada a enzima são fornecidos às misturas na fase fluída. Estas moléculas são geralmente dissolvidas numa composição aquosa. As composições típicas contêm sais tampão como é o caso dos exemplos de composições contendo anticorpo monoclonal purificado, usados aqui, que incluem como diluente, solução salina tamponada com

-41-

fosfato (PBS). É também útil o fluido ascítico diluído.

Como se referiu anteriormente, os locais de ligação não específica de proteína, na superfície do suporte de fase sólida estão bloqueados. Assim, as moléculas paratópicas ligadas à fase sólida são ligadas por adsorção ou por outros meios conhecidos de fixação à matriz sólida. Em seguida, uma solução aquosa de uma proteína que não interfira com o ensaio, p.e. albumina de soro bovino, de cavalo ou outro, e que também não esteja constaminada com apo B-100 ou apo A-I humana é misturada com a fase sólida para adsorver a proteína misturada à superfície do suporte sólido contendo molécula paratópica, nos locais de ligação da proteína, à superfície, que não estão ocupados pela molécula paratópica monoclonal.

Uma solução aquosa de proteína típica contém cerca de 3 a cerca de 10 por cento em peso de albumina de soro bovino em PBS a um valor de pH de 7,1-7,5. A mistura de solução aquosa de proteína-suporte sólido é tipicamente mantida durante um período de tempo de pelo menos uma hora, a 37° graus C e a fase sólida resultante é em seguida lavada para se libertar da proteína não ligada.

A amostra de sangue líquido pode ser plasma ou soro, como já acima se referiu. Esta amostra para a determinação de apo A-I é preferivelmente diluída a cerca de 1:2500 - 1:20000 e mais preferivelmente a cerca de 1:5000, antes de se usar, para se obterem resultados lineares nos ensaios especificamente descritos adiante. Para a determinação de apo B-100, a amostra é preferivelmente diluída a cerca de 1:500 - 1:5000, e mais preferivelmente a cerca de 1:1000. A utilização de uma diluição menor pode fornecer à mistura demasiado antígeno de apolipoproteína e prejudicar a linearidade dos resultados do ensaio assim como baixar ou abolir o excesso de moléculas paratópicas ligadas à fase sólida em relação ao antígeno misturado. A utilização de diluições superiores a cerca de 1:20000 tende a diminuir a precisão.

Os tempos de manutenção utilizados podem variar bastante com pouca variância nos resultados, desde que se utilize um

-42-

tempo mínimo de cerca de 30 minutos à temperatura ambiente (cerca de 20-25 graus C). Quando se pretende utilizar um tempo de manutenção mínimo de 30 minutos, é preferível que a mistura em manutenção seja agitada durante aquele período de tempo para assegurar uma imunorreacção essencialmente completa entre o antígeno de apolipoproteína e as moléculas paratópicas monoclonais. Quando se usam tempos de manutenção maiores, uma ou mais horas à temperatura ambiente, não é necessária agitação. A agitação desejada pode ser prontamente fornecida por um agitador giratório operado a cerca de 100 rpm. Cada um dos ensaios usados neste processo pode ser realizado usando tempos de manutenção da mistura de amostra-molécula paratópica de cerca de 30 minutos a cerca de 60 minutos às temperaturas ambientes.

A quantidade de antígeno de apolipoproteína presente no imunorreagente ensaiado é determinada por mistura da fase sólida separada, contendo apolipoproteína ligada a enzima com uma quantidade predeterminada de reagente ou reagentes de visualização. Quando se utiliza HRPO como meio indicador enzimático, os reagentes de visualização tal como peróxido de hidrogénio e um precursor corante de oxidação, como o-fenilenodiamina (OPD), presentes num meio aquoso, são misturados com o imunorreagente ligado à fase sólida separada. A mistura que se forma é mantida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado de pelo menos cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente para que a cor se desenvolva. O desenvolvimento da cor é em seguida parado por mistura de um reagente de paragem como o ácido sulfúrico. Em seguida lê-se a densidade óptica da composição e compara-se com o valor da curva padrão e determina-se, como é conhecido, a quantidade de apolipoproteína.

Assim, uma vez que o suporte sólido e a amostra de sangue líquido estejam preparados, pode realizar-se cada ensaio à temperatura ambiente num período de tempo de cerca de uma hora; i.e. um período de manutenção de 30 minutos com agitação para misturas formadas entre as moléculas paratópicas e a alíquota de amostra e mais um período de manutenção de 30 minutos para



-43-

a cor se desenvolver. De facto, não há necessidade de preparar o suporte sólido imediatamente antes de cada utilização, mas pelo contrário estes suportes, como aqui se descrevem, podem ser preparados e armazenados húmidos e tapados, sob as condições usuais de refrigeração, durante um período de pelo menos um mês, antes da utilização.

Cada um dos ensaios relativos a apo B-100 e apo A-I utiliza um padrão com o qual se comparam os valores de densidade óptica obtidos nos ELISA, para calcular as concentrações dessas duas apolipoproteínas. Os dois ensaios utilizam padrões secundários. Isto é, em vez de utilizarem apo B-100 e apo A-I como padrões, os ensaios utilizam como padrões LDL e HDL humanas, respectivamente. Utilizam-se os padrões secundários em virtude da relativa instabilidade das apolipoproteínas primárias durante a armazenagem. Kottke e colaboradores verificaram também a degradação de apo A-I purificada, quando usada como padrão primário e utilizaram um padrão secundário nos seus RIA com soro policlonal para determinação de apo A-I. Au et al. (1986) Clin. Chem. 32:1394-1397.

Os padrões secundários são geralmente fornecidos sob a forma de LDL e HDL liofilizadas de plasma humano combinado, recolhido de indivíduos que jejuaram, e são reconstituídos antes de serem utilizados. Cada um dos padrões é ele próprio padronizado em relação aos padrões primários de apo B-100 como LDL e apo A-I como HDL. Exemplos de procedimentos são ilustrados pela apolipoproteína B-100 (LDL) e apolipoproteína A-I (HDL) na Secção de Materiais e Processos.

III. Sistemas de Diagnóstico

O presente invento contempla também um sistema de diagnóstico, geralmente na forma de conjunto, que pode ser utilizado na realização dos processos descritos anteriormente. O sistema inclui, em recipientes separados, pelo menos as moléculas paratópicas monoclonais MB47 e MB24, descritas anteriormente, que imunorreagem com apo B-100 e AI-10 e AI-11 que imunorreagem com apo A-I. Uma das moléculas paratópicas de cada par; i.e. uma de entre MB47 e MB24 e uma de entre AI-10 e AI-11, é ligada

-44-

a um meio indicador enzimático e forma um conjugado. As embalagens contêm uma quantidade de cada uma destas moléculas paratópicas, suficiente para realizar pelo menos um ensaio para o marcador de metabolismo anormal de lipídios.

Preferivelmente, o sistema contém dois suportes sólidos, cada um dos quais consiste essencialmente numa matriz sólida com moléculas paratópicas monoclonais ligadas que imunorreagem com apo B-100 ou com apo A-I, respectivamente, e cujos locais de ligação não específica da proteína, à superfície, estão bloqueados e contém ainda dois conjugados de molécula paratópica monoclonal ligada a enzima, embalados separadamente, que imunorreagem com, respectivamente, apo B-100 e apo A-I. Utilizam-se as mesmas quatro moléculas paratópicas que se discutiram acima.

As matrizes de fase sólida do sistema de diagnóstico anterior podem ser quaisquer das matrizes de fase sólida discutidas anteriormente, embora as duas matrizes sejam, preferivelmente, do mesmo tipo. São particularmente preferidas cavidades de microtitulação como as das fitas com 12 cavidades e as das placas com 96 cavidades descritas anteriormente. Os locais de ligação não específica nos suportes sólidos estão bloqueados, como se discutiu anteriormente.

As matrizes sólidas constituem um recipiente para as moléculas paratópicas monoclonais ligadas desta concretização. Os recipientes típicos para as moléculas paratópicas monoclonais ligadas a uma enzima são frascos ou garrafas feitos de vidro ou de um plástico como o polietileno ou o polipropileno.

Usando como exemplo de matriz sólida, uma placa de microtitulação e como moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida, os anticorpos monoclonais globais MB47 e AI-10, como amostra de sangue líquido, soro e anticorpos monoclonais globais MB24 e AI-11 ligados a HRPQ, um exemplo de sistema de diagnóstico mais preferível, sob a forma de conjunto, inclui:

a) um suporte sólido que consiste essencialmente numa placa de microtitulação possuindo anticorpo monoclonal MB47 que lhe está ligado, numa quantidade suficiente para realizar



-45-

um ensaio de uma alíquota de amostra de soro para determinar a quantidade de apolipoproteína B-100 presente, e cujos locais de ligação não específica de proteína, na superfície, estão bloqueados;

b) um suporte sólido que consiste essencialmente numa placa de microtitulação possuindo anticorpo monoclonal AI-10 que lhe está ligado, numa quantidade suficiente para realizar um ensaio de uma alíquota de amostra de soro para determinar a quantidade de apolipoproteína A-I presente, e cujos locais de ligação não específica de proteína, na superfície, estão bloqueados;

c) uma embalagem separada que contém uma solução aquosa contendo anticorpo monoclonal MB24 ligado a HRPD que está presente numa quantidade suficiente para realizar um ensaio de uma alíquota de amostra de soro para determinar a quantidade de apo B-100 presente; e

d) uma embalagem separada que contém uma solução aquosa contendo anticorpo monoclonal AI-11, ligado a HRPD, que está presente numa quantidade suficiente para realizar um ensaio de uma alíquota de amostra de soro para determinar a quantidade de apo A-I presente.

Preferivelmente, um sistema de diagnóstico inclui os quatro componentes anteriores (a-d) e um ou mais dos seguintes: (i) uma fonte de peróxido de hidrogénio de concentração conhecida; (ii) um precursor corante de oxidação visualizador tal como OPD; (iii) uma solução de um agente de paragem, tal como ácido sulfúrico 4N, para parar a reacção de formação de cor; (iv) um ou mais tampões na forma seca ou líquida para utilização no ensaio; (v) materiais para preparação das curvas referência de padrão; e (vi) instruções para a realização dos ensaios. Cada um dos componentes enumerados imediatamente acima está presente no sistema de diagnóstico numa quantidade suficiente para realizar pelo menos um ensaio, sendo esses componentes embalados separadamente como é apropriado.

-46-

IV. Resultados

Os resultados obtidos usando o método de ensaio descrito anteriormente e em maior detalhe em seguida na Seção de Materiais e Processos são discutidos abaixo. Utilizam-se como matrizes sólidas cavidades de placas de microtitulação com 96 cavidades. Utilizaram-se os anticorpos monoclonais globais MB47 e AI-10 como primeiras e terceiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida, nos ensaios de, respectivamente, apolipoproteína B-100 e A-I. Os locais de ligação não específica à proteína, nas superfícies do suporte sólido, foram bloqueados com BSA. Utilizaram-se anticorpos globais MB24 e AI-11 ligados a HRPO, como segundas e quartas moléculas paratópicas monoclonais nos ensaios de, respectivamente, apolipoproteína B-100 e A-I, sendo OPD o precursor corante de oxidação visualizador.

Os ensaios relativos a apo B-100 e apo A-I foram realizados em 37 pessoas sem história de CAD. Essas pessoas são denominadas "normais".

Obtiveram-se os valores usando como amostras de sangue líquido, plasma e soro diluídos. Verificou-se que esses valores não apresentavam diferenças estatisticamente significantes relativamente às duas proveniências de amostras e para utilização fez-se a sua média.

No Quadro 2, em seguida, apresenta-se um compósito dos resultados para os "normais", separadamente para os 23 homens e 14 mulheres e como valores "combinados".

Quadro 2

Níveis normais de apolipoproteína

Apolipoproteína A-I¹

<u>Machos</u>	<u>Fêmeas</u>	<u>Combinados</u>
n = 23	n = 14	n = 37
média = 143	média = 152	média = 147
D.P. = 26,5	D.P. = 10,7	D.P. = 22,0
intervalo	intervalo	intervalo
com D.P. = 116-170	com D.P. = 141-163	com D.P. = 125-169

Apolipoproteína B-100

<u>Machos</u>	<u>Fêmeas</u>	<u>Combinados</u>
n = 23	n = 14	n = 37
média = 78,0	média = 77,5	média = 77,8
D.P. = 17,6	D.P. = 20,6	D.P. = 18,8
intervalo	intervalo	intervalo
com D.P. = 60,4-95,6	com D.P. = 56,9-98,1	com D.P. = 59,0-96,6

Razão entre apolipoproteína
B-100 e apolipoproteína A-I

<u>Machos¹</u>	<u>Fêmeas¹</u>	<u>Combinados¹</u>
n = 23	n = 14	n = 37
média = 0,56	média = 0,51	média = 0,54
D.P. = 0,16	D.P. = 0,14	D.P. = 0,15
intervalo	intervalo	intervalo
com D.P. = 0,40-0,72	com D.P. = 0,37-0,65	com D.P. = 0,39-0,69

¹"n" é o número de pessoas em cada estudo. "Média" é o valor médio obtido, expresso em miligramas por decilitro para a apo A-I e a apo B-100 e na forma de parâmetro sem unidades para a razão. "D.P." é o valor de um desvio padrão da média. "Intervalo com D.P." é a amplitude de um desvio padrão para cada lado



da média. Os ensaios foram realizados como descrito na Secção de Materiais e Processos.

De um modo semelhante obtiveram-se valores usando o soro e plasma de 42 machos que estavam clinicamente identificados como possuidores de CAD. No Quadro 3 abaixo apresenta-se um compósito desses valores.

Quadro 3

Níveis de apolipoproteína em macho com CAD¹

Apolipoproteína A-I

n = 42
média = 110
D.P. = 28,8
intervalo com D.P. = 81,2-139

Apolipoproteína B-100

n = 42
média = 112
D.P. = 27,8
intervalo com D.P. = 84,2-140

Razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I

n = 42
média = 1,08
D.P. = 0,38
intervalo com D.P. = 0,70-1,46

¹ Ver nota de pé de página do Quadro 2

Na revisão dos valores anteriores e sua comparação com os valores referidos em Kottke et al. (1986) Mayo Clin. Proc., 61:313-320 sobressaiem várias características.

-49-

Uma das características é a de que os valores médios para os pacientes normais e com CAD relativamente à apo A-I no ensaio anterior são semelhantes aos referidos por Kottke et al.. Obtiveram-se desvios padrão semelhantes nos dois tipos de ensaio.

Esta similaridade de resultados foi surpreendente por diversas razões. Em primeiro lugar, os investigadores Kottke et al. usaram um tratamento de desmascaramento com detergente (Tween 20) para os seus ensaios, ao passo que as presentes amostras de sangue líquido não sofreram esses tratamentos. Em segundo lugar o grupo de Kottke et al. utilizou um radio-ensaio que é geralmente considerado mais rigoroso e preciso do que um ELISA como se usa aqui. Ver Voller et al. (1976) Bull. World Health Organ., 53:55-65. Em terceiro lugar, Kottke et al. usaram anticorpos policlonais os quais são normalmente considerados como capazes de melhor imunorreacção, enquanto que aqui se usaram anticorpos monoclonais. Em quarto lugar, o grupo de Kottke et al. utilizou um tempo de manutenção de 16 horas à temperatura ambiente para a imunorreacção dos seus anticorpos policlonais com apo A-I, enquanto que o período de tempo utilizado aqui foi de 30 minutos à temperatura ambiente.

Outra característica é a de que enquanto os valores médios para apo B-100 para pacientes normais e com CAD são ligeiramente inferiores nos presentes ensaios quando comparados com os respectivos valores médios de Kottke et al., os desvios padrão encontrados nos presentes ensaios são bastante inferiores aos referidos por Kottke et al.. Tanto Kottke et al. como os presentes inventores utilizaram nas suas análises anticorpos monoclonais embora Kottke et al. tivessem novamente utilizado RIA enquanto que aqui se utilizou ELISA.

Fizeram-se também comparações usando ensaios RID disponíveis no comércio para apo B-100 em conjunto com o ensaio para apo A-I descrito aqui, para se obterem razões entre apo B-100 e apo A-I. No Quadro 4 que se segue apresentam-se sumários desses resultados para as razões em pacientes normais e com CAD. Neste estudo usaram-se alíquotas de uma amostra de



sangue de cada um dos 20 pacientes normais e dos 40 pacientes com CAD para se obterem controles internos.

Quadro 4

Razões entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I
Obtidas por métodos diferentes

Normais¹

<u>Presente</u> <u>invenção</u> ²	<u>RID I</u> ^{2,3}	<u>RID II</u> ^{2,4}
n = 20	n = 20	n = 20
média = 0,53	média = 0,74	média = 0,58
D.P. = 0,12	D.P. = 0,23	D.P. = 0,17
intervalo com D.P. = 0,41-0,65	intervalo com D.P. = 0,51-0,97	intervalo com D.P. = 0,41- -0,75

Pacientes com CAD⁵

<u>Presente</u> <u>invenção</u> ²	<u>RID I</u> ^{2,3}	<u>RID II</u> ^{2,4}
n = 40	n = 40	n = 40
média = 1,07	média = 1,26	média = 1,01
D.P. = 0,39	D.P. = 0,40	D.P. = 0,43
intervalo com D.P. = 0,68-1,46	intervalo com D.P. = 0,86-1,66	intervalo com D.P. = 0,58- -1,44

¹ Valores obtidos a partir de amostras de sangue de machos e fêmeas.

² Ver nota de pé de página do Quadro 2.

³ RID conjunto vendido por Calbiochem-Behring de San Diego, CA usado de acordo com as instruções da embalagem com plasma.

⁴ RID conjunto vendido por Tago de Burlingame, CA usado de acordo com as instruções da embalagem com plasma.

⁵ Valores obtidos de machos com manifestações clínicas de CAD.

O exame dos valores do Quadro anterior mostra que se obtiveram ultrapassagens inaceitavelmente grandes nos intervalos com desvio padrão da razão quando se obtiveram valores de marcador para pessoas normais e pacientes com CAD, usando um dos dois conjuntos RID disponíveis do comércio para o ensaio de apo B-100, comparados com os obtidos usando o presente ensaio para apo B-100 em conjunção com o presente ensaio para apo A-I.

IV. Materiais e Processos

A. Preparação e Purificação da Molécula Paratópica

1. Isolamento de Imunoglobulina Anti-Apo A-I

Obtiveram-se fluidos ascíticos de ratinhos Balb/c com 10 semanas de idade que tinham sido primo-immunoadivados com 0,3 ml de óleo mineral e injectados intraperitonealmente com $3-50 \times 10^5$ células de hibridoma. O tempo médio para o desenvolvimento da ascite foi de 9 dias. Depois da clarificação por centrifugação a 15000xg durante 15 horas a 23 graus C, reuniram-se os fluidos ascíticos e armazenaram-se congelados a -20 graus C.

Prepararam-se os anticorpos AI-10 e AI-11 isolados por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC) usando uma coluna de permuta aniônica Pharmacia Mono Q HR5/5 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) usando um gradiente de NaCl 0-0,5 M em Tris 10 mM, pH 8,0. Concentraram-se os Mabs purificados usando uma célula Amicon de ultrafiltração agitada (Danvers, MA; membrana PM 30) a uma concentração de 1 miligrama por mililitro (mg/ml), dializaram-se em PBS (solução salina tamponada com fosfato pH 7,2) e armazenaram-se a -70 graus C.

2. Isolamento de Imunoglobina Anti-Apo B-100

Obtiveram-se fluidos ascíticos contendo moléculas paratópicas anti-apo B-100, úteis aqui, de ratinhos Balb/c com 10 semanas de idade, que tinham sido primo-immunoadivados com 0,3

-52-

ml de óleo mineral e injectados intraperitonealmente com $3-50 \times 10^5$ células de hibridoma. O tempo médio de desenvolvimento de ascites foi de 12 dias. Depois da clarificação por centrifugação a $15.000 \times g$ durante 1 hora a 4 graus C, reuniram-se os fluidos ascíticos e armazenaram-se congelados a -20 graus C.

Preparou-se o anticorpo isolado MB47 por cromatografia dos fluidos ascíticos do hibridoma monoclonal numa coluna de proteína A-Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ). O anticorpo foi eluído da coluna com ácido acético 0,1 molar (M).

Prepararam-se também moléculas paratópicas isoladas por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC) de um fluido ascítico de hibridoma monoclonal numa coluna de permuta aniónica Pharmacia Mono Q HR 5/5 num sistema de FPLC de Pharmacia usando um gradiente de NaCl 0-0,5M em Tris 10 mM, pH 8,0 e seguindo as directrizes fornecidas com a coluna.

B. Caracterização dos Anticorpos de Hibridomas

O conteúdo total de gama-globulina (Ig) de cada grupo de fluido ascítico foi obtido por electroforese de amostras de 1-3 ml de fitas de acetato de celulose em tampão veronal 75 mM, a um valor de pH de 8,6 durante 45 minutos a 200 milivolt (mV). Quantificou-se a percentagem de Ig do total de proteínas por análise densiométrica dos geles corados com Ponceau S e determinou-se o total de proteínas pelos métodos de Lowry modificados como se discutiu anteriormente.

Identificaram-se cadeias leves e pesadas de Ig murina para MB47 e MB24 por difusão dupla em agarose a 0,9 por cento. Fizeram-se reagir dez microlitros de fluido ascítico, a uma diluição adequada, com um volume igual de anti-soro específico de coelho, anti-murino, com cadeias pesadas e leves, a uma diluição adequada (Litton Bionetics, Inc. Charleston, SC). Depois da difusão durante cerca de 15 horas a 20 graus C e lavagem, identificaram-se linhas de precipitina corando com 0,5 por cento de azul brilhante de Coomassie R-250.

Identificaram-se as subclasses de anticorpos monoclonais

-53-

AI-10 e AI-11 usando conjuntos comerciais de imuno-difusão radial disponíveis de Meloy Laboratories, Inc. (Springfield, VA) ou Tago, Inc. (Burlingame, CA). O fluido ascítico foi distribuído numa cavidade em gel de agarose que continha anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b ou anti-IgM. Após um período de tempo específico e predeterminado, sob condições controladas, formou-se um anel visível de precipitina com os anticorpos da classe identificada. O diâmetro do anel é proporcional à concentração de imunoglobulina específica presente no fluido ascítico. Verificou-se que a AI-10 é da classe IgG2a e que a AI-11 é da classe IgG1.

Obtiveram-se os perfis isoelétricos dos anticorpos monoclonais por focalização isoelétrica de amostras de 0,01 ml dos fluidos ascíticos em 0,8 por cento de agarose (EF 802-300, LKB-Produkter AB, Bromma, Suécia) contendo 10 por cento de sorbitol e 2 por cento de anfolina, com um valor de pH na gama de 5-8, durante 150 minutos a uma potência constante de 3 watts. Depois da fixação e secagem, coraram-se os geles com azul brilhante de Coomassie e fotografaram-se.

C. Ensaio Sanduíche

1. ELISA Sanduíche para Apo A-I (HDL)

a. Padrões Primários de Apo A-I:

Quantificação de HDL e de Apolipoproteína A-I Isolada

A fracção de HDL (1,063-1,21 g/ml) foi obtida a partir de plasma humano reunido por técnicas clássicas de ultracentrifugação e foi dializada em PBS. Foi em seguida filtrada esterilmente através duma unidade de filtração com acrodisco de 0,45 micron e armazenada a 4 graus C. Determinou-se o conteúdo em proteína da fracção de HDL por ensaio de proteína de Lowry, modificado, usando BSA como padrão. Efectuaram-se três diluições em duplicado da fracção de HDL para assegurar que as leituras estão numa parte linear da curva padrão. Por exemplo, fizeram-se diluições da fracção de HDL de 1:5, 1:10 e 1:20. A concentração da proteína estava geralmente entre 5 e 10 mg/ml. Para ar-



mazenamento prolongado diluiu-se a fracção de HDL com PBS até uma concentração de proteína de 1-2 mg/ml. Depois da diluição, reconfirmou-se a concentração em proteína pelo ensaio de Lowry a diluições de 1:2, 1:5 e 1:10. Tomaram-se então alíquotas da fracção de HDL diluída e armazenaram-se a 4 graus C.

A apolipoproteína A-I isolada pode ser obtida de numerosas fontes comerciais. Embora o fabricante incluía geralmente uma declaração sobre o conteúdo e pureza da proteína, confirmou-se sempre a concentração de proteína pelo ensaio de Lowry e ajustou-se, se necessário, com base nestes resultados. As diluições da preparação de apo A-I foram efectuadas como se descreveu na secção anterior. Fizeram-se alíquotas da preparação e armazenaram-se da forma sugerida pelo fabricante.

As preparações de HDL e/ou apo A-I foram então ensaiadas como amostras desconhecidas (diluídas de 1:5000) em ELISA para apo A-I (descrito em seguida). Durante um período de cinco dias realizou-se um mínimo de duas placas de ensaio por dia, contendo uma colecção completa de padrões, controlos de qualidade e diluições das preparações de HDL e/ou de apo A-I. Os valores de ELISA obtidos para HDL e/ou apo A-I são concordantes em 20% com o valor do ensaio de proteína de Lowry. Se os valores não concordavam, nos limites estabelecidos, repetia-se o ensaio de Lowry para confirmar a concentração determinada da proteína. Se os valores continuavam discrepantes isto devia-se geralmente a envelhecimento ou contaminação da preparação e portanto ela não era considerada adequada para utilização como padrão primário.

Determinava-se também a pureza do padrão primário por electroforese analítica de dodecil-sulfato de sódico-poliacrilamida gel; SDS-PAGE.

b. Preparação do Padrão Secundário para ELISA de Apo A-I e Determinação de Valores

i. Preparação de Plasma Padrão Reunido e Liofilizado

Recolheu-se plasma ou soro fresco de pelo menos 10 indivíduos normolipidémicos que tinham jejuado durante a noite.

-55-

Realizou-se uma flebotomia usando tubos estéreis contendo EDTA dissódico por venipunctura não traumática. Centrifugaram-se as amostras a 1500xg durante 30 minutos a 4 graus C e transferiu-se o plasma para tubos limpos, hermeticamente rolhados e armazenaram-se a 4 graus C durante não mais de 24 horas. Combinaram-se quantidades iguais de amostras e fizeram-se alíquotas de quantidades de 0,5 ml em frascos wheaton, limpos com ácido, contendo 5 ml de soro e liofilizaram-se durante a noite (cerca de 16-18 horas). Os frascos foram selados e armazenados a 4 graus C.

ii. Reconstituição do Padrão de Plasma Reunido e Liofilizado

Antes da reconstituição deixaram-se os frascos aquecer até à temperatura ambiente. Removeu-se o anel de alumínio e a rolha, libertando lentamente o vácuo do frasco. Usando uma pipeta de precisão, reconstituíram-se os padrões secos reunidos com 0,5 ml de água duas vezes destilada vertendo lentamente a água na superfície dos frascos. Colocaram-se novamente as rolhas e remoinhou-se rapidamente os frascos, 3-4 vezes, e mantiveram-se à temperatura ambiente durante pelo menos 30 minutos. Os padrões não foram sujeitos a vórtice nem agitados vigorosamente, mas apenas sujeitos a remoinho cuidadosamente para assegurar a solubilização completa.

iii. Determinação do Valor de Apo A-I no Padrão Secundário

O valor de apo A-I do padrão secundário liofilizado é determinado no ELISA para apo A-I usando o padrão primário (de HDL ou de apo A-I) como calibrador. O procedimento de ensaio ELISA é aqui descrito.

O padrão secundário liofilizado foi ensaiado como amostra desconhecida, em triplicado e num mínimo de duas placas de ensaio por dia, durante pelo menos 10 dias, dando origem a um mínimo de 20 valores (média dos triplicados). Fez-se a média de todos os valores obtidos para o padrão secundário e determinou-se o valor de apo A-I em miligramas por decilitro (mg/dl).

-56-

Depois de se ter feito a determinação do valor, usou-se o padrão secundário para construir uma curva de padrão que foi ensaiada na mesma placa de ELISA que uma curva de padrão primário, com um conjunto completo de controlos. Ensaíram-se as curvas de padrão primário e secundário num mínimo de 2 placas de ensaio, com 96 cavidades, por dia, durante um período de 5 dias.

Depois de a determinação do valor do padrão secundário ter sido concordante construíram-se as curvas de padrão e ensaiaram-se na mesma placa de ELISA, durante um período de cinco dias (2 placas de ensaio por dia), com o lote de padrão liofilizado geralmente aceite.

c. O Ensaio na generalidade

Fixaram-se moléculas AI-10 isoladas às paredes das cavidades da placa de microtitulação de poliestireno (Nunc-Immuno Plate 1; Irving Scientific, Santa Ana, CA) misturando 0,15 ml de um tampão de bicarbonato de sódio pH 9,0, contendo 5 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) de AI-10, em cada cavidade. Mantiveram-se as placas a 4 graus C durante 18 horas e em seguida lavaram-se 3 vezes com PBS contendo BSA a 0,1 por cento e monolaurato de polioxietileno sorbitano (20) a 0,05% (Tween 20). Os locais de ligação não específica, residuais, foram então bloqueados misturando 0,2 ml de PBS, contendo BSA a 10 por cento, em cada cavidade, mantendo a mistura a 37 graus C durante 1 hora e em seguida lavando. As cavidades preparadas deste modo podem ser usadas até cerca de um mês depois da preparação, se estiverem armazenadas numa câmara humidificada.

Diluiu-se HDL humana em PBS, em concentrações variando de 1,0 a 0,031 $\mu\text{g/ml}$, para se utilizarem como soluções padrão de controlo. Como se salientou anteriormente, nestes ensaios usa-se como padrão HDL humana em vez de apo A-I humana porque se verificou que a apo A-I é relativamente instável quando armazenada, enquanto que a HDL parece ser relativamente mais estável sob armazenamento. Diluiu-se amostras de plasma (ou soro) de 1:5000 em PBS.

-57-

Misturou-se nas cavidades, em triplicado, cinquenta microlitros (μl) de padrão ou de amostra. Cerca de 5 minutos depois misturou-se em cada cavidade 50 μl de PBS contendo moléculas paratópicas AI-11 marcadas com HRPO. As misturas de imunorreacção foram mantidas a 25 graus C durante um período de tempo de 30 minutos. Separou-se então das cavidades, o material não ligado, lavando como se descreveu anteriormente.

Ensaiou-se então a quantidade de imunorreagente sanduíche ligado à fase sólida e contendo marcador HRPO, misturando 0,1 ml de solução de substrato recentemente preparada [água destilada contendo H_2O_2 a 3 por cento e 0,67 mg/ml de o-fenilenodiamina (OPD)]7.

d. ELISA Passo a Passo da Sanduíche de Apo A-I de HDL

Na realização do ELISA da sanduíche para apolipoproteína A-I efectuaram-se os seguintes passos. Reconstituíram-se com água desionizada controlos comerciais, de acordo com a literatura das embalagens. Os controlos foram suavemente remoinhados e mantidos à temperatura ambiente durante 20-30 minutos para assegurar a dissolução completa.

(i) Amostras e Controlos

As amostras e controlos foram diluídos com PBS a 1:5000. Pode fazer a seguinte diluição em série:

20 μl de amostra + 1,98 ml de PBS (1:100);
40 μl da diluição anterior + 1,96 ml de PBS (1:5000).

(ii) Diluição do Padrão

O Padrão de apo A-I (HDL) isolada é diluído para 4 $\mu\text{g/ml}$ com PBS. São feitas diluições duplas, em série, até se obter 0,031 $\mu\text{g/ml}$. Por exemplo, usando uma preparação de HDL, designada por 860527, que contém 868 $\mu\text{g/ml}$

4 $\mu\text{g/ml}$ = 46 μl + 9,954 ml de PBS (1:217);
2 $\mu\text{g/ml}$ = 1 ml da diluição anterior + 1 ml de PBS; e diluições duplas contínuas até se obter 0,031 $\mu\text{g/ml}$.



-58-

(iii) Diluição de AI-11 Marcada com HRPO

Usa-se uma diluição de 1:5000 do anticorpo conjugado HRPO AI-11 em PBS. Podem ser feitas as seguintes diluições:

- 20 μ l + 1,98 ml de PBS (1:100); e
- 240 μ l da diluição anterior + 11,76 ml de PBS (1:5000).

Cubra com folha de metal para proteger da luz. Esta quantidade é suficiente para 2 placas.

(iv) Peróxido de Hidrogénio a 3 por Cento

Dilua peróxido de hidrogénio a 30 por cento (H_2O_2) em água destilada 1:10.

(v) Substrato de o-fenilenodiamina

Dissolva 1 comprimido de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em 15 ml de água destilada. Adicione 62,5 μ l de H_2O_2 a 3 por cento. Cubra com folha de metal para proteger da luz. De cada vez faça substrato fresco, imediatamente antes de o usar.

e. Procedimento de Ensaio

i. Equilibre a placa de ELISA ligada ao anticorpo à temperatura ambiente (20-22 graus C) durante pelo menos 20 minutos. Remova a placa do saco e inverta a placa para remover das cavidades o tampão residual. Encha as cavidades com 300 μ l de tampão de lavagem (PBS contendo BSA a 0,1% e Tween 20 a 0,05%, pH 7,2) e mantenha-as durante um período de tempo de 10 minutos. Inverta a placa para remover o tampão e marque a placa seca em papel absorvente. Durante o ensaio não deixe as cavidades ficarem vazias mais de 10 minutos.

ii. Adicione às cavidades, em triplicado, 50 μ l de padrão ou de amostra.

O padrão 0 μ g/ml é 50 μ l de PBS.

Adicione 50 μ l de padrões de HDL diluídos às cavidades com padrão (0,031, 0,062, 0,125, 0,25, 0,50, 1,0 μ g/ml).

Adicione 50 μ l de controlos diluídos e de amostras do pa-

-59-

ciente às respectivas cavidades.

iii. Adicione 50 μ l de anticorpo ligado a HRPO/
/cavidade a todas as cavidades.

iv. Envolve a placa em folha de alumínio e colo-
que num agitador rotativo (cerca de 100 RPM) durante 30 minu-
tos à temperatura ambiente (cerca de 20-25 graus C).

v. Lave a placa enchendo as cavidades com 300 μ l
de Tampão de Lavagem/cavidade e invertendo a placa para remover
o tampão. Repita duas vezes mais para obter um total de três
lavagens. Marque a placa, seca em papel absorvente, após a
terceira lavagem. Não deixe a placa secar.

vi. Adicione 100 μ l de substrato de OPD, recente-
mente preparado/cavidade. Deixe a cor desenvolver-se, à tempe-
ratura ambiente durante 30 minutos.

vii. Pare a reação com a adição de 50 μ l de áci-
do sulfúrico 4 N a todas as cavidades. Leia a D.O. a 492 nm.

2. ELISA de sanduíche de apo B-100

a. Recolha de Plasma Reunido e Preparação para Lio- filização para Padrão Secundário

Recolha plasma fresco de 10 indivíduos normais que jeju-
aram durante a noite. (os indivíduos podem beber café ou chá).

Realize a flebotomia usando um tubo com vácuo contendo
EDTA dissódico, por técnicas não traumáticas de venipunctura.
Centrifugue as amostras a 1500xg durante 30 minutos a 4 graus
C. Transfira o plasma para tubos limpos e hermeticamente ro-
lhados e armazene-o durante não mais de 24 horas.

Combine as amostras de plasma em igual quantidade. Faça
alíquotas de quantidades de 0,5 ml em garrafas Wheaton, limpas
com ácido crômico e contendo 5 ml de soro âmbar (VWR Scienti-
fic Division, Univar, San Francisco, CA; VWR #223778). Colo-
que rolhas de borracha nas garrafas de modo que não mais do

-60-

que 0,64 cm da rolha fiquem inseridos na garrafa. As garrafas são então colocadas nos tabuleiros que foram removidos da Unidade de Armazenamento do liofilizador.

b. Liofilização do Conjunto de Plasma para o Padrão

O sistema de liofilização usado foi a Unidade de Armazenamento de FTS Systems Dura-Stop em conjunto com a Unidade de Condensação Dura-Dry. (FTS Systems, Inc., Stone Ridge, NY).

- i. Arrefeça a Unidade de Armazenamento até -50°C .
- ii. Congele as amostras de plasma colocando o tabuleiro com amostras na Unidade de Armazenamento pré-arrefecida. Coloque detectores de termopar de chumbo dentro de algumas amostras nos frascos para monitorizar as variações na temperatura.
- iii. Logo que os detectores do termopar de chumbo indiquem que as amostras estão congeladas a -50°C (aproximadamente 30 minutos, o tempo varia com o número de amostras) ligue a Refrigeração na Unidade de Condensação Dura-Dry.
- iv. Quando se atinge a temperatura mais baixa liga-se a bomba de vácuo.
- v. Logo que a pressão de vácuo atinja 200 microns ou menos, aumente a temperatura na Unidade de Armazenamento até -20°C .
- vi. Deixe as amostras a esta temperatura durante cerca de 20 horas, altura em que a temperatura é elevada para -10°C .
- vii. Em 30 minutos, aumente a temperatura para -50°C . O aumento final da temperatura para 4°C é realizado 30 minutos depois.
- viii. A prateleira na Unidade de Armazenamento é então levantada para colocar as rolhas de borracha nas garrafas. Retira-se o vácuo da câmara e removem-se as amostras.

-61-

ix. Use uma tenaz manual Wheaton (Wheaton #224303; VWR Scientific, Division of Univar, San Francisco, CA) para fixar selos de alumínio Wheaton (VWR Scientific, VWR #226-355) nos frascos de amostra. As amostras são então armazenadas, até se usarem, a 4°C.

c. Reconstituição e Estabilidade

i. Reconstituição

Antes da reconstituição os padrões de plasma liofilizado devem estar à temperatura ambiente. Sugere-se um tempo mínimo de 30 minutos à temperatura ambiente.

Remova o anel de alumínio e a rolha sendo cuidadoso de modo a libertar lentamente o vácuo do frasco. Usando uma pipeta de precisão, reconstitua com 0,5 ml de H₂O desionizada. Deixe lentamente a água na parede do frasco. Recoloque a rolha, remoinhe rapidamente o frasco, 3-4 vezes, e deixe repousar à temperatura pelo menos 30 minutos. A este padrão também não é feito vortex nem é fortemente agitado mas apenas remoinhado para se obter uma solução.

Após 30 minutos, remoinhe suavemente o frasco antes de usar.

ii. Estabilidade

O padrão é armazenado a uma temperatura entre 2-8 graus C antes e depois da reconstituição. O padrão reconstituído é estável durante 4 semanas. Se for armazenado assim.

d. Determinação do Valor para o Padrão Liofilizado

(i) ELISA Competitivo

A determinação do valor para o padrão liofilizado é conseguida no ELISA competitivo de referência usando uma LDL primária. Durante 16 horas a 4°C revestiram-se placas de microtitulação flexíveis de cloreto de polivinilo (Falcom, Microtest III) com 200 µl de PBS contendo 5 µg/ml da LDL. Lavaram-se então as cavidades três vezes, com 200 µl de PBS contendo BSA a

-62-

1% e Tween a 0,5%. Os locais de ligação residuais foram bloqueados com 200 μ l de BSA a 3% em PBS, durante uma hora a 25°C. Em seguida lavaram-se de novo as cavidades, três vezes, usando o mesmo tampão de lavagem. Para a curva do padrão, que foi incluída em cada placa, diluiu-se o padrão para Apo B-100 de LDL em PBS contendo plasma desprovido de lipoproteína (LPDP) a 0,5% para proporcionar concentrações de LDL variando entre 32 μ g/ml e 0,25 μ g/ml. Em cada ensaio utilizaram-se três controles diferentes: 1) Controlo Isolab Lipotype (Akron, Ohio), 2) três níveis de Tago Inc. Apolipoprotein B Reference Sera Controls (Burlingame, CA), e 3) Omega Lipid Fraction Control Serum (Cooper Biomedical, Malvern, PA). Cada controlo foi preparado de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de plasma e os controlos foram diluídos 200 vezes em tampão de diluição de LPDP/PBS. Pipetaram-se para as cavidades cinquenta μ l de padrões, controlos e soluções desconhecidas, e imediatamente a seguir 50 μ l de fluido ascítico de MB24 com uma concentração fixa (diluição de 2000 vezes de BSA a 3%/PBS). Em seguida incubaram-se as placas durante 18 horas a 4°C. Todas as determinações foram feitas em triplicado. Depois de se lavarem novamente as cavidades adicionaram-se-lhes 100 μ l de IgG de cabra anti-rato conjugado com HRPO, diluído 4000 vezes em BSA a 1%/PBS, incubaram-se durante exactamente uma hora a 25°C e em seguida lavaram-se novamente. A solução de substrato continha H₂O₂ a 3% e 0,67 mg/ml de o-fenilenediamina (OPD) (Cat #2781, sigma) diluídos em água destilada. Adicionaram-se a todas as cavidades com μ l de solução de substrato recentemente preparada, contendo H₂O₂ a 3% e 0,67 mg/ml de o-fenilenediamina (OPD) em água destilada e deixou-se a cor desenvolver durante 30 minutos a 25°C. A reacção foi parada pela adição de 50 μ l de H₂SO₄ 4 N e determinou-se em seguida a densidade óptica (O.D.) da solução a 490 nm, usando um leitor de placa de microtitulação com 96 cavidades (Dynatech MR600; Alexandria, VA).

(ii) Ensaio da Sanduíche de Apo B-100

O passo seguinte consiste em usar o padrão liofilizado

no ensaio directo da sanduíche. Durante 16 horas a 4°C, revestiram-se placas de microtitulação de poliestireno (Munc-Immuno Plate I) com 150 μ l de tampão de bicarbonato de sódio, pH 9,0, contendo 1 μ g/ml de MB47 purificada. Lavaram-se as placas 3 vezes, com PBS contendo BSA a 0,1%, Tween a 0,05% e em seguida bloquearam-se com BSA a 3%, exactamente da forma descrita no ensaio de competição. Diluiu-se o padrão liofilizado de LDL-apo B em LPDP/PBS 1:200 (Padrão de Diluição) a concentrações variando entre 0,125 e 4,0 μ g/ml. Neste ensaio usaram-se os mesmos controlos descritos anteriormente para o ELISA de competição. Diluíram-se amostras de plasma e controlos 1000 vezes em tampão de diluição. Adicionaram-se às placas, em triplicado, cinquenta μ l de padrões, controlos e soluções desconhecidas. Em seguida pipetaram-se imediatamente para todas as cavidades 50 μ l de PBS contendo uma concentração fixa de MB24 ligada a HRPO. Incubaram-se as placas exactamente 30 minutos a 25°C, lavaram-se e adicionaram-se 100 μ l de solução de substrato de OPD para uma incubação de 30 minutos a 25°C. O desenvolvimento da cor foi parado por adição de 50 μ l de H₂SO₄ a 4N e leram-se as placas num leitor de microplacas, tal como no ELISA de competição.

D. ELISA Competitivo

Fixou-se apo B-100 reagente, na forma de LDL, nas paredes das cavidades das placas de microtitulação flexíveis de poli(cloreto de vinilo) (Microtest III, Falcon Labware, Becton, Dickinson & Co., Oxnard, CA), que actuam como matriz sólida, misturando em cada cavidade 0,2 ml de PBS contendo 5 μ g/ml de LDL humana isolada. Mantiveram-se as cavidades durante 16 horas a 4 graus C e lavaram-se em seguida, 3 vezes, com 0,2 ml de PBS contendo BSA a 1 por cento, Tween a 0,5 por cento e apctinina a 0,02 por cento (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Os locais de ligação não específicos residuais foram bloqueados, como se descreveu no ELISA não competitivo.

Os locais de ligação não específicos foram bloqueados revestindo com BSA a 3 por cento em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com tampão de lavagem de PBS contendo adicionalmente BSA a 0,1 por cento,

-64-

azida de sódio a 0,01 por cento e Tween-20 a 0,05 por cento.

Para a curva de padrão, que foi incluída em cada placa, diluiu-se a LDL reagente em PBS contendo plasma desprovido de lipoproteína LPDP a 0,5 por cento para proporcionar concentrações variando entre 32 mg/ml e 0,25 mg/ml.

As amostras de plasma foram diluídas de 1:200 em PBS contendo LPDP a 0,5 por cento. Misturaram-se nas cavidades, em triplicado, cinquenta microlitros de padrões ou de amostras. Cerca de 5 minutos depois misturaram-se em cada cavidade 50 μ l de PBS contendo BSA a 3 por cento e cerca de 4 μ g/ml de moléculas paratópicas MB24. As misturas que se formaram foram mantidas durante 18 horas a 4 graus C. O material não ligado foi então separado dos produtos de imunorreacção de apo B-100 reagente-MB24 fixados à fase sólida, por lavagem, como se descreveu anteriormente.

Os imunorreagentes de fase sólida foram preparados para o ensaio misturando em cada cavidade 0,1 ml de PBS contendo BSA a 1 por cento e uma quantidade eficaz de IgG de cabra anti-rato marcada com HRPO. Esta segunda mistura de imunorreacção foi mantida durante cerca de 1 hora a 24 graus C e em seguida foi lavada como se descreveu anteriormente, para formar um imunorreagente sanduíche.

A quantidade de imunorreagente sanduíche fixado à fase sólida, contendo marcador HRPO, foi determinada como se descreveu no ELISA competitivo.

E. Amostras de Plasma e Quantificação de Lipoproteína

As amostras de plasma foram obtidas de 20 pacientes com doença da artéria coronária no laboratório de cateterização cardíaca do San Diego VA Hospital. Obteve-se também plasma de 37 sujeitos normais.

Recolheu-se o sangue em tubos contendo 1,5 mg/ml de etilenodiaminatetraacetato (EDTA) e o plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 4 graus C.

Mediram-se os triglicéridos e plasma de colesterol to-

-65-

tais nas amostras de plasma fresco, num laboratório clínico padronizado, usando um analisador bicromático Abbott ABA-200 e reagente de colesterol de elevado rendimento 236691 Boehringer-Mannheim e triglicéridos A-gent de Abbott Laboratories. Mediu-se o colesterol de HDL e de LDL usando técnicas descritas em Lipid Research Clinic Procedures, HEW Pub. No. 75-628 (NIH), 2 ed., Washington, D.C., Gov. Print. Off., (1974). Os níveis de apoproteína B foram determinados usando dois conjuntos de imunodifusão radial à venda: Diffu-gen RID (Tago, Inc., Burlingame, CA) que é aqui designado por RID I e M-Partigen RID (Calbiochem-Behring, La Jolla, CA) que é aqui designado por RID II.

F. RIA de Fase Fluida de Antígeno marcado com ^{125}I

Para determinar a fracção de partículas de ^{125}I -LDL ligada por MB47 e MB24 utilizou-se um RIA de fase fluida seguindo os procedimentos gerais de Tsao et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:1522-15228. Foram estudadas duas preparações diferentes de LDL ($d=1,019-1,063$ g/ml), uma isolada a partir de plasma de 10 sujeitos normais reunido e outra de plasma isolado de um sujeito normal.

A ^{125}I -LDL (2000 cpm/ng), preparada usando a técnica de iodogénio (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) era precipitável em ácido tricloroacético (TCA) a 90%. Esta composição foi diluída em albumina de soro bovino (BSA) a 9 por cento (Sigma, St. Louis, MO) e centrifugada a 30.000xg durante 15 minutos antes de cada ensaio, para remover o material complexo.

Os ensaios foram realizados em triplicado, em tubos de vidro de 12x75 mm em tampão de barbital de sódio 55 mM a um valor de pH de 8, contendo NaCl 150 mM, azida de sódio a 0,02 por cento, BSA a 3% e EDTA-sódio 1,5 mM. A 0,1 ml de ^{125}I -LDL [contendo 20 nanogramas (ng) de proteína LDL] adicionaram-se 0,1 ml de tampão ou antígeno de competição e 0,1 ml de receptores de MB47 isolados, a concentrações crescentes, diluídas em tampão de BSA-barbital. Após 18 horas a 4 graus C, misturaram-se 0,1 ml de IgSorb (The Enzyme Co., Boston, MA). Após um tempo de manutenção de 2 horas, adicionaram-se 2 ml de tampão

de barbital sem BSA e imediatamente em seguida centrifugaram-se os tubos a 1.500xg durante 60 minutos. Os precipitados resultantes foram lavados duas vezes com tampão de barbital.

Os ensaios utilizando AI-10 e AI-11 foram realizados de modo semelhante ao descrito acima em Tsao et al. e em Curtiss e Edgington (1985) J. Biol. Chem. 260:2982-2993. Assim, a 0,1 ml de antígeno radio-iodado (HDL ou apolipoproteína A-I) adicionaram-se 0,1 ml de solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 e 0,1 ml de fluido de cultura de hibridoma de rato ou de fluido ascítico em diluições variáveis, diluindo-se em soro normal de rato 1:50. Todos os tampões continham também dextra no a 5% (p.m. 40.000). Após 18 horas a 4 graus C, adicionaram-se 0,1 ml de segundo anticorpo precipitante (soro com IgG de cabra anti-rato). Depois de uma incubação de 4 horas a 4 graus C, adicionaram-se 2 ml de PBS frio e centrifugaram-se os tubos a 2000xg durante 30 minutos a 4 graus C. Decantaram-se os sobrenadantes e determinou-se a ¹²⁵I actividade das pelotas num contador gama.

A radioactividade máxima precipitável foi determinada substituindo IgSORB (para MB47) ou o segundo anticorpo (para AI-10 e AI-11) por TCA a 100%. A radioactividade mínima precipitável ou ligação não específica (NSB) foi determinada substituindo os anticorpos específicos para o hibridoma por um anticorpo, irrelevante para a hibridoma, da mesma classe de cadeia pesada.

Os resultados foram calculados como se segue:

$$\text{percentagem da ligação de } ^{125}\text{I-antígeno} = \frac{\text{Média-NSB} \times 100}{\text{TCA-NSB}}$$

onde Média = radioactividade média precipitada na presença de uma dada quantidade de anticorpo específico e TCA e é a radioactividade máxima precipitável por TCA.

D. Ensaio Imunoenzimométrico Competitivo para AI-10 e AI-11

Durante um período de tempo de 18 horas (durante a noite) revestiram-se, a 4°C, placas de microtitulação flexíveis de po

-67-

li(cloreto de vinilo) com 0,2 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HDL ou de apo A-I purificada. As cavidades foram lavadas três vezes com 0,3 ml de PBS contendo 1,0 g de BSA e 0,5 ml de Tween 20 por litro. Os locais de ligação residuais nas cavidades foram bloqueados incubando 0,2 ml de PBS contendo 3,0 g BSA por litro nas cavidades, durante 1 hora à temperatura ambiente (20-25 graus C). As cavidades foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem. As placas foram usadas imediatamente.

Incubou-se PBS (0,05 ml), contendo 0,375 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AI-10 conjugada com peroxidase de rábano, nas cavidades pré-revestidas com 0,05 ml de PBS contendo entre 0 e 8,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticorpo monoclonal AI-10 não conjugado ou AI-11 não conjugado. O tempo de incubação foi de três horas à temperatura ambiente (20-25 graus C). As cavidades foram então lavadas três vezes com tampão de lavagem e adicionou-se a todas as cavidades 0,1 ml de PBS contendo substrato de p-fenilenodiamina e incubaram-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. A reação da cor foi parada pela adição de 0,05 ml de H_2SO_4 4N a todas as cavidades e determinou-se a densidade óptica (D.O.) de cada cavidade a 490 nanômetros (nm) usando um leitor de placa de 96 cavidades Dynatech.

Os resultados da placa revestida com apo A-I são apresentados na Figura 3A e os resultados da placa revestida com HDL são apresentados na Figura 3B. Um aumento de 21 vezes das moléculas AI-11 não marcadas não competiu significativamente com as moléculas de AI-10 marcadas com peroxidase, em relação à ligação a HDL ou a apo A-I. O estudo foi repetido usando AI-11 marcada com peroxidase com AI-10 e AI-11 não marcadas, às mesmas concentrações, tendo-se obtido essencialmente os mesmos resultados.

O presente invento foi descrito em relação às concretizações preferidas. Será evidente para os especialistas que se podem efectuar modificações e/ou variações na matéria apresentada sem saírem do âmbito do invento exposto aqui.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para o ensaio de um marcador do metabolismo anormal de lípidos, compreendendo os passos de avaliar a quantidade de apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I humanas por unidade de volume de uma amostra de sangue e determinar a razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I na amostra, caracterizado por compreender:

(a) ensaiar uma primeira alíquota de uma amostra de sangue líquido, contendo apolipoproteína B-100, de uma pessoa, relativamente à quantidade de apolipoproteína B-100 presente, por:

(i) mistura da referida primeira alíquota de amostra líquida com um suporte sólido consistindo essencialmente de uma matriz sólida possuindo primeiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida que imunorreagem com apolipoproteína B-100 e que são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746, para formar uma primeira mistura de fases sólida-líquida, possuindo a superfície do referido suporte locais de ligação não específicos bloqueados;

(ii) manutenção da referida primeira mistura de fases sólida-líquida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado suficiente para que as referidas primeiras moléculas paratópicas imunorreajam com a apolipoproteína B-100 presente e formem um imunorreagente, ligado à fase sólida, que contém substancialmente toda a apolipoproteína B-100 presente na referida alíquota de amostra;

(iii) mistura da apolipoproteína B-100 da referida primeira alíquota de amostra líquida com segundas moléculas paratópicas monoclonais de fase líquida que imunorreagem com apolipoproteína B-100, são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746 mas que não foram utilizadas no passo (a) (i) e que estão ligadas operativamente a um meio indicador de enzima, para formar uma segunda mistura;

-69-

(iv) manutenção da referida segunda mistura sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado suficiente para que as segundas moléculas paratópicas ligadas a meios indicadores formem um imunorreagente que contém substancialmente toda a apolipoproteína B-100 da alíquota de amostra;

(v) separação das fases sólida e líquida que resultaram dos passos (a) (i-iv) anteriores; e

(vi) determinação da quantidade de imunorreagente contendo apolipoproteína B-100 ligada a meios indicadores, presente na fase sólida separada e deste modo a quantidade de apolipoproteína B-100 num volume unitário de amostra;

(b) ensaiar uma segunda alíquota da referida amostra de sangue líquido que contém apolipoproteína A-I e está isenta de tratamento desmascarante, relativamente à quantidade de apolipoproteína A-I presente, por:

(i) mistura da referida segunda alíquota de amostra líquida com um suporte sólido consistindo essencialmente de uma matriz sólida possuindo terceiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida que imunorreagem com apolipoproteína A-I e que são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 9200 ou HB 9201 para formar uma terceira mistura de fases sólida-líquida, possuindo o referido suporte sólido locais de ligação não específicos bloqueados;

(ii) manutenção da referida terceira mistura de fases sólida-líquida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado suficiente para que as referidas terceiras moléculas paratópicas imunorreajam com apolipoproteína A-I presente na amostra de alíquota e formem um imunorreagente ligado à fase sólida que contém substancialmente toda a apolipoproteína A-I da alíquota de amostra;

(iii) mistura de apolipoproteína A-I da segunda alíquota de amostra líquida com quartas moléculas paratópicas monoclonais de fase líquida que imunorreagem com apolipoproteí

-70-

na A-I, que são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 9200 ou HB 9201 mas que não foram utilizadas no passo (b) (i) e que estão ligadas operativamente a um meio indicador de enzimas, para formar uma quarta mistura;

(iv) manutenção da referida quarta mistura sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado suficiente para que as referidas quartas moléculas paratópicas ligadas a meios indicadores formem um imunorreagente com substancialmente toda apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra;

(v) separação das fases sólida e líquida que resultam dos passos (b) (i-iv); e

(vi) determinação da quantidade de imunorreagente contendo apolipoproteína A-I ligada a meios indicadores presente na fase sólida separada e assim da quantidade de apolipoproteína A-I numa unidade de volume de amostra.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas misturas dos passos (a) (i) e (a) (iii) serem efectuadas essencialmente em simultâneo e as manutenções dos passos (a) (ii) e (a) (iv) serem efectuadas em conjunto.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as fases sólida e líquida presentes após o passo (a) (ii) serem separadas antes do passo (a) (iii) e por a apolipoproteína B-100 da referida primeira alíquota misturada no passo (a) (iii) estar presente no imunorreagente ligado à fase sólida formado no passo (a) (ii).

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as fases sólida e líquida presentes após o passo (b) (ii) serem separadas antes do passo (b) (iii) e por a apolipoproteína A-I da segunda mistura de alíquota líquida no passo (b) (iii) estar presente no imunorreagente ligado à fase sólida formado no passo (b) (ii).

5 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracteri

-71-

zado por as misturas dos passos (b) (i) e (b) (iii) serem efetuadas essencialmente em simultâneo e por as referidas manutenções dos passos (b) (ii) e (b) (iv) serem realizadas em conjunto.

6 - Processo para o ensaio de um marcador de metabolismo anormal de lípido, compreendendo os passos de avaliar as quantidades de apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I humanas por unidade de volume de uma amostra de sangue e determinar a razão entre apolipoproteína B-100 e apolipoproteína A-I na amostra, caracterizado por compreender:

(a) ensaiar uma primeira alíquota de uma amostra de sangue líquido contendo apolipoproteína B-100 de uma pessoa, relativamente à quantidade de apolipoproteína B-100 presente, por:

(i) formação de uma primeira mistura de fases sólida-líquida por mistura substancialmente simultânea da referida primeira alíquota de amostra líquida com um suporte sólido consistindo essencialmente de uma matriz sólida possuindo primeiras moléculas paratópicas monoclonais que imunorreagem com apolipoproteína B-100 e são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746 e segundas moléculas paratópicas monoclonais ligadas operativamente a um meio indicador de enzima que são segregadas por qualquer um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 8742 ou HB 8746 e que não são as primeiras moléculas paratópicas ligadas à matriz sólida, possuindo a superfície do referido suporte locais de ligação não específicos;

(ii) manutenção da referida primeira mistura de fases sólida-líquida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado suficiente para que as referidas primeiras moléculas paratópicas e as referidas segundas moléculas paratópicas ligadas a meios indicadores, para imunoreagir com substancialmente toda a apolipoproteína B-100 presente na alíquota de amostra para formar um imunorreagente "sandwich" ligado à fase sólida e uma fase líquida;

-72-

(iii) separação das fases sólida e líquida; e

(iv) determinação da quantidade de imunorreagente "sandwich" contendo apolipoproteína B-100 ligada a meios indicadores presente na fase sólida separada e deste modo a quantidade de apolipoproteína B-100 num volume unitário de amostra;

(b) ensaio de uma segunda alíquota da referida amostra de sangue líquido que contém apolipoproteína A-I e é isenta de tratamento desmascarante, relativamente à quantidade de apolipoproteína A-I presente, por:

(i) formação de uma segunda mistura de fases sólida-líquida por mistura substancialmente simultânea da referida segunda alíquota de amostra líquida com um suporte sólido consistindo essencialmente de uma matriz sólida possuindo terceiras moléculas paratópicas monoclonais ligadas à fase sólida que imunorreagem com apolipoproteína A-I e que são segregadas por um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 9200 ou HB 9201 e quartas moléculas paratópicas monoclonais ligadas operativamente a um meio indicador de enzima que são segregadas por qualquer um dos hibridomas possuindo os números de acesso ao ATCC HB 9200 ou HB 9201 e que não são as terceiras moléculas paratópicas ligadas à matriz sólida, possuindo a superfície do referido suporte locais de ligação não específicos bloqueados;

(ii) manutenção da referida mistura de fases sólida-líquida sob condições de ensaio biológico durante um período de tempo predeterminado, suficiente para que as referidas terceiras moléculas paratópicas e as referidas quartas moléculas paratópicas ligadas a meios indicadores imunorreajam com substancialmente toda a apolipoproteína A-I presente na alíquota de amostra para formar um imunorreagente "sandwich" ligado à fase sólida e uma fase líquida;

(iii) separação das fases sólida e líquida; e

(iv) determinação da quantidade de imunorreagente "sandwich" contendo apolipoproteína A-I ligada a meios indicadores, presente na fase sólida separada e assim a quantidade

-73-

de apolipoproteína A-I num volume unitário de amostra.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por as referidas primeiras moléculas paratópicas serem segregadas pelo hibridoma possuindo o número de acesso ao ATCC HB 8746.

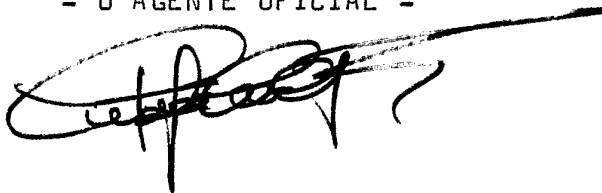
8 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por as terceiras moléculas paratópicas serem segregadas pelo hibridoma possuindo o número de acesso ao ATCC HB 9200.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a referida manutenção sob condições de ensaio biológico dos passos (a) (ii) e (b) (ii) ser feita durante um período de tempo de cerca de 30 minutos a cerca de 60 minutos à temperatura ambiente.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a referida manutenção ser feita por um período de tempo de cerca de 30 minutos e ser conduzida com agitação.

Lisboa, 22 de Maio de 1987

Por SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION
- O AGENTE OFICIAL -



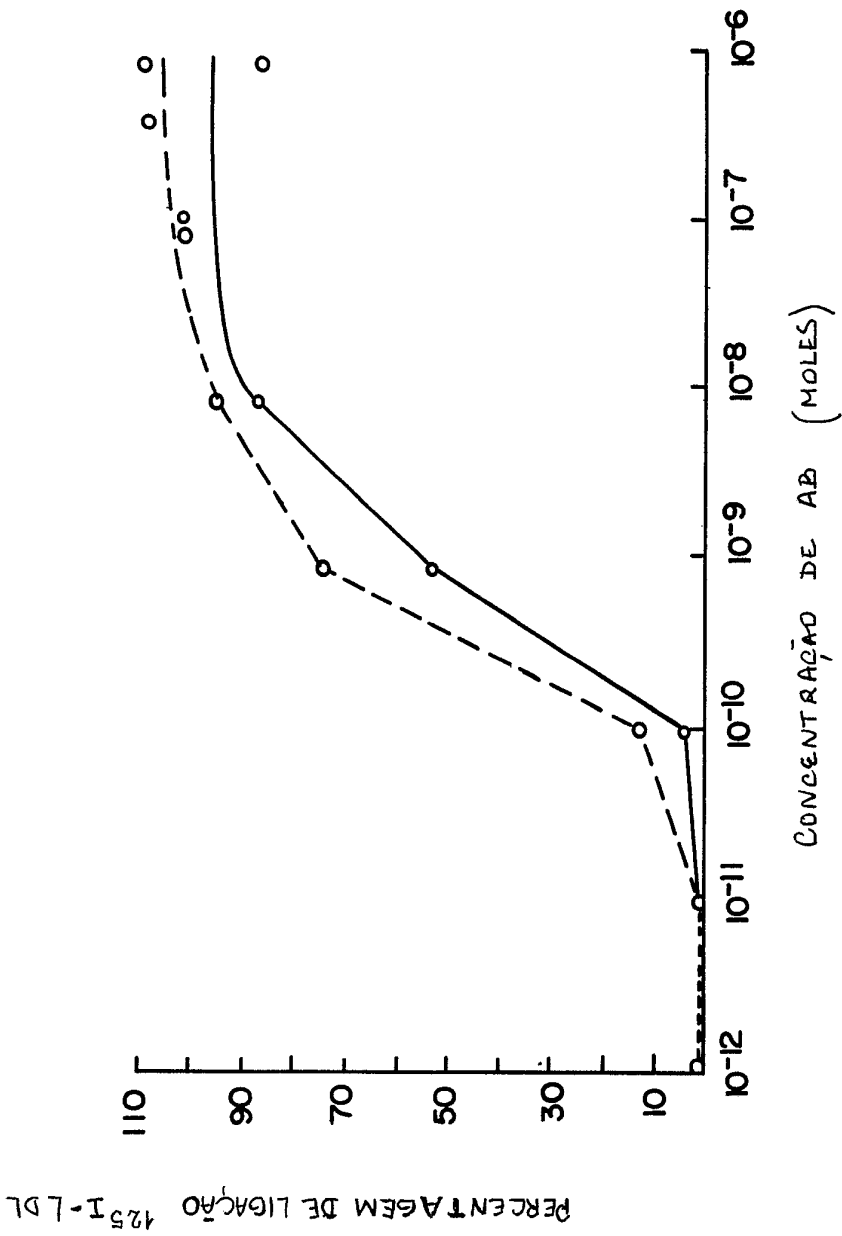
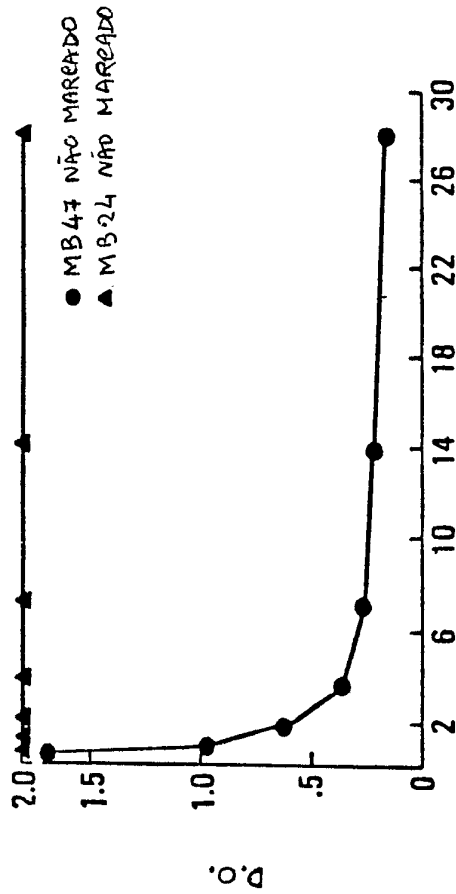


FIG.1

CAPACIDADE DE MB 24 E MB 47 NÃO MAREADOS PARA COMPETIR COM MB 24 E COM MB 47 MAREADOS COM PEROXIDASE RELATIVAMENTE A LIGACÃO A LDL NUM ENSAIO DE FASE SÓLIDA

A. HRPO-MB47



B. HRPO-MB24

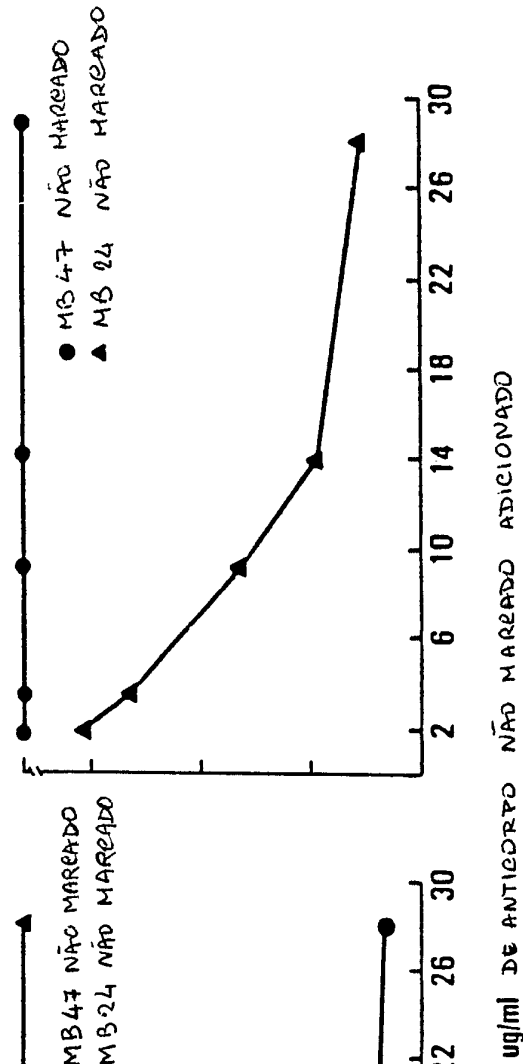


FIG. 2

[Handwritten signature]



PLACA AI-10 - HRPO REVESTIDA COM APD A-I (0.375 UG/ML)

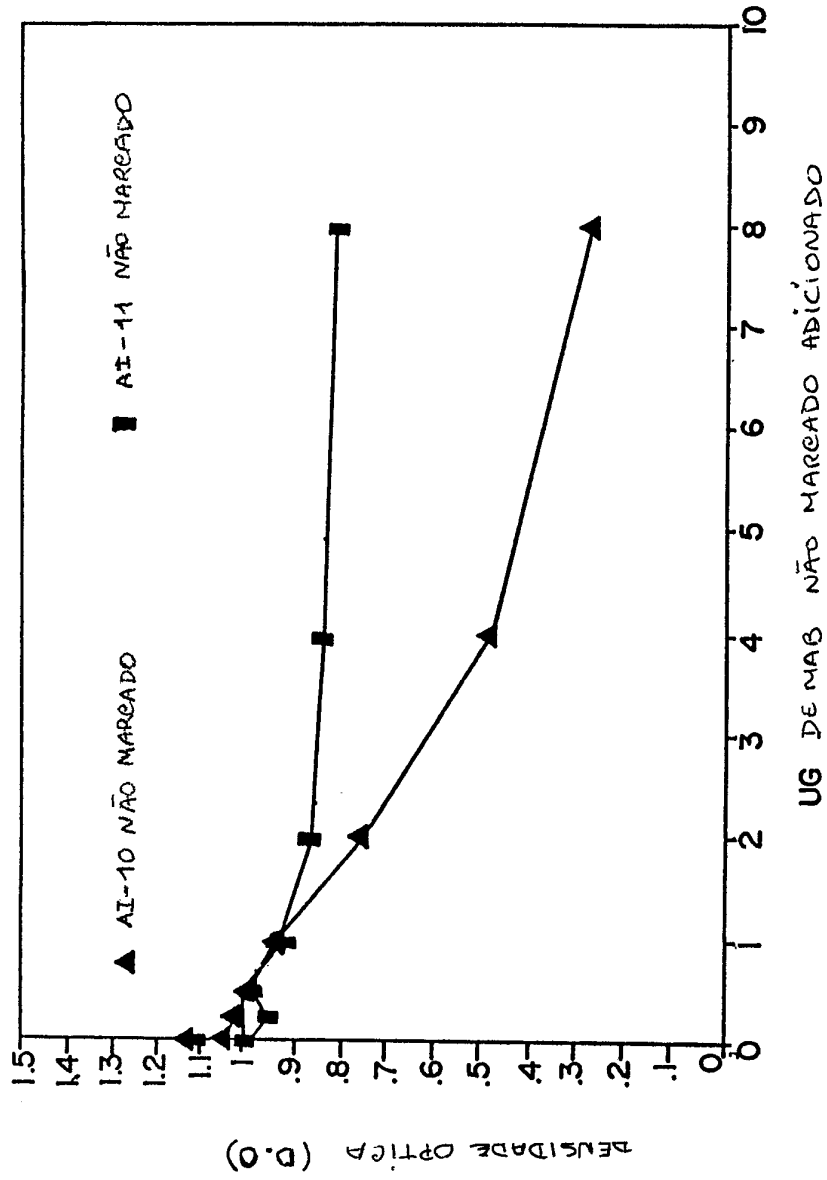


FIG. 3A



PLACA AI-10-HPPO REVESTIDA COM HDL (0.375 UG/ML)

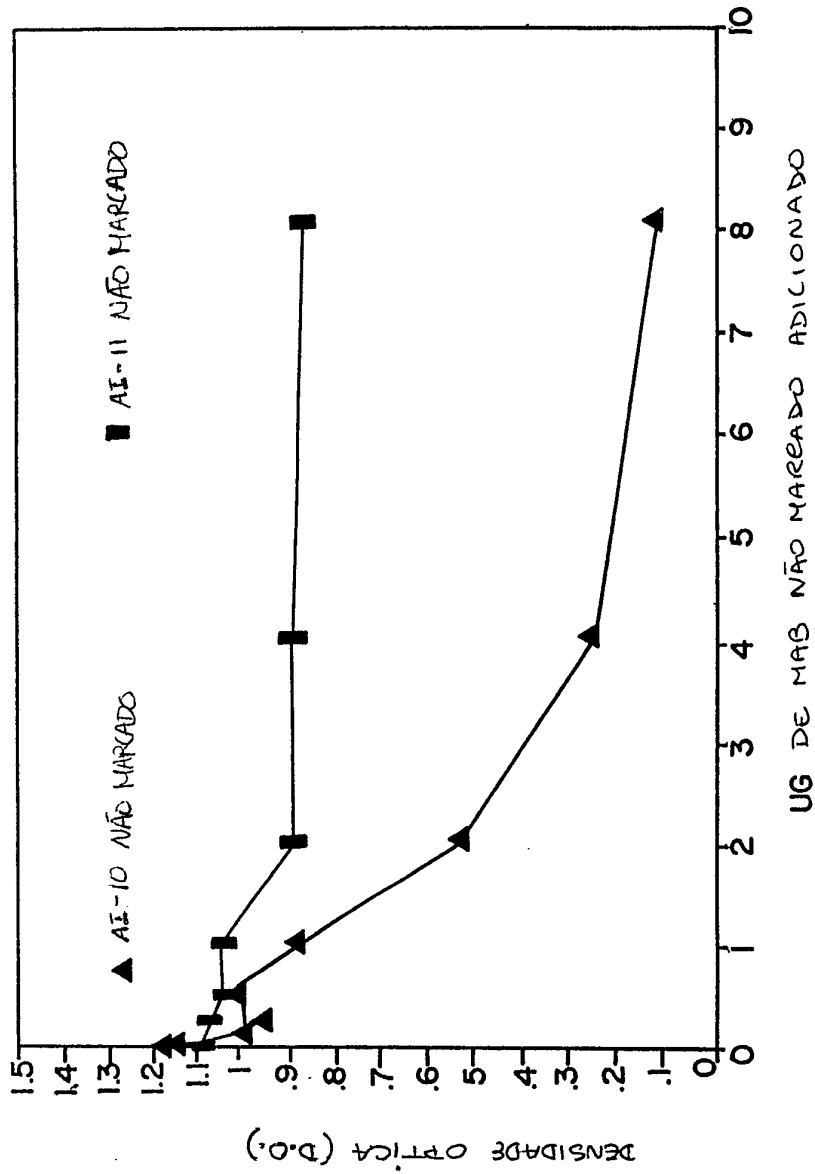


FIG.3B