INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 935752 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
G01N033/50 A G01N033/74 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1996.09.20

(30) *Prioridade:*

(43) *Data de publicação do pedido:*
1999.08.18

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.11.21

(73) *Titular(es):*
ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.
U.S. ROUTE NO. 202 RARITAN, NJ 08869-0606 US

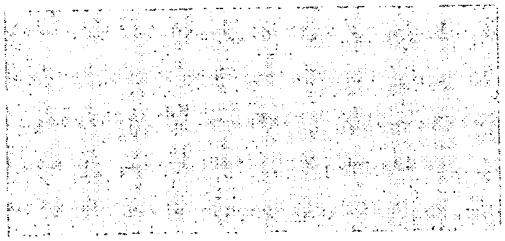
(72) *Inventor(es):*
CHI-KWONG SO US
J. PETER LISI US
K. JEFFREY GLENN US

(74) *Mandatário(s):*
PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA BIOACTIVIDADE DA ERITROPOIETINA IN VITRO

(57) *Resumo:*

MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA BIOACTIVIDADE DA ERITROPOIETINA IN VITRO



DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA BIOACTIVIDADE DA ERITROPOIETINA IN VITRO"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A eritropoietina (EPO) é uma hormona glicoproteica que estimula a maturação das células precursoras eritróides, regulando assim a produção de eritrócitos nos mamíferos. A purificação da EPO humana (hEPO) e a clonagem do gene de EPO conduziram à produção comercial de hEPO recombinante, que tem sido utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com anemia resultante de insuficiência renal e é clinicamente útil no tratamento de outras anemias. Os métodos actuais para a quantificação de EPO biologicamente activa numa amostra, por exemplo uma formulação de um medicamento volumoso, são trabalhosas, dispendiosas e demoradas. A presente invenção proporciona um método seguro, rápido e relativamente económico para medir a bioactividade da EPO in vivo e kits para a medição da bioactividade da EPO.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A EPO é uma hormona glicoproteica que estimula a proliferação, diferenciação e maturação de células precursoras eritróides, em glóbulos vermelhos maduros. A EPO tem sido purificada (Miyake *et al.*, (1977) J Biol. Chem. 252:5558) e clonada molecularmente (Lin *et al.*(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7580) e a hEPO recombinante tem sido utilizada com sucesso no tratamento de anemia resultante de doença renal de fase terminal. A utilização clínica de EPO tem sido referida

no tratamento de anemia associada à SIDA, artrite reumatóide, malignidades hematológicas e prematuridade e para aumentar o rendimento em sangue autólogo, recolhido pré-operativamente.

A hEPO recombinante tem uma massa molecular de 30,4 kD, dos quais 40% são hidratos de carbono. Estudos sobre a natureza e função da glicosilação da EPO determinaram que a maioria das cadeias de oligossacáridos da hEPO, oligossacáridos tetra-antenários sializados, que contém fucose. A estrutura de glicosilação da EPO urinária humana e da EPO recombinante produzida em células de ovário de Hamster chinês (CHO), células de rim de Hamster bebé (BHK) e células B-linfoblásticas humanas é semelhante, mas não idêntica.

A glicosilação parece desempenhar um papel na solubilidade, biosíntese e secreção da EPO e no metabolismo in vivo da EPO. O papel metabólico in vivo da glicosilação e em particular a presença de ácido siálico, foi analisado. Demonstrou-se que a EPO urinária e a EPO recombinante, des-sializada, perdem a sua actividade in vivo devido a uma eliminação hepática rápida. A partir destes e outros estudos, foi determinado que o ácido siálico cobre o penúltimo resíduo de galactose, protegendo assim a EPO contra a eliminação pelos receptores de asialoglicoproteína (galactosil), hepáticos. Deste modo, a perda dos resíduos de ácido siálico terminais dos oligossacáridos de EPO expõe os resíduos de galactose, resultando na eliminação rápida da EPO des-sializada (também designada por asializada) do plasma, através da ligação ao receptor hepático.

Embora a EPO des-sializada seja essencialmente biologicamente inactiva in vivo, devido à sua rápida

eliminação, a sua bioactividade é mantida em testes in vitro estabelecidos. Os testes convencionais para determinar a bioactividade da EPO in vitro incluem a medição da incorporação de timidina tritiada por eritroblastos esplénicos em ratinhos anémicos tratados com fenilhidrazina (Krystal (1983) Exp. Hematol. 20:649) ou células de uma linha celular de leucemia pluripotente, humana (Lewis *et al.* (1989) Exp. Hematol. 17:102), medição da incorporação de ^{59}Fe em células de medula óssea em cultura (Goldwasser *et al.* (1975) Endocrinology 97:315) e medição do crescimento de linhas celulares dependente de EPO (Kitamura *et al.* (1989) Blood 73:375).

Uma vez que os testes in vitro não conseguem discriminar entre EPO sializada e des-sializada, estes testes não são úteis na quantificação da população de EPO que seria de esperar estivesse activa in vivo. Por exemplo, se uma amostra contendo EPO também contém uma quantidade significativa de EPO des-sializada, os testes in vitro iriam dar uma sobre-estimativa da actividade in vivo. Deste modo, os testes in vivo são utilizados para medir a actividade da EPO in vivo. Especificamente, a actividade da EPO é medida por incorporação de ^{59}Fe em eritroblastos de ratinhos policitémicos (Cotes *et al.* (1961) Nature 191:1065), ou ratinhos jejuados (Goldwasser *et al.* (1975) Methods Enzymol 37:109).

Num teste actualmente utilizado, que é uma modificação do processo de Cotes *et al.*, expõem-se ratinhos fêmea a uma pressão hipobárica, durante catorze dias. A formação de glóbulos vermelhos endógenos é suprimida pela policitémia produzida pela exposição à pressão reduzida. Dado que o estado policitémico persiste após hipóxia, qualquer nova formação de

glóbulos vermelhos é atribuída à administração de EPO exógena. As amostras teste e os padrões de EPO são, assim injectados subcutaneamente nos ratinhos condicionados. Quarenta e oito horas após a injecção de EPO, administra-se ^{59}Fe. Recolhem-se amostras de sangue após mais quarenta e oito horas e quantifica-se a radioactividade. A quantidade de radioactividade é directamente proporcional à dose injectada de EPO padrão; a actividade in vivo de amostras desconhecidas é calculada a partir de uma curva padrão.

O bioensaio in vivo é amplamente reconhecido como a única medida verdadeira da actividade biológica in vivo, dado que mede, quer o tempo de vida em circulação, quer a actividade proliferativa da EPO. No entanto, o teste in vivo tem desvantagens significativas, na medida em que é trabalhoso, dispendioso, demorado e sujeito a variação de animal para animal.

A presente invenção proporciona um método in vitro para quantificar a actividade in vivo da EPO, que ultrapassa as desvantagens dos métodos da arte anterior.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método in vitro para determinar a actividade da EPO in vivo, de uma amostra que contém EPO. Mais particularmente, o presente método compreende tratar uma amostra que contém EPO, sob condições que removem a EPO des-sializada e medir a actividade da EPO in vitro, da amostra tratada, resultante. Numa forma de concretização preferida, a EPO des-sializada é removida da amostra, incubando a amostra com células da linha celular de hepatoma

humano, HepG2, e a actividade da EPO *in vitro* é determinada incubando a amostra tratada com células de uma linha celular que responde a EPO e medindo a proliferação, ou viabilidade, das células que respondem a EPO.

Um outro aspecto da invenção proporciona um kit, que compreende um primeiro recipiente contendo células que expressam o receptor de asialoglicoproteína e um segundo recipiente que contém células que respondem a EPO. Noutra forma de concretização, o kit compreende ainda um terceiro recipiente que contém um corante indicador de viabilidade, tal como brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método *in vitro* para determinar a actividade da EPO *in vivo*, de uma amostra que contém EPO. Mais particularmente, o presente método compreende tratar uma amostra que contém EPO, sob condições que removem a EPO des-sializada e medir *in vitro* a actividade de EPO da amostra tratada, resultante. A presente invenção é particularmente útil na determinação da actividade *in vivo* de formulações de EPO destinadas a uso clínico.

A actividade de EPO *in vitro* é definida como a capacidade de estimular a proliferação ou viabilidade, *in vitro*, de células que expressam um receptor de EPO funcional, por exemplo, células precursoras eritróides. Como discutido a seguir, tanto a EPO sializada, como a des-sializada são activas *in vitro*. A actividade de EPO *in vivo* é definida como a capacidade de estimular a proliferação de células

precursoras eritróides in vivo. A EPO des-sializada é considerada aqui como essencialmente inactiva in vivo, devido a uma eliminação hepática rápida.

De acordo com a presente invenção, uma amostra contendo EPO pode ser na forma de partículas, ou líquida, e é de preferência soro ou plasma, meio de cultura de células, EPO purificada ou EPO recombinante parcialmente purificada, ou uma formulação de EPO destinada para uso clínico, estudos de estabilidade, ou de formulação.

De acordo com a presente invenção, a amostra que contém EPO é tratada sob condições que removem a EPO des-sializada. A des-sialização da EPO resulta na exposição dos penúltimos resíduos de galactose dos oligossacáridos de EPO. Deste modo, a EPO des-sializada pode ser removida de uma amostra contendo EPO, submetendo a amostra a cromatografia de afinidade, com uma lectina que tem afinidade para a galactose, por exemplo Abrina A, ou por cromatografia de afinidade com um anticorpo imobilizado, específico para galactose. Os métodos para realizar a cromatografia de afinidade de lectina são conhecidos dos peritos na arte.

Noutra forma de concretização, a EPO des-sializada é removida de uma amostra contendo EPO, por incubação com células que expressam o receptor de asialoglicoproteína. As células podem expressar naturalmente o receptor de asialoglicoproteína, ou podem ser manipuladas para expressar o receptor, de forma recombinante. Por exemplo, os fibroblastos transfectados com ADNc que codifica para as subunidades de HL-1 e HL-2 do receptor de asialoglicoproteína, expressam um receptor funcional. Os fibroblastos transfectados que

expressam o receptor de asialoglicoproteína recombinante podem ser obtidos de acordo com o processo de Shia *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1158.

Numa forma de concretização preferida, a EPO des-sializada é removida de uma amostra que contém EPO, por incubação com células da linha celular de hepatoma humano, HepG2 (ATCC No. HB 8065), que são conhecidas por expressar naturalmente um receptor de asialoglicoproteína funcional, com uma densidade elevada (veja-se, por exemplo, Lodish (1991) Trends in Biochem. Sciences 16: 374. A linha celular HepG2 é descrita por Knowles *et al.* (1980) Science 209: 497 e na patente U.S. 4,393,133 de Knowles *et al.*

As condições adequadas para a incubação da amostra que contém EPO com células que expressam o receptor de asialoglicoproteína, podem ser determinadas pelo perito na arte e podem variar, dependendo do tipo de células e fonte da amostra. Numa forma de concretização, as células são crescidas até à sub-confluência, lavadas, e as suspensões celulares são adicionadas a poços de uma placa de cultura de tecidos. Cada poço que contém células aderentes é lavado várias vezes com tampão, o tampão é removido e os padrões de EPO ou as amostras teste são adicionados a cada poço. As células e as amostras contendo EPO são incubadas durante a noite (cerca de 15-20 horas) a 37°C, numa atmosfera humidificada de 5% de CO_2 e 95% de ar. Os sobrenadantes das misturas incubadas, que são designados por "amostras tratadas", de acordo com a presente invenção e a partir dos quais a EPO des-sializada foi adsorvida, são subsequentemente transferidos para recipientes, para análise da actividade proliferativa da EPO.

De modo a confirmar que a EPO des-sializada foi removida, quer por cromatografia de afinidade, quer por incubação com células que expressam o receptor de asialoglicoproteína, a EPO pode ser submetida a condições des-sializantes. Os métodos químicos e enzimáticos para a des-sialização são conhecidos dos peritos na arte. Em resumo, a EPO pode ser quimicamente des-sializada, aquecendo a 80°C durante 60 minutos em HCL 0,1 mol/l. A des-sialização pode também ser conseguida incubando a EPO com neuraminidase imobilizada. As condições específicas para a des-sialização da EPO são descritas por Spivak *et al.* (1989) Blood 73:90. Uma análise da EPO antes e depois da des-sialização, por exemplo por focagem isoeléctrica, pode ser utilizada para determinar se o ácido siálico foi removido.

Após tratamento da amostra que contém EPO, para adsorver a EPO des-sializada, como descrito acima, a actividade proliferativa de EPO da amostra tratada é determinada. Como descrito acima, o termo "amostra tratada" refere-se a uma amostra que foi tratada para remover a EPO des-sializada, por exemplo por cromatografia de afinidade de lectina ou por incubação com células que expressam um receptor de asialoglicoproteína funcional. A amostra tratada pode ser, por exemplo, um sobrenadante de cultura de células.

A actividade proliferativa pode ser determinada, por exemplo, medindo as alterações no número de células, ou a síntese de ADN de células que respondem a EPO, em resposta à incubação com a amostra tratada. De acordo com a presente invenção, as células que respondem a EPO são definidas como células que proliferam ou retêm a viabilidade em resposta a EPO. As células que respondem a EPO, que podem ser utilizadas para medir a actividade proliferativa in vitro da EPO, incluem

células progenitoras eritróides, explantadas de fresco de orgãos hematopoiéticos, linhas celulares estabelecidas que expressam naturalmente receptores de EPO e linhas celulares estabelecidas que foram manipuladas para expressar o gene receptor de EPO. As linhas celulares que expressam naturalmente os receptores de EPO são geralmente derivadas a partir de células malignas de animais que possuem tumores. Por exemplo, têm-se estabelecido linhas celulares eritróides de murídeo, a partir de ratinhos com eritroleucemia, infectados com o complexo do vírus de leucemia de Friend, ou com o complexo do vírus de leucemia de Rauscher. Foram estabelecidas linhas celulares humanas a partir de doentes com leucemia. Manipularam-se outras linhas celulares para produzir grandes quantidades de receptores de EPO e para tornar necessária a presença de EPO para sobreviver, por introdução e expressão do gene do receptor de EPO. Os sistemas celulares que respondem a EPO são conhecidos dos peritos na arte e foram revistos em Koury *et al.* (1992) Eur. J. Biochem 210:649.

Numa forma de concretização preferida, as células que respondem a EPO são células da linha celular progenitora, hematopoiética, multipotencial, B6SULtA, descrita por Greenberger *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931. A linha celular B6SUtA foi derivada a partir de culturas de medula óssea de longo termo de ratinhos B6.S.

A proliferação de células que respondem a EPO pode ser medida quantificando a síntese de ADN aumentada em resposta a EPO. A síntese de ADN aumentada é tipicamente determinada in vitro, medindo a incorporação de timidina tritiada. Conhecem-se testes adequados na arte e estes estão descritos, por exemplo, em Krystal *et al.* (1983) Exp. Hematol. 11:649 e Lewis

et al. (1989) Exp. Hematol. 17:102. Em resumo, incubam-se preparações de células que respondem a EPO, com amostras teste contendo EPO em poços de placas de microtítulo, tipicamente durante 22 horas, a 37°C, numa atmosfera humidificada de 5% de CO_2 e 95% de ar. Adiciona-se timidina tritiada a uma concentração final de cerca de 0,1 μCi/poço. Após mais duas horas de incubação, os conteúdos do poço são recolhidos em filtros de fibra de vidro e a radioactividade recuperada é medida por espectrometria de cintilação. Para padronização, a quantidade de radioactividade incorporada no ADN é representada graficamente em função da actividade de EPO, em mU/ml.

Numa forma de concretização preferida, que evita a utilização de radioactividade, a proliferação das células que respondem a EPO é medida espectrofotometricamente através da utilização do corante MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio) (Mossman, 1983, Immunological Methods 65, 55). O MTT tem uma cor amarelada em solução e é convertido em MTT formazina, azul escuro/púrpura, insolúvel em água, pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas. Os cristais azuis são solubilizados com isopropanol acídico e a intensidade é medida colorimetricamente, a 570 e 690 nm. Assim, a quantidade de MTT convertida na formazina corada é uma medida directa do número de células, que é um indicador da proliferação de células.

Utiliza-se a comparação entre as densidades ópticas das amostras desconhecidas com as dos padrões, para calcular a actividade biológica. Numa forma de concretização preferida, a amostra tratada é incubada com células que respondem a EPO, nos poços de uma placa de microtítulo, durante cerca de 46-50

horas, a 37°C, numa atmosfera humidificada a 5% CO_2 e 95% de ar. O MTT é então adicionado a cada poço e incubado durante duas horas a 37°C. Após solubilização dos cristais azuis, as densidades ópticas são medidas e a actividade da EPO é determinada comparando os números de células produzidos por uma amostra desconhecida, com uma curva padrão de EPO. O MTT está disponível no mercado, bem como kits que contêm o corante MTT e a solução de solubilização (kit MTT, Promega Corporation). Além do MTT, também se podem utilizar para o mesmo fim outros corantes indicadores, tais como o XTT (sal de sódio do ácido 3,3'-(1-((fenilamino)carbonil)-3,4-tetrazólio)-bis(4-metoxi-6-nitro)benzenosulfónico) e MTS (sal de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio).

Numa forma de concretização preferida do método da presente invenção, a EPO des-sializada é removida da amostra por incubação da amostra com células da linha celular de hepatoma humano HepG2 e a actividade de EPO in vitro é determinada incubando a amostra tratada, i.e. o sobrenadante das células HepG2, com células de uma linha celular dependente de EPO e medindo a proliferação ou viabilidade das células dependentes de EPO. Numa forma de concretização particularmente preferida, que é exemplificada a seguir no Exemplo 1, a linha celular dependente de EPO é B6SUtA e a proliferação de células, ou viabilidade é medida espectrofotometricamente, utilizando MTT.

Verificou-se, de acordo com a presente invenção, que a afinidade in vitro do receptor de asialoglicoproteína das células HepG2, para a EPO des-sializada, mimetiza, efectivamente, a função in vivo da eliminação rápida da EPO

des-sializada. Além disso, verificou-se que o meio de cultura de células que contém EPO pode induzir a proliferação de células que respondem a EPO.

Um outro aspecto da presente invenção proporciona um kit para a determinação da actividade da EPO in vivo, de uma amostra que contém EPO. Numa forma de concretização, o kit é compartimentalizado para receber um primeiro recipiente contendo células que expressam o receptor da asialoglicoproteína e um segundo recipiente que contém células dependentes de EPO. Numa forma de concretização preferida, as células que expressam o receptor da asialoglicoproteína são células HepG2 e as células dependentes de EPO são células B6SUtA. Noutra forma de concretização o kit compreende ainda um terceiro recipiente que contém MTT.

Os exemplos seguintes ilustram ainda a presente invenção. A invenção não deve ser considerada limitada por estes exemplos, mas apenas pelas reivindicações.

EXEMPLO 1

Crescem-se as células HepG2 em placas de cultura de tecido de 100 mm até se atingir a confluência. Neste ponto, as células são lavadas com solução salina tamponada com fosfato, tripsinizadas para as destacar da placa e faz-se uma suspensão de 0,25 x 10^6 células/ml em meio de cultura de células. Adiciona-se 1 ml desta suspensão a cada poço de uma placa de cultura de tecidos de 24 poços. Três dias mais tarde, as células HepG2 estão prontas a ser utilizadas num teste de EPO.

Cada poço contendo células HepG2 é lavado cinco vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após o PBS ter sido totalmente removido, adicionam-se a cada poço 100 µl de meio (MEM da Dulbecco, contendo 10% de soro fetal de vitela e glutamina). Inicia-se uma curva padrão de EPO, utilizando um padrão de referência de EPO a 10 U/ml e diluindo este duas vezes, por mistura de 100 µl de cada solução adicionada a um poço separado. As células mais as soluções de EPO são incubadas durante a noite, a 37°C, num incubador de humidade elevada, a 5% de CO_2. Após incubação, a curva padrão é preparada diluindo o padrão de 5 U/ml tratado com HepG2, cinco vezes em meio, obtendo-se uma solução 1 U/ml. Cada amostra tratada é diluída 10 vezes para se obterem soluções estimadas em 0,5 U/ml. Os padrões e amostras estão então prontos para o teste de proliferação. Aproximadamente ao mesmo tempo que os padrões e as amostras são adicionados às células HepG2, as células B6SUtA são preparadas para o teste de proliferação a ter início no dia seguinte. Estas células foram cultivadas em meio (como descrito acima) e suplementadas com 20 ng/ml de IL-3; passadas duas vezes por semana a uma diluição de 1:20. As células são preparadas, lavando uma vez com meio e reconstituindo no volume original, em meio sem IL-3. As células são incubadas durante a noite em placas de 100 mm (37°C, 5% CO_2). Após incubação, as células são lavadas mais uma vez em meio e ressuspendidas a uma concentração final de 1 x 10^6 células/ml. Utilizando uma placa de cultura de tecidos de 96 poços, misturam-se 50 µl de células B6SUtA com 50 µl de cada padrão de EPO e amostra. A placa é incubada 48 horas a 37°C num incubador de 5% de CO_2.

A proliferação ou viabilidade das células é medida com o kit MTT da Promega Corp. A quantidade de MTT convertido numa

formazina corada, está directamente relacionada com o número de células. O processo, em resumo, é como se segue. Adicionam-se 20 µl de corante MTT (Promega Corp.) a cada poço e incuba-se durante 2 horas, a 37°C. Em seguida, adiciona-se a cada poço 100 µl da solução de solubilização (Promega Corp.) e incuba-se à temperatura ambiente, até todo o precipitado azul escuro/púrpura estar dissolvido, normalmente 1-4 horas. A placa é então lida num leitor de placas a D.O. 570 nm e 690 nm. A actividade de EPO é determinada por comparação do número de células produzidas por uma amostra desconhecida, com a curva padrão de EPO. A potência é calculada dividindo a actividade calculada por 0,5 U/ml e multiplicando por 100%.

A tabela 1 mostra as densidades ópticas representativas e os valores calculados dos padrões de EPO numa gama de concentrações de 0-1000 mU/ml, determinado nas condições acima descritas. Como se pode ver a partir dos valores calculados, o método da presente invenção proporciona uma medida precisa dos padrões de EPO.

Quando os mesmos padrões são testados quanto à actividade proliferativa, na ausência de pré-incubação com células HepG2, obtêm-se resultados semelhantes, como apresentado na tabela 2. Estes resultados indicam que o tratamento das células com HepG2, não afecta de forma significativa a curva padrão de EPO.

As amostras com quantidades conhecidas e variadas de EPO des-sializada foram testadas pelo presente método e também na ausência de pré-incubação com células HepG2. Como se pode ver pela tabela 3, as amostras que contêm quantidades significativas de EPO des-sializada, induzem uma resposta

proliferativa maior, antes da incubação com as células HepG2 (R2), do que após incubação com as células HepG2 e adsorção da EPO des-sializada (R1). A tabela 3 também proporciona as quantidades esperadas de EPO sializada (intacta) e os valores calculados a partir das densidades ópticas, obtidas de acordo com o presente método. Como se pode ver pela tabela 3, o presente método é bastante preciso na quantificação da quantidade de EPO sializada (i.e., activa in vivo) numa amostra.

A presente invenção foi aqui descrita com referência a algumas formas de concretização preferidas e um exemplo. Uma vez que as variações óbvias serão evidentes para os peritos na arte, a invenção não deve considerar-se limitada àqueles, mas apenas às reivindicações.

TABELA 1

Actividade de EPO dos padrões após pré-incubação com células HEPG2

Padrão	Valor padrão		DO	Média	Desvio padrão	CV	Valor calculado
STD00	1000	mU/ml.	1.304 1.359 1.346	1.336	0.029	2.151	942.9 1080 1044
STD01	900.0	mU/ml.	1.244 1.233 1.337	1.271	0.057	4.494	824.6 805.6 1021
STD02	800.0	mU/ml.	1.223 1.215 1.282	1.240	0.037	2.951	788.9 775.9 896.4
STD03	700.0	mU/ml.	1.133 1.143 1.206	1.161	0.040	3.410	659.9 672.6 761.7
STD04	600.0	mU/ml.	1.114 1.088 1.125	1.109	0.019	1.713	636.6 606.6 649.9
STD05	500.0	mU/ml.	0.961 0.933 1.000	0.965	0.034	3.488	483.5 460.5 517.8
STD06	400.0	mU/ml.	0.827 0.874 0.836	0.846	0.025	2.950	383.0 415.6 389.0
SDT07	300.0	mU/ml.	0.691 0.704 0.671	0.689	0.017	2.414	300.1 307.4 289.0
STD08	200.0	mU/ml.	0.477 0.505 0.055	0.496	0.016	3.261	192.6 205.6 205.6
STD09	100.0	mU/ml.	0.269 0.270 0.272	0.270	0.002	0.565	99.79 100.2 101.1
STD10	0.000	mU/ml.	0.093 0.091 0.103	0.096	0.006	6.720	<<<<< <<<<< 10.30

TABELA 2

Actividade de EPO dos padrões sem pré-incubação com células HEPG2

Padrão	Valor padrão		DO	Média	Desvio padrão	CV	Valor calculado
STD00	1000	mU/ml.	1.439 1.539 1.572	1.517	0.069	4.566	923.1 1141 1236
STD01	900.0	mU/ml.	1.362 1.405 1.507	1.425	0.074	5.227	800.7 865.4 1062
STD02	800.0	mU/ml.	1.264 1.371 1.458	1.364	0.097	7.122	679.2 813.5 958.4
STD03	700.0	mU/ml.	1.251 1.242 1.340	1.278	0.054	4.240	665.2 655.7 770.6
STD04	600.0	mU/ml.	1.177 1.186 1.191	1.185	0.007	0.599	592.8 601.0 605.6
STD05	500.0	mU/ml.	1.071 1.085 1.093	1.083	0.011	1.028	505.9 516.4 522.6
STD06	400.0	mU/ml.	0.917 0.907 0.8881	0.902	0.019	2.061	403.7 397.8 382.8
SDT07	300.0	mU/ml.	0.724 0.785 0.724	0.744	0.035	4.732	300.8 331.1 300.8
STD08	200.0	mU/ml.	0.435 0.464 0.466	0.455	0.017	3.813	173.6 185.7 186.5
STD09	100.0	mU/ml.	0.271 0.288 0.285	0.281	0.009	3.225	104.6 112.0 110.7
STD10	0.000	mU/ml.	0.096 0.095 0.100	0.097	0.003	2.728	<<<<< <<<<< 4.484

TABELA 3

Quantificação da EPO intacta (sializada)

% EPO asialo	R1 p/ HepG-2 mU/ml	R2 p/o/ HepG-2 mU/ml	Razão R2/R1	k=0,15 EPO intacta calculada mU/ml	k=0,15 % EPO intacta calculada	EPO intacta esperada mU/ml	% precisão
0.00	289.10	303.60	1.05	286.54	1.00	300.0	0.96
10.00	268.60	352.80	1.31	253.74	0.89	270.00	0.94
20.00	261.70	424.20	1.62	233.02	0.81	240.00	0.97
30.0	254.70	494.20	1.94	212.44	0.74	210.00	1.01
40.00	217.60	555.40	2.55	157.99	0.55	180.00	0.88
50.00	214.60	628.30	2.93	141.59	0.49	150.00	0.94
60.00	213.40	693.60	3.25	128.66	0.45	120.00	1.07
70.00	192.30	755.50	3.93	92.91	0.32	90.00	1.03
80.00	196.10	959.90	4.89	61.31	0.21	60.00	1.02
90.00	178.60	999.20	5.59	33.79	0.12	30.00	1.13
100.00	150.80	1029.00	6.82	-4.18	-0.01	0.00	#DIV/0!

Lisboa, 29 de Novembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a determinação <u>in vitro</u> da actividade de eritropoietina (EPO) <u>in vivo</u>, numa amostra contendo EPO, que compreende tratar a amostra sob condições <u>in vitro</u> que removem a EPO des-sializada e medir a actividade de EPO <u>in vitro</u>, da amostra tratada.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referidas condições <u>in vitro</u> que removem a EPO des-sializada, compreendem cromatografia de afinidade de lectina.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referidas condições <u>in vitro</u> que removem a EPO des-sializada, compreendem incubação com células que expressam um receptor de asialoglicoproteína.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que as referidas células expressam o referido receptor de asialoglicoproteína, naturalmente, ou de forma recombinante.

5. Método de acordo com a reivindicação 3, em que as referidas células são células HepG2.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida actividade de EPO <u>in vitro</u> é medida incubando a referida amostra tratada com células que respondem a EPO e medindo a proliferação, ou viabilidade, das referidas células que respondem a EPO.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que as referidas células que respondem a EPO são células B6SUtA.

8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida proliferação das referidas células que respondem a EPO é medida determinando um aumento na síntese de ADN.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o referido aumento na síntese de ADN é medido determinando a incorporação de timidina tritiada.

10. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida proliferação das referidas células que respondem a EPO é medida espectrofotometricamente.

11. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a referida proliferação das referidas células que respondem a EPO é medida incubando as referidas células com brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e medindo a conversão de MTT em MTT formazina.

12. Método para a determinação <u>in vitro</u> da actividade de eritropoietina EPO <u>in vivo</u>, numa amostra contendo EPO, que compreende: (a) incubar a referida amostra com células HepG2; (b) remover o sobrenadante das referidas células HepG2; (c) incubar o referido sobrenadante com células B6SUtA; (d) medir a proliferação das referidas células B6SUtA; e (e) calcular a actividade de EPO.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a referida amostra que contém EPO é incubada com as referidas células

HepG2 durante cerca de 15 a 20 horas, a 37°C, numa atmosfera humidificada de 5% CO_2 e 95% de ar.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o referido sobrenadante é incubado com as referidas células B6SUtA durante cerca de 46 a 50 horas, a 37°C.

15. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a referida proliferação das referidas células B6SUtA é medida incubando as referidas células com MTT e medindo a conversão de MTT a MTT formazina.

16. Método de acordo com a reivindicação 12, em que a referida actividade de EPO é calculada comparando a proliferação produzida pela amostra contendo EPO, com a proliferação de um padrão de EPO.

17. Kit compartimentalizado, que compreende um primeiro recipiente contendo células que expressam um receptor de asialoglicoproteína e um segundo receptor contendo células que respondem a EPO.

18. Kit compartimentalizado de acordo com a reivindicação 17, em que as referidas células que expressam um receptor de asialoglicoproteína são células HepG2.

19. Kit compartimentalizado de acordo com a reivindicação 17, em que as referidas células que respondem a EPO são células B6SUtA.

Lisboa, 29 de Novembro de 2001
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL