

Descrição referente à patente de invenção de Leif Bæk, dinamarquês, médico, residente em Heinesgade 1, 4.tv., DK-2200 Copenhagen K, Dinamarca e de Claus Koch, dinamarquês, médico, residente em Overgaden oven Vandet 26, 1, DK-1415 Copenhagen K. Dinamarca, para "PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ENDOTOXINAS E PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS NESSA DETERMINAÇÃO".

DESCRIÇÃO

DOMÍNIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a determinação da presença de endotoxinas ou de substâncias semelhantes a toxinas numa amostra bem como de preparação de um anticorpo monoclonal e de um conjunto de análise ("test kit") que contém esse anticorpo útil para a referida determinação.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Os límulus Limulus polyphenus, Tachypleus tridentatus, Tachypleus gigas e Carcinoscorpius rotundicauda são artrópodes marinhos filogeneticamente primitivos que

não evoluíram significativamente durante os últimos 300 milhões de anos (1).

O límulo possui um sistema circulatório aberto que contém hemolinfa azul e o único elemento formado presente na hemolinfa é uma célula chamada amebócito (2).

A utilização do lisado do amebócito de límulo (LAL) como ensaio in vitro para a presença de endotoxinas resulta directamente da observação importante feita por Bang (3). Este autor observou que o límulo sofreu um tipo de coagulação intravascular disseminada (CID) quando ocorria uma infecção generalizada com bactérias marinhas gram-negativas. Esta observação in vitro inicial foi mais tarde ampliada pela descoberta de que a coagulação da hemolinfa de límulo pode ser produzida in vitro pela adição seja de bactérias gram-negativas viáveis seja de endotoxina purificada a partir da parede celular de bactérias gram-negativas (2). Foi também descoberto pelos mesmos investigadores (1) que o amebócito era a origem de todos os factores necessários para a coagulação da hemolinfa.

A aplicação corrente do ensaio como um método de análise in vitro para endotoxinas baseia-se no facto de que a disrupção física dos amebócitos que foram isolados a partir da hemolinfa por centrifugação dá origem a uma suspensão (LAL) que contém os componentes de coagulação que apenas podem ser em seguida activados por endotoxina bacteriana.

A aplicação deste princípio tornou o ensaio LAL o método presentemente disponível mais sensível para a detecção de bactérias gram-negativas, de endotoxinas e de lipossacarídeos (LPS). O LAL preparado por métodos de purificação correntes pode detectar com fiabilidade 0,1 ng/ml de endotoxina padrão de Escherichia coli purificada. Mostrou-se que o LAL detecta tanto as endotoxinas ligadas (associadas a células) como as endotoxinas livres (4) incorporadas na parede celular de virtualmente todas as bactérias gram-negativas. No entanto as endotoxinas preparadas por meio de diferentes métodos de extracção a partir de espécies diferentes podem variar amplamente em reactividade (5,6). Por estas razões, foi preparada uma endotoxina padrão de referência (EPR) pela US Food and Drug Administration

(USFDA) como meio de normalização dos ensaios de pirogênicos de LAL e de coelhos (Farmacopeia dos Estados Unidos XX) (7).

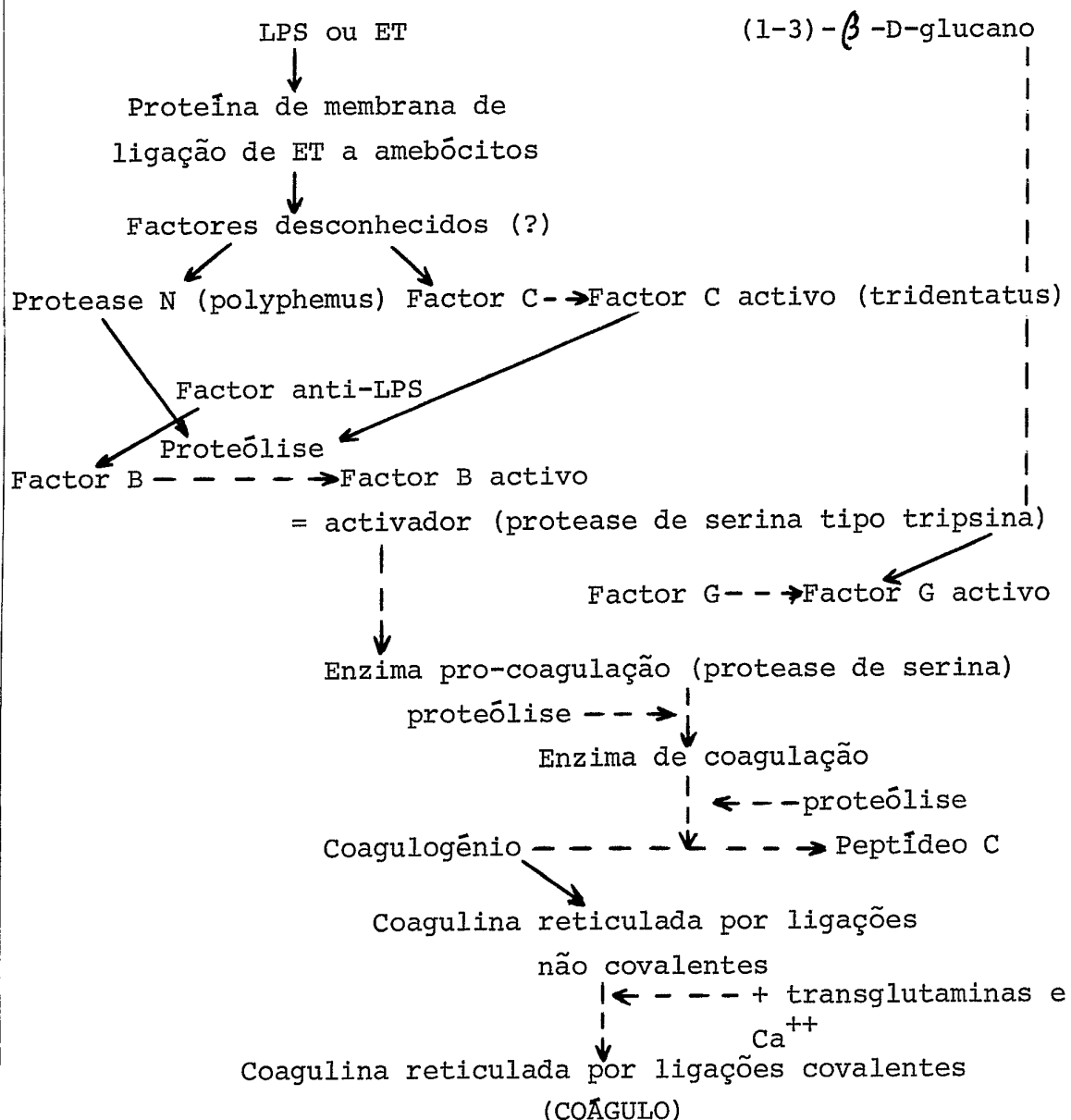
Podem ser preparados lisados de amebócito de reactividade semelhante em relação às endotoxinas a partir das 4 espécies de limulo.


Processos de coagulação em limulídeos

Os processos de coagulação em limulídeos correntemente conhecidos estão resumidos no Quadro 1.

QUADRO 1


PROCESSO DE COAGULAÇÃO EM LIMULÍDEOS





Coagulogénio celular: O Coagulogénio é constituído por uma cadeia polipeptídica com ligações internas de dissulfureto que são importantes para a estabilidade da forma polimerizável da molécula (8). Verificou-se que no Limulus polyphemus o coagulogénio é constituído por 220 ácidos aminados com um conteúdo de semi-cistina de 18 resíduos (9). Não se detectou qualquer grupo SH livre; verificou-se que o único resíduo N-terminal era glicina e que o seu resíduo C-terminal era serina (9). O coagulogénio é sempre convertido por uma enzima protease de serina. Após coagulação, a proteína do gel apresenta uma estrutura em hélice ao microscópio electrónico (10). Em Tachypleus tridentatus, o coagulogénio contém 132 a 135 ácidos aminados incluindo níveis elevados de ácidos aminados de carácter básico, com uma alanina N-terminal e uma fenilalanina C-terminal. No Limulus, a formação de coágulo parece envolver a cisão da única ligação peptídica Arg-Lys no coagulogénio (11,9). Os N-peptídeos interactuam entre si de forma não covalente dando origem ao coágulo insolúvel. Em Tachypleus tridentatus, a formação enzimática do gel envolve uma proteólise limitada das ligações peptídicas Arg-Gly e Arg-Thr localizadas na porção N-terminal do coagulogénio, libertando deste modo o peptídeo (12,13). O fragmento C no Limulus contém principalmente ácidos glutâmico e aspártico (14). Embora Liu et al. (9) tenham detectado um peptídeo C com 45 ácidos aminados nesta espécie, Nakamura et al. (13) e Shishikura et al. (15) afirmaram que este peptídeo C tinha 28 resíduos de ácidos aminados arranjados numa sequência específica de cada espécie.

Enzima de coagulação: A enzima de coagulação é uma protease de serina. Esta enzima existe sob duas formas activas com pesos moleculares de 78 000 e de 40 000, respectivamente, e com uma composição de ácidos aminados muito similar, o que indica uma relação monómero-dímero (9). Em Tachypleus tridentatus, a enzima de coagulação não reduzida é descrita como uma glicoproteína com um peso molecular de 42 000 que se agrega para formar uma proteína com um PM de 350 000. A enzima de coagulação é originada a partir de uma pro-enzima de coagulação inactiva. A pro-enzima de coagulação pode ser activada de dois modos independentes (quadro 1): pelo LPS de bactérias gram-negativas ou pelos (1-3)- β -D-glu




canos a partir das paredes celulares de certos fungos e algas. Coagulação mediada pelos LPS: Em primeiro lugar foi demonstrado que as endotoxinas ou os LPS activam uma pro-enzima de coagulação do tipo protease de serina (16,11). Em segundo lugar, verificou-se que estava também envolvido na coagulação de LAL induzida por LPS um factor B adicional ou pro-activador uma vez que este activava a pro-enzima de coagulação (17,18). Esta activação provavelmente envolve uma proteólise limitada, isto é, de uma ligação arginil-X ou lisil-X da pro-enzima de coagulação (18). Finalmente, observou-se que este pro-activador era convertido num factor B ou activador activo (isto é, protease de serina do tipo tripsina) por outra enzima proteolítica chamada protease N (factor C em *I. tridentatus*) que parece ser dependente de LPS (18, 19). Estas observações sucessivas indicam que este processo de coagulação representa uma cascata enzimática complexa que poderá também incluir outros factores desconhecidos (Quadro 1).

Factores anti-coagulação: Uma proteína de 80 KD da membrana do amebócito liga-se especificamente à endotoxina ou ao LPS (9,20). De acordo com os autores, esta proteína receptora pode reconhecer e imobilizar pequenas quantidades de LPS em sangue de *Limulus* sem coagulação intravascular maciça. Além disso, está presente no amebócito da hemolinfa de *Tachypleus tridentatus* e de *Limulus polyphemus* um anti-coagulante (factor anti-LPS) que inibe a coagulação induzida por LPS (21). Este anticoagulante inibe a activação do factor B mas não a sua actividade. A outra via de coagulação mediada não é afectada pelo factor anti-LPS (21).

Coagulação mediada por (1-3)- β -D-glucano: Tanto o agente anti-tumor (1-3)- β -D-glucano como outros polissacarídeos anti-tumor possuem uma capacidade elevada de causar a gelificação de LAL (22) por meio da activação de um factor G que actua sobre a pro-enzima de coagulação (23).

Diferentes métodos para detectar endotoxinas por meio de LAL

O método mais frequentemente usado é de longe o ensaio de coágulo. Este método baseia-se no facto de que o resultado final da cascata de reacções no LAL quando reage com uma endotoxina é um gel opaco ou um coágulo. O ensaio



é levado a efeito como se segue: mistura-se 0,1 ml de LAL com 0,1 ml da solução a analisar num tubo de ensaio. Incuba-se a mistura a 37° C num banho de água durante uma hora. O ensaio é reconhecido como positivo se se forma um coágulo e se o coágulo é estável quando o tubo de ensaio é invertido 180°. Têm sido descritas reacções menos intensas que se manifestam por um aumento de viscosidade com um aspecto de grânulos semelhantes a amido que aderem à parede do tubo de ensaio, muitas vezes simultaneamente com um aumento da opacidade. A subjectividade dos pontos que marcam o fim de uma formação de gel não completa têm constituído motivo de crítica deste método de realização do ensaio. Esta crítica é especialmente importante quando se ensaiam especímenes clínicos por causa da interferência de várias substâncias.

Foram publicadas outras modificações do ensaio de LAL com base nos estudos acima mencionados do mecanismo da reacção em LAL. Estas modificações incluem um método turbidimétrico (24), um método cromogénico (25), um método colorimétrico (26), um método nefelométrico (27), métodos cinéticos (28 a 30), diferentes métodos de lâmina (31 a 36), métodos de tubos capilares (38, 39), um método de microdiluição (40), um método de gotas de LAL (41), um método de marcação por radioisótopos de coagulogénio (42) e um método imuno-electroforético que mede a perda de antigenicidade do coagulogénio quando este é cindido pela enzima activada por LPS (43). Em todos estes métodos, excepto no método imuno-electroforético (43), o resultado do método é lido visualmente ou indirectamente por meio de algum tipo de equipamento.

Especificidade do LAL para as endotoxinas

A especificidade da reacção do LAL em relação às endotoxinas ou aos LPS tem sido questionada por vários investigadores. Foi descrito que a trombina, a tromboplastina e certos polinucleótidos sintéticos dão todos como resultado um ensaio LAL positivo (44). O peptidoglicano de bactérias gram-positivas (45), endotoxinas derivadas de Streptococci do grupo A (46), vários polissacarídeos simples, incluindo mananos de levedura e dextranos bacterianos (47), derivados sintéticos de dex

trano (48) e ditiões (49) causam a gelificação do LAL.

O ensaio de LAL tem sido usado para determinar a actividade biológica de moléculas semelhantes a endotoxinas purificadas a partir de material da membrana de vários organismos. Foram obtidos ensaios LAL positivos com ácido lipoteicóico de Streptococcus faecalis (50), com lipoglicanos de diferentes estirpes de Mycoplasma (51, 52), com facções da parede celular de Micropolyspora faeni (53) e Chlamydia psittaci (54) e com preparações puras de Plasmodium berghei (55) e com extractos por mistura de água-fenol quentes de Listeria monocytogenes (56).


Recentemente tem sido posta em dúvida a utilidade clínica do ensaio LAL. Elin (57) levou a efeito uma análise estatística de 17 estudos diferentes em pacientes humanos com LAL e sangue e concluiu que a utilidade clínica do ensaio LAL para o diagnóstico de septicemia gram-negativa é marginal. Outros estudos por Tubos (58) e por Galloway et al. (59), respectivamente, mostraram que o plasma de pacientes infectados com Borrelia recurentis dava reacção positiva no ensaio com LAL.

Em quase todos os estudos mencionados acima foram usados métodos subjectivos para ler o resultado do ensaio LAL, sendo um ensaio positivo definido como a gelificação ou um aumento de turvação.

A prova mais difícil para o ensaio LAL era a detecção de endotoxinas em sangue ou em plasma. Em primeiro lugar, a concentração de endotoxina em circulação no sangue é normalmente baixa por causa da rápida destruição no fígado. Em segundo lugar, o plasma contém inibidores do LAL, substâncias que inactivam as endotoxinas e proteínas que se ligam às endotoxinas.

Têm sido usados vários métodos para extrair as endotoxinas do plasma. Os melhores resultados foram obtidos por uma combinação de diluição e de aquecimento do plasma (43).

Experiências com um método imunoelectroforético de projecção para determinar a reactividade do LAL com uma endotoxina (43) mostraram que este método possui um mais alto grau de precisão e de sensibilidade em comparação com



vários outros métodos e é apropriado para finalidade de diagnóstico.


Estudos imunolectroforéticos da interacção entre o LAL e os antigenes solúveis de Pseudomonas aeruginosa e de Staphylococcus aureus mostraram que o LAL é altamente reactivo com LPS mas pode também reagir com outros antigenes de bactérias gram-negativas e gram-positivas (60).

O ensaio LAL na indústria farmacêutica

A principal utilização do ensaio LAL tem sido na indústria farmacêutica que actualmente leva a efeito centenas de milhares de ensaios por ano sobre vários fluidos parenterais de grande e de pequeno volume, produtos bioquímicos e instrumentos médicos. O ensaio LAL é actualmente realizado correntemente tanto para o controlo durante o processo como para a aprovação final de muitos fluidos injectáveis e de instrumentos médicos de intervenções produzidos pela indústria farmacêutica em todo o mundo.

Aplicações clínicas do ensaio LAL

As aplicações clínicas do ensaio LAL foram discutidas exhaustivamente por Jørgensen (61). A conclusão que se pode tirar deste estudo de conjunto das aplicações clínicas do ensaio LAL é que foram descritas várias aplicações úteis desde a introdução do ensaio no fim dos anos 1960. Todas estas aplicações beneficiaram da velocidade, sensibilidade e especificidade geral do ensaio LAL para as endotoxinas bacterianas, tanto para as endotoxinas ligadas de bactérias gram-negativas viáveis como de endotoxinas livres como evidência residual de crescimento bacteriano anterior ou periódico. Em todas estas aplicações, verificou-se que o ensaio LAL é superior em alguns aspectos aos métodos convencionais de diagnóstico de endotoxinas bacterianas. No entanto, nenhuma destas aplicações substituiu métodos convencionais de modo que o ensaio LAL seja usado isoladamente para diagnóstico. Em vez disso o ensaio LAL é um meio auxiliar poderoso para a determinação da presença de bactérias gram-ne



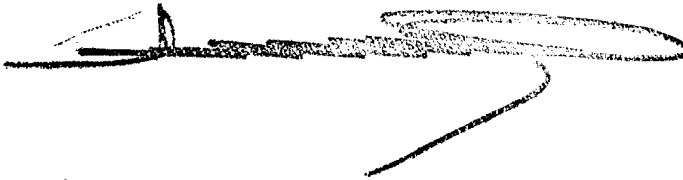
gativas numa variedade de casos clínicos. Tem utilizações de diagnóstico correntes válidas (meningite, infecções oculares, bacteriúria) e pode eventualmente conduzir a uma melhor compreensão de outras consequências patofisiológicas das endotoxinas, isto é, a endotoxemia.

RESUMO DA INVENÇÃO


Os inventores da presente invenção desenvolveram agora um novo processo para a determinação da reacção entre o lisado do amebócito de Limulus ou de Tachypleus e as endotoxinas. O processo apresenta a mesma sensibilidade e a mesma especificidade para as endotoxinas que o método imunoelectroforético de projecção (43) mas não necessita de equipamento muito especializado ou de pessoal de alto grau de preparação para a sua realização de tal modo que pode ser levado a efeito praticamente em todos os laboratórios clínicos. É também mais simples pois é menos demorado e mais económico e necessita de menores quantidades de reagente de lisado de amebócito. O novo processo apresenta por conseguinte uma importante vantagem económica em comparação com os métodos conhecidos.

Deste modo, a presente invenção refere-se a um processo para a determinação da presença de uma endotoxina ou de material semelhante a uma endotoxina numa amostra, compreendendo:

- a) a incubação da amostra com um componente do lisado do amebócito ou da hemolinfa do límulo ou de um análogo sintético deste, sendo as propriedades do referido componente alteradas se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina, de tal modo que não tenha lugar qualquer reacção com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou com um seu determinante imunológico, ou de tal modo que o produto da reacção do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou com um material semelhante a uma endotoxina na amostra reaja com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido produto da reacção ou um seu determinante imunológico,

- 
- b) reacção da mistura incubada da referida amostra e do referido componente ou análogo resultante da fase a) com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou com um seu determinante imunológico, estando o anticorpo ligado ao referido componente ou ao referido análogo presente na mistura, ou com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido produto da reacção ou um seu determinante imunológico, estando o anticorpo ligado ao referido produto da reacção presente na mistura, e
- c) determinação da presença de qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo ligado na misturada reacção resultante da fase b), de tal modo que a detecção de quantidades decrescentes de anticorpo ligado mostre a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou contra um seu determinante imunológico e a detecção de quantidades crescentes de anticorpo ligado mostre a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido produto da reacção ou contra um seu determinante imunológico, com a condição de que quer o referido componente ou análogo quer o produto da reacção presente depois da incubação da amostra com o componente ou análogo na fase a) estão ligados a um suporte sólido ou o referido anticorpo está ligado a um suporte sólido ou a uma molécula que forme uma ponte ligada a um suporte sólido ou uma endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina presentes na amostra estão ligados a um suporte sólido.


No presente contexto, "endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina" é definido como uma substância que é normalmente um componente da superfície exterior da membrana bacteriana e que é normalmente um pirogênio, isto é, induz febre. Demonstrou-se que a parte biologicamente activa de



uma endotoxina de uma bactéria gram-negativa é um lipopolissacarídeo, sendo a fracção lipídica (lípidos) responsável pelas propriedades pirogênicas e endotóxicas do lipopolissacarídeo. Demonstrou-se no entanto (45, 46, 60) que outros antígenos superficiais também podem reagir com LAL, incluindo antígenos superficiais de bactérias gram-positivas, e deste modo a expressão inclui qualquer material ou componente bacteriano ou de outro microorganismo, como seja de fungos, leveduras ou algas, que apresente reacção com LAL (22, 23, 47, 48).

O termo "componente do lisado do amebócito ou hemolinfa de límulo" deverá ser entendido como incluindo o lisado integral ou a hemolinfa bem como os componentes reactivos individuais destes, contendo o lisado integral ou a hemolinfa estes componentes reactivos que reagem com a endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina. Um componente normalmente preferido para a utilização no processo da presente invenção é o coagulogénio (tal como se encontra presente no lisado integral). O lisado e a hemolinfa podem ser derivados de qualquer das espécies de límulos, isto é, de Limulus polyphemus, de Tachypleus tridentatus e de Carcinoscorpius rotundicauda, sendo normalmente preferidos os lisados de Limulus e de Tachypleus.

O termo "análogo sintético" deve ser compreendido como significando uma substância que apresente a mesma ou substancialmente a mesma reactividade com uma endotoxina ou com um material semelhante a uma endotoxina como um componente de ocorrência natural no lisado do amebócito ou na hemolinfa do límulo. Este análogo pode ser preparado por síntese química, por exemplo por um método habitual de síntese de peptídeos, de preferência por síntese de peptídeos em fase sólida, ou por técnicas de ADN recombinante envolvendo a clonagem de um gene que codifique para o referido componente num vector de expressão conveniente, transformação de um microorganismo apropriado com o vector recombinante resultante, cultura do organismo num meio apropriado para a expressão do referido gene e isolamento a partir do meio de cultura do componente produzido deste modo. Os componentes específicos a utilizar no processo da presente invenção podem ser seleccionados de entre o grupo constituído por um factor de coagulação, por exemplo factor B, factor C, factor G,

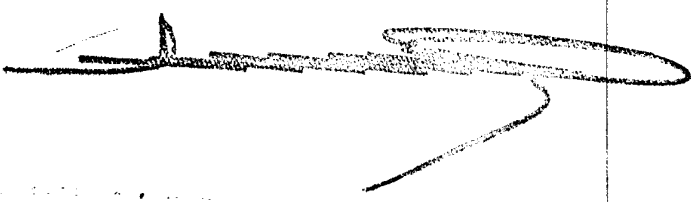


factor N, pro-enzima de coagulação, enzima de coagulação activada factor anti-LPS ou coagulogénio, e uma aglutinina, por exemplo uma lecitina, como limulina ou polifemina, sendo o factor de coagulação normalmente encontrado nos amebócitos e a aglutinina na hemolinfa.

O termo "produto da reacção do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina na amostra" deve ser compreendido como significativa qualquer produto resultante de uma cisão catalisada enzimaticamente ou de outra alteração induzida enzimaticamente (por exemplo, na estrutura terciária de uma proteína) de uma substância (incluindo outras enzimas na cascata enzimática acima descrita) activada pela presença de uma endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina na amostra na cascata enzimática acima descrita. O produto da reacção pode ser seleccionado de entre o grupo constituído por coagulina, peptídeo C, enzima de coagulação activada, factor b, C, G ou N activado ou produtos de cisão destes factores e da pro-enzima de coagulação.

O termo "amostra" é definido como qualquer material a ser ensaiado para determinação da presença de uma endotoxina. Este termo inclui de preferência qualquer dos materiais habitualmente submetidos a análise de pirogénios.


Assim, a amostra pode ser seleccionada de entre preparados farmacêuticos, tais como fluídos parenterais ou fluídos injectáveis, isto é, preparados contendo uma substância activa, como seja um produto químico ou um nutriente, e instrumentos médicos usados para inserção no corpo de um paciente, por exemplo, instrumentos para implantação, tais como cânulas ou cateteres. Outros materiais normalmente submetidos a análise de pirogénios incluem mitogénios, produtos bioquímicos, incluindo meios nutrientes e tampões, produtos alimentares, água potável e água usada para a indústria farmacêutica. Além disso, a amostra pode ser seleccionada de entre fluídos corporais, tais como urina, fluído cerebrospinal, sangue, soro, plasma ou qualquer produto preparado a partir de sangue ou linfa, tornando deste modo possível o diagnóstico de doenças induzidas por endotoxinas pelo processo da presente invenção. Um inconveniente dos métodos conhecidos para



a detecção de pirogênios em amostras clínicas tem sido que estas análises conhecidas, quando realizadas em amostras de fluidos corporais, principalmente plasma e soro, não apresentam a especificidade e a sensibilidade necessárias para o diagnóstico de bacteremia e de septicemia. Surpreendentemente constatou-se que o processo da presente invenção pode ser utilizado para a detecção de modo preciso de mesmo quantidades diminutas (ao nível do picograma) de endotoxinas no plasma e no soro.

No contexto presente, o termo "determinante imunológico" refere-se a uma subsequência do referido componente ou análogo contra o qual podem ser suscitados anticorpos que apresentam propriedades desejáveis no processo de ensaio da presente invenção ou que reagem com um anticorpo. Deste modo, o determinante imunológico pode ser por exemplo uma sequência incluindo um local de cisão pelo qual o componente ou o análogo é cindido na cascata enzimática acima descrita. O termo "anticorpo" refere-se a uma substância que é formada como uma resposta de um animal ou de uma célula animal à exposição ao referido componente ou análogo ou produto de reação. A fim de assegurar uma especificidade e uma sensibilidade adequadas no processo de ensaio da presente invenção, o anticorpo é de preferência um anticorpo monoespecífico que apresente especificidade em relação a um componente único do lisado do amebócito ou da hemolinfa de límulo e não em relação a vários componentes ou ao lisado integral ou à hemolinfa. Para alguns fins, o anticorpo pode ser um anticorpo policlonal mas é geralmente preferível que o anticorpo seja um anticorpo monoclonal uma vez que deste modo se assegura uma especificidade e uma sensibilidade da análise mais elevadas permitindo por conseguinte uma determinação mais precisa da endotoxina ou de materiais semelhantes do que os métodos de ensaio LAL habituais, necessitando simultaneamente de uma menor quantidade do componente ou do análogo do ensaio, o que torna o processo da presente invenção de utilização mais econômica.


De acordo com a presente invenção, a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina pode ser determinada tanto de modo negativo como de modo positivo. A determinação negativa resulta da utilização de



um anticorpo contra o referido componente ou análogo para a reacção com a mistura incubada da amostra e do componente ou análogo, utilizando a incapacidade do anticorpo para se ligar a um produto da reacção da incubação da amostra com o componente ou análogo. Se após a reacção se detecta pouco ou nenhum anticorpo, ou se, pelo menos, se detecta uma quantidade de anticorpo ligado diminuída de modo significativo em comparação com a amostra de comparação isenta de endotoxina, este facto indica a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra, uma vez que mostra que o componente ou análogo foi cindido por via enzimática ou teve a sua estrutura alterada de outro modo por via enzimática devido à presença da endotoxina de tal modo que o anticorpo dirigido contra o componente ou o análogo já não é capaz de se ligar. Por outro lado, se o anticorpo é um anticorpo dirigido contra o referido produto de reacção, o anticorpo adicionado na fase b) do processo da presente invenção liga-se no ensaio (ou, pelo menos, quantidades crescentes do anticorpo se ligam em comparação com uma amostra de comparação isenta de endotoxina), proporcionando deste modo uma determinação positiva da endotoxina ou do material semelhante a uma endotoxina na amostra.

O método da presente invenção é adequado tanto para a análise qualitativa como para a análise quantitativa de endotoxinas. Para determinações quantitativas, a quantidade de anticorpo ligado no ensaio pode ser determinada por diluições em série das amostras de modo conhecido em si (cf. 43).

Quando, de acordo com a presente invenção, qualquer dos referidos componentes ou análogos ou qualquer dos referidos produtos de reacção que permaneça presente após a incubação da amostra com o componente ou análogo na fase a) do método acima está acoplado a um suporte sólido, é possível então adicionar ao suporte sólido um anticorpo contra o componente ou análogo ou contra o produto de reacção, demonstrando a ausência de anticorpo ligado ou a presença de uma quantidade menor do anticorpo ligado em comparação com uma amostra de comparação isenta de endotoxina, no primeiro caso, a presença de endotoxina



na amostra. No último caso, a presença de anticorpo ligado demonstra a presença de endotoxina na amostra.

Em alternativa, o anticorpo é acoplado a um suporte sólido ou a uma molécula que forme uma ponte acoplada a um suporte sólido e qualquer componente que reste após a incubação da amostra com o componente ou com o análogo na fase a) do processo da presente invenção é ligado ao anticorpo para reacção adicional com uma quantidade adicional de anticorpo.

Uma outra alternativa consiste em acoplar qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina na amostra a um suporte sólido. Neste momento pode incubar-se com o componente ou análogo por adição do componente ou análogo ao suporte sólido e em seguida adicionar um anticorpo marcado que pode ser um anticorpo contra o componente ou análogo ou então contra o produto da reacção resultante da incubação do componente ou análogo com a amostra. Neste caso, o componente (ou análogo) deverá ser o lisado integral ou a hemolinfa ou o composto no lisado com o qual a endotoxina reage para induzir a cascata enzimática acima descrita.

De acordo com um outro seu aspecto, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação de um anticorpo monoclonal utilizado no processo de análise da presente invenção, sendo o anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra um componente do lisado do amebócito ou da hemolinfa do límulo ou contra um seu análogo sintético ou um seu determinante imunológico.

De acordo com um outro seu aspecto, a presente invenção refere-se a um processo para a preparação de um conjunto de análise ("test kit") para a determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina numa amostra, contendo

- a) um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra um componente do lisado do amebócito ou da hemolinfa do límulo ou contra um seu análogo sintético ou um seu determinante imunológico ou um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra um produto da reacção

do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou com um material semelhante a uma endotoxina ou um seu determinante imunológico, e

- b) um componente de lisado de amebócito ou de hemolinfa de límulo ou um seu análogo sintético.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Conforme indicado acima, a ligação do anticorpo com o referido componente ou análogo ou com o referido produto de reacção é de preferência um anticorpo monoespecífico contra um componente específico no lisado do amebócito ou hemolinfa do límulo (ou um seu análogo sintético). O anticorpo moespecífico pode ser preparado por injeccção num animal adequado com um preparado substancialmente puro do componente ou análogo em questão seguida de uma ou mais injeccções de reforço a intervalos adequados (por exemplo, duas semanas a um mês) até seis meses antes da primeira sangria. Em seguida, enquanto se continua este regime estabelecido de imunização, os animais são sangrados cerca de uma semana depois de cada reforço de imunização, e o anticorpo é isolado a partir do soro de um modo normal, por exemplo conforme descrito em Harboe e Ingild, Scand. J. Immun. 2 (Supl. 1), 1973, pp. 161-164.

Para finalidades que não requeiram uma especificidade elevada, o anticorpo pode ser um anticorpo policlonal. Podem ser obtidos anticorpos policlonais substancialmente conforme descrito em Harboe e Ingild, op. cit.. Na maioria dos casos, no entanto, é preferível que o anticorpo usado no processo da presente invenção seja um anticorpo monoclonal uma vez que este geralmente proporciona uma maior especificidade e uma maior precisão da análise, necessitando ao mesmo tempo de menos tempo para a sua realização. Para além disso, pode utilizar-se uma mistura de dois ou de mais anticorpos monoclonais diferentes, uma vez que deste modo é possível aumentar o limite de detecção e a sensibilidade do ensaio. O anticorpo monoclonal pode ser obtido de acordo com o processo descrito seguidamente.


O anticorpo usado no processo de análise da presente invenção encontra-se de preferência sob for-

ma substancialmente pura a fim de melhorar a precisão da análise.

Em alguns casos, como por exemplo quando o anticorpo está acoplado a partículas sólidas (como explicado abaixo) que se aglutinam quando o anticorpo reage com a substância contra a qual está dirigido (isto é, o componente, o análogo ou o produto da reacção), o anticorpo pode ser usado sob uma forma não modificada. No entanto, para a maior parte das finalidades, o anticorpo é de preferência proporcionado com uma marcação para a detecção de anticorpo ligado ou, em alternativa (como seja numa análise de anticorpo duplo), pode utilizar-se uma combinação de um anticorpo marcado com um anticorpo não marcado. A substância usada para marcação pode ser seleccionada de qualquer substância que seja detectável por si própria ou que possa ser feita reagir com outra substância a fim de produzir um produto final detectável. Deste modo, a marcação pode ser seleccionada de entre o grupo constituído por enzimas, substâncias fluorescentes ou quimioluminescentes, cromóforos, isótopos radioactivos e agentes complexantes.

Exemplos de enzimas úteis como marcação são peroxidases (por exemplo, peroxidase de rábano bastardo), fosfatases (por exemplo, fosfatase ácida), β -galactosidase, urease, glucose-oxidase, anidrase carbônica, glucoamilase, lisozima, malato-de-hidrogenase, glucose-6-fosfato-de-hidrogenase e ribonuclease.

As enzimas não são detectáveis por si mas podem ser combinadas com um substrato a fim de catalisar uma reacção cujo produto final seja detectável. Deste modo, pode ser adicionado um substrato à mistura reaccional resultante da fase b) acima dando como resultado um produto colorido, fluorescente ou quimioluminescente ou uma mudança de cor ou uma mudança na intensidade da cor da fluorescência ou da quimioluminescência. São exemplos de substratos úteis no processo da presente invenção como substratos para as enzimas mencionadas acima H_2O_2 , p-nitrofenilfosfato, lactose, ureia, β -D-glucose, CO_2 , éster de colina, amido, M. lysodeikticus, maleato, glucose-6-fosfato e ARN. O substrato pode ser combinado com, por exemplo, um cromóforo que pode tanto ser um dador como um aceitador.




As substâncias fluorescentes que podem ser usadas como marcação para a detecção directa de anticorpo ligado podem ser seleccionadas de entre o grupo constituído por 4-metilumbeliferil-D-galactopiranosido, 4-metilumbeliferil-fosfato e ácido 3-(p-hidroxifenil)-propiónico. Estas substâncias são detectáveis por si próprias por meio de um espectrofotómetro de fluorescência, permitindo uma medida da fluorescência tanto qualitativa como quantitativa.

As substâncias quimioluminescentes que podem ser usadas como marcação para a detecção da ligação do anticorpo podem ser seleccionadas de entre o grupo constituído por isoluminol/EDTA/H₂O₂, peroxidase/eosina/EDTA e luciferase e um substrato apropriado. Estas substâncias são elas próprias detectáveis por meio de um espectrofotómetro, permitindo uma medida da quimioluminescência tanto qualitativa como quantitativa.

Os cromóforos que podem ser usados como marcação para a detecção do anticorpo ligado podem ser seleccionados de entre o grupo constituído por ácido 5-aminossalicílico, ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico, o-fenilenodiamina, o-diaminoicidina, 3-metil-2-benzotiazolina-hidrazona, ácido 3-(dimetilamino)-benzóico, o-toluidina, 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, o-nitrofenil- β -D-galactósido e p-nitrofenil-fosfato. Estas substâncias podem ser detectadas por si próprias por meio de um espectrofotómetro e ser usadas para a determinação tanto quantitativa como qualitativa da cor, por exemplo da intensidade da cor ou de uma mudança de cor.

Os isótopos radioactivos que podem ser usados para a detecção do anticorpo ligado podem ser seleccionados de entre o grupo constituído por ¹²⁵I, ³H, ³⁵P, ¹³¹I e ¹⁴C. A radioactividade emitida pelos isótopos pode ser medida num contador γ ou num contador de cintilação, permitindo uma medição qualitativa e quantitativa da radioactividade ligada.

Os agentes complexantes que podem ser usados para a detecção do anticorpo ligado podem ser seleccionados de entre o grupo constituído por biotina (que forma um complexo com avidina e com estreptavidina), proteína A (que forma um complexo com imunoglobulinas) e lectina (que forma um com-



plexo com determinantes de hidratos de carbono, por exemplo com receptores). Neste caso, o complexo não é detectável directamente por si próprio, necessitando de marcação da substância com a qual o agente complexante forma um complexo. A marcação pode ser levada a efeito com qualquer das substâncias indicadas acima para a marcação do anticorpo, isto é, um cromóforo, uma enzima ou uma substância radioactiva.

Quando, no processo da presente invenção, o anticorpo está acoplado a uma molécula em ponte ligada a um suporte sólido, a molécula em ponte que serve de ligação entre o suporte sólido e o anticorpo pode ser seleccionada de entre o grupo constituído por glutaraldeído, carbodiimida, lisina, proteína A e hidrazina. O anticorpo pode ser marcado ou não marcado e, de acordo com um modo de concretização do processo da presente invenção, um anticorpo não marcado pode estar acoplado a um suporte sólido adicionando-se em seguida de forma sequencial a mistura incubada do componente ou análogo e a amostra e o anticorpo marcado.

O suporte sólido empregado no processo da presente invenção contém de preferência um polímero. O suporte pode ser constituído ele próprio por um polímero ou pode conter uma matriz revestida com o polímero. A matriz pode ser de qualquer material sólido adequado para a presente finalidade, tal como vidro, papel ou plástico. O polímero que pode constituir por si próprio o suporte sólido ou que está aplicado sobre uma matriz pode ser seleccionado de entre o grupo constituído por plástico, celulose, tal como papel de nitrocelulose, papel activado por brometo de cianogénio, papel de cloreto de 1-(3-nitrobenziloximetil)-piridínio, papel de diazobenziloximetilo, papel de nitrobenziloximetilo ou papel de aminobenziloximetilo, um polímero de silicone e sílica ou um silicato. São exemplos de plásticos adequados látex, um poliestireno, cloreto de polivinilo, poliuretano, poliacrilamida, acetato de polivinilo e qualquer copolímero adequado destes plásticos. Exemplos de polímeros de silicone incluem siloxano; exemplos de silicatos incluem vidro. O polímero pode, opcionalmente, conter grupos funcionais a fim de facilitar a ligação de um reagente particular que forme parte da

~~CONFIDENTIAL~~


cascata enzimática acima explicada, sendo exemplos destes grupos as moléculas em ponte mencionadas anteriormente, opcionalmente acopladas a um suporte sólido.

A forma física do suporte sólido não é particularmente crítica, embora algumas formas possam ser mais convenientes ao uso do que outras para finalidades específicas. Deste modo, o suporte sólido pode ter a forma de uma placa, por exemplo uma camada fina ou, de preferência, uma placa de microtitulação, ou de tiras, películas ou partículas sólidas, incluindo bactérias revestidas de proteína A, ou papel. As partículas sólidas para utilização no processo da presente invenção têm normalmente uma dimensão na gama de cerca de 1 a 10 um.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS PREFERIDAS DE CONCRETIZAÇÃO

De acordo com uma forma de concretização, o processo da presente invenção compreende


- a) o acoplamento de um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogénio ou contra um seu determinante imunológico ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico a um suporte sólido ou a uma molécula em ponte acoplada a um suporte sólido,
- b) a incubação de uma amostra com um material contendo coagulogénio de modo a provocar a cisão do coagulogénio dando origem a coagulina e peptídeo C se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina,
- c) a adição da mistura incubada resultante da fase b) ao suporte sólido de modo a ligar todo o coagulogénio presente na amostra se o anticorpo acoplado ao suporte sólido é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogénio ou contra um seu determinante imunológico, ou de modo a provocar a ligação de toda a coagulina ou todo o peptídeo C presentes na amostra se o anticorpo acoplado ao suporte sólido é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico,
- d) adição ao suporte sólido de um anticorpo marcado suscitado


contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico de modo a provocar a ligação a todo o coagulogênio presente ligado ao suporte sólido ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico de modo a provocar a ligação a todo o coagulogênio presente ligado ao suporte sólido ou a toda a coagulina ou todo o peptídeo C presentes ligados ao suporte sólido, e

- e) determinação da presença de qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo ligado na mistura da reacção resultante da fase d), de tal modo que a detecção de quantidades decrescentes de anticorpo ligado mostra a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico e a detecção de quantidades crescentes de anticorpo ligado mostra a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico.

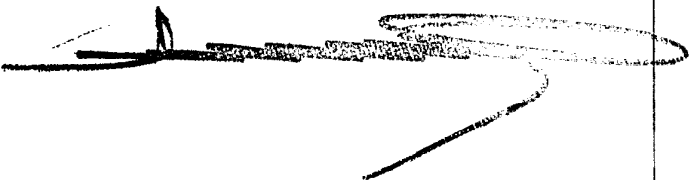
De acordo com uma outra forma de concretização, o processo da presente invenção compreende

- a) a incubação de uma amostra com um material contendo coagulogênio de modo a provocar a cisão do coagulogênio dando origem a coagulina e peptídeo C se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina,
b) a adição da mistura incubada da fase a) a um suporte sólido a fim de ligar todo o coagulogênio presente na mistura ou a fim de ligar toda a coagulina ou peptídeo C presente na mistura.
c) adição ao suporte sólido de um anticorpo marcado suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico de modo a provocar a ligação a todo o coagulogênio presente ligado ao suporte sólido ou suscitado contra ou dirigido substancialmente


apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico de modo a provocar a ligação a todo o coagulogênio presente ligado ao suporte sólido ou a toda a coagulina ou todo o peptídeo C presentes ligados ao suporte sólido, e

- d) determinação da presente de qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo ligado na mistura da reacção resultante da fase c), de tal modo que a detecção de quantidades decrescentes de anticorpo ligado mostra a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico e a detecção de quantidades crescentes de anticorpo ligado mostra a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico.

Em ambas estas formas de concretização pode ser vantajoso lavar o suporte sólido pelo menos uma vez e possivelmente várias vezes depois da reacção da mistura incubada com o anticorpo a fim de eliminar toto o anticorpo não ligado (deve notar-se que as duas formas de concretização acima resumidas correspondem aos métodos de análise de imunossorvente ligado a enzima (ELISA) respectivamente directo e duplo). Estes métodos de ELISA são particularmente vantajosos uma vez que se constatou que requerem 40 vezes menos quantidade do componente específico utilizado (isto é, coagulogênio presente no LAL) do que os métodos normais de coagulação de gel. Para além disso, o tempo necessário para realizar o ensaio é de cerca de 4 horas para várias centenas de ensaios, representando um melhoramento importante sobre os métodos de ensaio conhecidos. Para além destas vantagens, os resultados obtidos com amostras clínicas, especialmente com sangue ou plasma, pelo processo da presente invenção não são prejudicados pela presença no sangue de substâncias que interferem de tal modo que o processo pode ser usado para análise de todas



as amostras clínicas. O método ELISA é um método bem estabelecido e pode ser levado a efeito com equipamento de laboratório existente, podendo ainda ser automatizado. O presente método tem, por conseguinte, uma ampla aplicação em laboratórios clínicos para fins de diagnóstico e na indústria farmacêutica para análise de contaminantes em matérias primas ou em preparados.

De acordo com uma outra forma de concretização, o processo da presente invenção compreende

- a) o acoplamento de um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico à superfície de partículas sólidas,
- b) a incubação de uma amostra com um material contendo coagulogênio de modo a provocar a cisão do coagulogênio dando origem a coagulina e peptídeo C se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina,
- c) a adição da mistura incubada resultante da fase b) ao anticorpo da fase a) de modo a causar a aglutinação das partículas sólidas na presença de coagulogênio se o anticorpo é suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico, ou de modo a causar aglutinação das partículas sólidas na presença de coagulina ou de peptídeo C se o anticorpo é suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico, e
- d) determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da ausência de aglutinação de partículas sólidas às quais se encontra acoplado um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico ou por aglutinação das partículas sólidas às quais se encontra acoplado um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico.

Nesta forma de concretização, a pre

~~SECRET~~

sença de uma endotoxina pode ser detectada directamente (visualmente) por determinação da aglutinação das partículas sólidas às quais o anticorpo se encontra ligado. Por outras palavras, normalmente não é necessária qualquer marcação do anticorpo nesta forma de concretização do processo da presente invenção.

O anticorpo monoclonal da presente invenção, que se verificou ser de utilização particularmente vantajosa no presente processo pelas razões acima expostas, pode apresentar as características acima descritas para os anticorpos em geral. Este anticorpo monoclonal pode ser preparado por meio de um processo que compreende

- a) a imunização de um animal adequado ou de uma célula de um animal adequado com um antigene constituído essencialmente por um componente do lisado de amebócito ou da hemolinfa de límulo ou por um seu análogo sintético, ou por um seu determinante imunológico ou constituído essencialmente por um produto da reacção do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou com um material semelhante a uma endotoxina ou por um seu determinante imunológico a fim de obter células que produzem um anticorpo do referido antigene,
- b) a fusão das células que produzem o anticorpo do referido antigene com células de mieloma de uma linha de células adequada,
- c) a selecção e a clonagem das células de hibridoma resultantes que produzem o referido anticorpo,
- d) a cultura das células de hibridoma num meio adequado a fim de produzir o referido anticorpo e
- e) a recuperação a partir da cultura do anticorpo resultante.


A imunização do animal é de preferência levada a efeito por meio de uma solução do referido componente, análogo ou produto da reacção num solvente adequado como seja um tampão aquoso, por exemplo uma solução salina tamponizada com fosfato ou um adjuvante. São exemplos de adjuvantes apropriados o adjuvante de Freund completo ou incompleto e hidróxido de alumínio. Os animais adequados para a imunização podem ser escolhidos de entre o grupo constituído por coelhos, cabras, cavalos, carneiros, ratos, galináceos e cobaias. A colheita de sangue do animal e o isolamento do anticorpo (policlonal) podem ser leva-

dos a efeito de um modo conhecido em si.

As células produtoras de anticorpo usadas para as fusões com as células de mieloma são de preferência células de baço ou células de gânglios linfáticos. As células de mieloma e as células produtoras de anticorpo não necessitam ser derivadas da mesma espécie animal desde que seja possível fundir as células de uma espécie com as células da outra, por exemplo células de rato com células de ratazana, células de ratazana com células humanas ou células de rato com células humanas. No entanto, é preferível usar a mesma espécie animal como origem comum das células de mieloma e produtoras de anticorpo. Uma linha de células de hibridoma preferida para a prática da presente invenção pode ser construída por fusão de uma célula de mieloma de rato com uma célula de baço de rato provocada por um antigene.

As fusões de células podem ser levadas a efeito de acordo com uma modificação do método descrito por Köhler e Milstein, Nature 256, 1975, p. 495. Deste modo, a fusão das células produtoras de anticorpo com as células de mieloma é realizada de preferência na presença de um promotor de fusão, como seja de polietilenoglicol. É preferida uma proporção de cerca de 10 células produtoras de anticorpo por célula de mieloma. A linha de células de mieloma utilizada é de preferência do tipo designado por resistente a fármacos de tal modo que, num meio selectivo, as células de mieloma não fundidas morrem enquanto que as células fundidas, células híbridas, sobrevivem. Na prática habitual, as linhas de células que são resistentes à 8-azaguanina e não possuem a enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase, sendo por conseguinte incapazes de crescer em meio HAT (contendo hipoxantina, aminopterina e timidina) são mais frequentemente usadas para a fusão celular. Para além disso, a linha de células de mieloma deverá de preferência ser do tipo "não secreção" o que significa que não forma por si própria anticorpos ou cadeias de imunoglobulinas pesadas ou leves.


As células de hibridoma produtoras de anticorpo contra o referido componente, análogo ou produto da reacção podem ser seleccionadas por meio de cultura de células



produtoras de anticorpo não fundidas, células de mieloma não fundidas e células fundidas em recipientes individuais e num meio selectivo no qual as células de mieloma não fundidas não se dividem de modo que acabam por morrer depois de cerca de 1 a 2 semanas. As células produtoras de anticorpo não fundidas vivem apenas durante um número limitado de ciclos de divisão celular, após o que morrem (1 a 2 semanas), enquanto que as células fundidas com êxito continuam a dividir-se porque herdaram as propriedades de crescimento permanente das células de mieloma progenitoras e a capacidade de sintetizarem a enzima hipoxantina-fosforribosil-transferase das células produtoras de anticorpo progenitoras de tal modo que estas células fundidas só são capazes de crescer no meio selectivo (no caso presente meio HAT).

Deverá notar-se que os anticorpos monoclonais produzidos pelas células fundidas suscitados contra o mesmo antigene podem, no entanto, ser distintos uns dos outros, dependendo do determinante específico que induz a sua formação. No entanto, para qualquer clone de hibridoma dado, todos os anticorpos produzidos pelo clone são monoespecíficos para um determinante particular na molécula de antigene. Os hibridomas que produzem o anticorpo pretendido podem ser seleccionados, por exemplo por diluição limitante ou por outro método adequado, e podem ser clonados por reclonagem repetida, por exemplo usando um sistema de diluição limitante de um modo conhecido em si, e é possível obter anticorpos monoclonais clonados de alta pureza por cultura das células de hibridoma num meio adequado, por exemplo em meio essencial mínimo de Dulbecco. Por meio desta técnica in vitro, produzem-se anticorpos monoclonais que apenas estão contaminados por quantidades reduzidas de proteínas do soro heterólogo, por exemplo de soro fetal de vitela, presentes no meio de cultura.

A fim de produzir uma concentração significativamente mais elevada de anticorpos monoclonais com uma pureza que apenas é ligeiramente reduzida em comparação com a dos anticorpos produzidos in vitro, as células de hibridoma seleccionadas podem também ser cultivadas numa cavidade corporal de um animal. De acordo com este método, injecta-se o clone de




hibrídonas pretendido num animal, por exemplo num rato, de preferência um rato singênico ou semi-singênico, dando como resultado a formação de um tumor ascítico que liberta altas concentrações do anticorpo (cerca de 2 a 10 mg/ml) no sangue e no fluido ascítico do animal. Embora estes animais também produzam imunoglobulinas normais, a quantidade destas será apenas de cerca de 5% da quantidade de anticorpos monoclonais.

Uma vez que os anticorpos monoclonais da presente invenção são normalmente segregados a partir das células, é possível recuperá-los a partir do sobrenadante celular ou do fluido corporal por técnicas normais de isolamento de produtos extracelulares, incluindo centrifugação, filtração, precipitação, extração e/ou cromatografia.

Os reagentes individuais a) e b) do conjunto de análise de acordo com a presente invenção podem apresentar qualquer das características descritas acima para o anticorpo e o componente do lisado do amebócito de límulo, respectivamente. Para além disso, o conjunto de análise pode ser do tipo que contém tanto anticorpo marcado como não marcado (em particular para utilização na análise de duplo anticorpo). Outros ingredientes do conjunto de análise da presente invenção podem ser um padrão de endotoxina, o qual é útil para análises quantitativas em particular, tornando possível a determinação de níveis mais elevados ou mais reduzidos de ligação do anticorpo em comparação com o padrão de comparação, bem como água isenta de pirogênios (a fim de evitar resultados errôneos do ensaio em resultado do uso de água contaminada por pirogênios) para a diluição dos reagentes utilizados no conjunto de análise e no processo da presente invenção.

O conjunto de análise da presente invenção pode ser empregue para o diagnóstico de condições clínicas/patológicas que resultem de infecções por uma ampla variedade de agentes patogénicos, incluindo bactérias gram-negativas (por exemplo Enterobacteraceae, por exemplo E. coli, Shigella dysenteriae, Pseudomonas spp., Salmonella spp., Neisseria spp., Clostridium spp., Vibrio cholerae, Pasteurella spp.) e bactérias gram-positivas (por exemplo Listeria monocytogenes e Streptococ-



cus spp.); Mycoplasma spp.; Chlamydia spp; Treponema pallidum; fungos (por exemplo Candida albicans) e protozoários como sejam os parasitas da matéria Plasmodium falsiparum. O conjunto de análise é também útil para a detecção da contaminação de matérias primas e preparados farmacêuticos e de instrumentos médicos quer por estes agentes patogênicos por si próprios quer pelas endotoxinas residuais ou por outros antígenos de superfície derivados dos agentes patogênicos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra que a banda do coagulogénio desaparece depois da reacção de lisado de amebócito de Limulus com uma endotoxina, indicando a perda de reactividade do coagulogénio com o anticorpo.

A Figura 2 mostra que o coagulogénio residual medido por um ensaio de ELISA é inversamente proporcional à concentração de endotoxina.

AS Figuras 3 a 6 apresentam curvas de reacção LAL-endotoxina resultantes de diferentes combinações de tempos de incubação e de diferentes diluições do LAL.

A Figura 7 mostra que o tratamento do plasma com uma diluição de 10 vezes seguido de 10 minutos de incubação a 75° C dá origem a uma recuperação de quase 100% de endotoxina, enquanto que apenas se conseguia cerca de 50% pelos outros dois tratamentos.

As Figuras 8 e 9 apresentam curvas de ELISA de LAL de 8 LPS de várias estirpes de bactérias gram-negativas (Fig. 8) e de (1-3)- β -D-glucano (Fig. 9). Os LPS usados foram de Salmonella enteritidis (Δ), E. coli J5 (∇), Pseudomonas aeruginosa (\blacktriangledown), Salmonella abortus equi (Δ), E. coli 055:B5 (o), Salmonella typhimurium (\blacksquare), E. coli 0111:B4 (\bullet) e Salmonella minnesota (). O símbolo (+) na Figura 8 indica as posições do valor da absorvância do LAL obtido em água isenta de endotoxinas.

A Figura 10 apresenta o efeito da diluição sobre EIA50 de soro humano (\square), plasma humano (\blacksquare), polimixina (\bullet) e plasma de Limulus (o). O soro humano e o plasma foram preparados a partir de um voluntário. O plasma de Limulus

foi o sobrenadante isento de células preparado por centrifugação do sangue reunido de doze Limulus polyphemus a 5000 x g durante 30 minutos.

A invenção é ilustrada adicionalmente por meio dos exemplos não limitativos que se seguem.

EXEMPLO 1

Preparação de um anticorpo monoclonal contra coagulogênio (LAL)

1. Preparação e purificação de coagulogênio

Produziu-se um lisado de amebócito de Limulus a partir de Limulus polyphemus por métodos usuais conforme descrito por Tvede M, e Baek L, Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 91, 1983, pp. 9-15.

Dialisaram-se 10 ml de lisado e misturaram-se com um volume igual de tampão de Tris.HCl 0,05 M de pH 7,9 contendo CaCl_2 2 mM. Aplicou-se a mistura a uma coluna de DEAE-Sepharose^(R) CL-6B (15 x 1,5 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A fracção que não foi absorvida na coluna foi em seguida aplicada a uma outra coluna de Heparina-Sepharose^(R) CL-6B equilibrada com o mesmo tampão de Tris. Nestas condições o coagulogênio ficou ligado à coluna de Heparina-Sepharose^(R) mas foi possível eluí-lo com um tampão de Tris.HCl 0,05 M de pH 7,9 contendo NaCl 0,15 M e CaCl_2 2 mM. O material eluído continha coagulogênio de pureza >90%, conforme determinado por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida.

2. Imunização de ratos Balb/c com coagulogênio

Adsorveu-se coagulogênio purificado conforme obtido na fase 1 acima em gel de hidróxido de alumínio (Al(OH)_3) correspondendo a 200 µg de coagulogênio/mg de Al(OH)_3) e ajustou-se a suspensão a 1 mg de Al(OH)_3 /ml.

Para a imunização primária, cada rato foi injectado por via intraperitoneal com 0,5 ml de suspensão de coagulogênio emulsificada com 0,5 ml de adjuvante de Freund incompleto (correspondente a 100 µg de coagulogênio/rato). Duas

semanas mais tarde, cada rato recebeu uma injeção de reforço por via intraperitoneal de 0,5 ml de suspensão de coagulogênio sem adjuvante de Freund.


No dia 28 injectou-se uma dose similar e 4 dias mais tarde retirou-se o baço e preparou-se uma suspensão de células de baço por dissecação cuidadosa e disrupção do baço. As células de baço resultantes foram usadas para fusão de células na fase seguinte.

3. Fusão e cultura de células

As células de baço obtidas acima foram misturadas com células de mieloma (X63Ag8.653) numa proporção de 10:1 (10^8 células de baço para 10^7 células de mieloma) e foram incubadas com uma solução de polietileno-glicol (50% p/v de PEG 1500, 7% p/v de DMSO (dimetilsulfóxido) em solução salina tamponizada) durante 90 segundos a 37°C a fim de promover a fusão das células. Adicionaram-se 20 ml de meio essencial mínimo de Dulbecco (MEMD) e centrifugaram-se as células a 1 000 x g. O aglomerado celular foi ressuspenso em 100 ml de meio HAT (contendo hipoxantina, aminopterina e timidina) contendo 10% de soro fetal de vitela e distribuíram-se as células em 10 placas de microtitulação de 96 alvéolos (NUNC, Dinamarca). A cada alvéolo tinham sido adicionadas 10^4 células/alvéolo de ratos normais como células de alimentação a fim de promover o crescimento celular e de inibir a contaminação microbiana. O meio foi mudado duas vezes por semana.

4. Seleção de células de hibridoma que produzem um anticorpo anti-coagulogênio

Selecionaram-se clones positivos por meio de uma análise de imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Revestiram-se placas de microtitulação de 96 alvéolos (Immunoplates, NUNC, Dinamarca) com coagulogênio que tinha sido purificado conforme descrito acima. O coagulogênio foi diluído num tampão de carbonato de pH 9,0 até 2 µg/ml e adicionaram-se 100 µl de tampão contendo coagulogênio a cada alvéolo. Após incubação de um dia para o outro a 4°C, lavaram-se os alvéolos quatro vezes



com solução salina tamponizada com fosfato (SSTF) contendo 0,05% de Tween^(R) 20.

Incubaram-se os alvéolos durante uma hora com 100 µl de sobrenadante das culturas das placas de fusão das células preparadas na fase 3 diluído 1:10 em SSTF contendo 0,02% de Tween^(R), lavaram-se e incubaram-se durante uma hora com Ig de coelho anti-rato conjugado com peroxidase (Dakopatts, Copenhaga, código P260, diluído 1:1000). Fez-se reagir a peroxidase com 5 µl de uma solução de H₂O₂ a 35% em 10 ml de um tampão de citrato-fosfato (7,3 g de ácido cítrico.H₂O e 11,86 g de Na₂HPO₄.2H₂O por 1000 ml de água destilada) a pH 5,0 contendo 8 mg de ortofenileno-diamina. A reacção foi feita parar com H₂SO₄ e a absorvância foi lida a 492 nm.

Após uma cultura durante 2 semanas, os sobrenadantes de 17 alvéolos apresentaram uma reacção fortemente positiva. As células de hibridoma de 10 destes alvéolos foram seleccionadas e clonadas e reclonadas por diluições limitantes. Foram estabelecidos 7 clones estáveis. Os clones de células de hibridoma resultantes foram cultivados em balões de cultura de células em meio MEMD suplementado com 10% de soro fetal de vitela a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de humidade e injectaram-se 10⁷ células em ratos tratados com pristano (ratos injectados por via intraperitoneal duas semanas antes com 1 ml de pristano) o que, após um certo tempo de incubação, leva à formação de um tumor no rato libertando altas concentrações de anticorpo (2,3 mg/ml) no respectivo sangue e no líquido ascítico.

5. Purificação dos anticorpos monoclonais

Concentraram-se os sobrenadantes das culturas num sistema de ultrafiltração Milipore. Adicionou-se NaCl até 3,3 M, glicina até 1,65 M e ajustou-se o pH a 8,85 com NaOH 0,2 M. Os anticorpos foram em seguida feitos passar através de uma coluna de proteína A. Os anticorpos ligados foram eluídos com citrato-fosfato 0,1 M de pH 2,8. Ajustou-se o pH a 8,0 com tris.HCl. A quantidade de anticorpo foi medida num espectrofotómetro por meio da A₂₈₀, admitindo-se que A₂₈₀/1% = 14. Para uma determinação mais precisa usou-se um método de ELISA que

apenas mede o anticorpo de rato. Revestiram-se placas de microtitulação com imunoglobulina anti-rato de coelho (Dakopatts, código 2109) diluída a 1:1500 em SSTF. Adicionaram-se séries de diluição de um padrão conhecido de Ig de rato (20 µg de Ig de rato/ml) e diluições de amostras desconhecidas. A Ig de rato ligada foi detectada com Ig anti-rato de coelho conjugada com peroxiidase (Dakopatts código P260) diluída a 1:1000. É possível calcular as concentrações desconhecidas de Ig de rato a partir de uma curva padrão.

O anticorpo do fluído ascítico foi purificado essencialmente do mesmo modo. No entanto, o fluído ascítico foi diluído 1:1 com um tampão NaCl/glicina/NaOH tal como descrito acima antes de ser aplicado na coluna de proteína A.

6. Caracterização dos anticorpos monoclonais

Ensaíram-se as classes e as subclasses dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma por meio de um método de ELISA com anticorpos de coelho contra Ig de rato específicos em relação às classes/subclasses marcados com biotina (Zymed Corporation, EUA). O método era essencialmente idêntico ao descrito acima para as medidas das quantidades de Ig de rato, excepto em que a detecção dos anticorpos foi levada a efeito com anticorpos de coelho contra IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM ou IgA de rato marcados com biotina. A ligação foi finalmente detectada com estreptavidina marcada com peroxidase. Todos os anticorpos eram da subclasse IgG1 e tinham cadeias K leves.

EXEMPLO 2

Reactividade dos anticorpos monoclonais com coagulogénio em lisado de amebócitos de Limulus e falta de reactividade com lisado de amebócito de Limulus previamente reagido com endotoxina

Aplicaram-se 3 µl de lisado de amebócito de Limulus (LAL) e LAL que se tinha previamente feito reagir com lipossacarídeos (LPS) a um gel de agarose (1%) e subme-

teu-se a electroforese durante duas horas a 20 V/cm. Depois da electroforese, colocou-se um pedaço de papel de nitrocelulose por cima do gel de agarose e manteve-se uma pressão de 5 kg durante cerca de 20 minutos a fim de ligar as proteínas no gel de agarose ao papel de nitrocelulose. Os locais de ligação em excesso no papel de nitrocelulose foram bloqueados com 0,05% de Tween^(R) 20.

O papel de nitrocelulose foi em seguida incubado com um anticorpo monoclonal conforme descrito no Exemplo 1. Adicionaram-se 200 µl do sobrenadante da cultura contendo o anticorpo a 50 ml de SSTF contendo 0,02% de Tween^(R) 20. Depois de se incubar de um dia para o outro, adicionou-se um anticorpo secundário marcado com uma enzima (de coelho anti-rato conjugado com peroxidase, Dakopatts, Copenhaga) diluído a 1:1000. Por fim, adicionou-se tetrametilbenzidina e H₂O₂ (dissolveu-se tetrametilbenzidina (24 mg) com 80 mg de sulfassuccinato de dioc tilo e sódio em 10 ml de etanol e adicionou-se a 30 ml de tampão de citrato-fosfato a pH 5,0 e 20 µl de H₂O₂ a 30%. Adicionou-se água destilada até 50 ml). O anticorpo ligado foi visualizado sob a forma de uma mancha de azul forte. Verifica-se na Figura 1 que o anticorpo monoclonal reage com coagulogênio em LAL que não tinha reagido mas não com LAL que tinha reagido com LPS. O método de mancha imunológica empregado foi no restante conforme descrito em C. Koch et al., J. Immunological Methods 84, 1985, pp. 271-278.

EXEMPLO 3


Detecção de endotoxina por meio de uma análise de imunosorvente ligado a enzima (ELISA)

A cada um de vários tubos de ensaio pequenos adicionaram-se 10 µl de uma preparação comercial de LAL (adquirida a Association of Cape Cod, Woodshole, MA, EUA) que tinha sido reconstituída e diluída a 1:4 num tampão de tris.Mg⁺⁺ isento de pirogênios. Adicionaram-se a cada tubo 10 µl de uma amostra contendo várias concentrações (ver Fig. 2) de endotoxina do padrão de referência da USP /E. coli 055:B5, Whitaker M.A.

~~CONFIDENTIAL~~

Bioproducts, Inc., Walkersville, EUA⁷ (incluindo uma amostra de comparação negativa que é um tampão isento de toxina). Incubou-se a mistura a 37° C durante uma hora. Fez-se parar a reação por adição de 0,5 ml de tampão de carbonato a pH 9,6 (contendo 1,59 g de Na₂CO₃ por 1000 ml de água destilada) a cada tubo. Fizeram-se diluições 1:50 de cada tubo no tampão de carbonato.

Adicionaram-se 100 µl da mistura in cubada diluída a cada alvéolo de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos (NUNC, Dinamarca). Depois de incubar durante uma hora à temperatura ambiente, lavaram-se as placas quatro vezes com SSTF (contendo 29,2 g de NaCl, 0,2 de KCl, 0,2 g de KH₂PO₄, 1,15 g de NaHPO₄·2H₂O e 10 ml de Triton^(R) x por 1000 ml de água destilada). Conjugou-se peroxidase de rábano bastardo com um anticorpo anti-coagulogênio monoclonal preparado conforme descrito no Exemplo 1 pelo método do periodato essencialmente conforme descrito por Wilson e Nakane (62). Deste modo, misturaram-se 4 mg de PRB dissolvidos em 1 ml de água destilada com 0,1 ml de uma solução de NaIO₄ 100 mM preparada de fresco e agitou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. Esta solução foi dialisada de um dia para o outro a 4° C contra tampão de acetato de sódio 1 mM (pH 4,4) e em seguida foi misturada com 8 mg de anticorpo monoclonal (dissolvido em 1 ml de tampão de carbonato 50 mM de pH 9,5). Depois de agitar durante 2 horas à temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 ml de solução de NaBH₄ preparada de fresco (4 mg/ml) e incubou-se durante 2 horas a 4° C. O conjugado resultante foi dialisado contra solução salina tamponizada por fosfato (SSTF, pH 7,3) a 4° C de um dia para o outro. Adicionou-se em se guida um volume igual de glicerol (87%) e conservou-se a -20° C. Adicionaram-se aos alvéolos 100 µl do anticorpo monoclonal conju gado com peroxidase diluído a 1:20 000 em tampão de diluição (10 g de albumina de soro de bovino em 1000 ml de tampão de lavagem de pH 7,2) e incubou-se durante uma hora. Depois de lavar as pla cas quatro vezes com SSTF adicionaram-se 100 µl da solução de co loração [contendo 7,3 g de ácido cítrico·H₂O, 11,86 g de Na₂HPO₄·2H₂O por 1000 ml de água destilada a que se tinha adicionado um substrato de peroxidase (40 mg de ortofenileno-diamina dissolvidos em 100 ml de tampão de coloração a que se tinham adicionado



40 µl de peridrol)]7. Depois de 30 minutos, fez-se parar a reacção com H_2SO_4 1 M e mediu-se a absorvância a 492 nm.

A Figura 2 apresenta uma curva padrão que mostra os resultados da adição de várias quantidades de endotoxina à amostra. É evidente a partir da curva que a sensibilidade (gama de detecção) do processo da presente invenção se situa na gama de 10 a 0,75 pg de endotoxina/ml.

No ensaio descrito neste exemplo, o coagulogénio da mistura incubada é acoplado directamente à placa de microtitulação e, se está presente uma endotoxina, estarão presentes menores quantidades de coagulogénio, dando como resultado uma diminuição detectável na quantidade do anticorpo ligado no ensaio em comparação com uma amostra de comparação isenta de endotoxina.

As Figuras 3 a 6 mostram curvas de reacção de LAL (coagulogénio) com endotoxina em diferentes condições de tempos de incubação e de diluição do LAL; verifica-se a partir das curvas que (1) a detectabilidade da endotoxina aumenta com o aumento dos tempos de incubação para todas as diluições de LAL, sendo mais rápida para as diluições superiores; (2) observou-se a mesma detectabilidade a uma diluição de 1:4 e a diluições inferiores depois de 30 minutos de incubação e a diferença de detectabilidade entre todas as diluições diminuía com o aumento do tempo de incubação; (3) a distribuição mais ampla da concentração de endotoxina que era possível medir foi verificada nas curvas em que se usaram altas diluições de LAL.

O método de ensaio de ELISA usando o processo da presente invenção foi comparado com um método imuno-electroforético de projecção (descrito em 43) e com o método convencional de coágulo de gel (no qual se misturou 0,1 ml de LAL reconstituído em tampão de tris-MG⁺⁺ isento de pirogénios num tubo de ensaio de vidro (10 x 75 mm) com 0,1 ml de solução de endotoxina. A formação de um gel firme capaz de se conservar intacto quando se invertia o tubo foi considerada como um resultado positivo, sendo considerados negativos todos os outros resultados. Os resultados são apresentados no Quadro II.

QUADRO II

Comparação de três métodos de análise de endotoxina

Endotoxina (pg/ml)	ELISA-LAL A ₄₉₂ nm	RIE-LAL projecção cm	COÁGULO DE GEL + ou -
0	2.02	4.7	-
0.78	1.96	4.2	-
1.56	1.64	3.0	-
3.12	1.00	1.5	-
6.25	0.15	0	+
12.5	0.07	0	+
25	0.07	0	+
Consumo relativo de LAL	1/40	1/2	1
tempo necessário (horas)	4	6	1
quantificação	sim	sim	?
aplicabilidade a plasma	sim	sim	?

Verifica-se a partir do Quadro II que o novo processo é mais favorável quando comparado com o método imuno-electroforético de projecção e que pode detectar uma concentração 8 vezes inferior de endotoxina em relação ao método do coágulo de gel.

Uma das vantagens do método de ELISA-LAL reside em que as curvas padrão com a sensibilidade desejada podem ser obtidas a partir de um lote de LAL comercial por ajuste da diluição e do tempo de incubação do LAL. Conseguiu-se uma sensibilidade de 0,1 pg de endotoxina (Fig. 6).

~~CONFIDENTIAL~~

Com a aceitação oficial do ensaio de LAL como um ensaio para pirogênios, verificou-se uma grande procura para o reagente comercial de LAL. Uma vez que a única fonte de LAL é o límulo, um invertebrado que se encontra em vias de extinção, o desenvolvimento de um ensaio de LAL sensível que minimize o consumo de LAL tem uma grande importância. A alta sensibilidade do método de ELISA para a detecção de coagulogénio (foi atingido um valor de $A_{492} = 2,0$ mesmo quando a diluição original do LAL era de dez mil vezes) proporciona a possibilidade de se poderem usar quantidades de LAL muito pequenas neste método. Calcula-se que, considerando o volume e a diluição do LAL, apenas se necessita no método de ELISA-LAL de 1/160 da quantidade de LAL usada no método de coágulo de gel para a mesma sensibilidade. Normalmente o método de ELISA-LAL que tem uma sensibilidade 10 vezes superior ao método do coágulo de gel necessita de apenas 1/40 da quantidade de LAL usada neste último método.

Para além do consumo mínimo de reagente de LAL, o método de ELISA-LAL necessita de quantidades muito pequenas de amostras. 10 µl de amostra são suficientes para a realização de um ensaio, em contraste com os 100 µl normalmente usados noutros ensaios de LAL. Esta vantagem pode tornar-se importante nos casos em que apenas se dispõe de quantidades muito pequenas de amostras.

EXEMPLO 4

Deteccção de endotoxinas numa amostra clínica

A fim de demonstrar a capacidade do método da presente invenção para detectar a presença de uma endotoxina numa amostra de soro com o mesmo limite de detecção da solução tampão, adicionou-se endotoxina padrão de referência USP (ver Exemplo 3) a plasma humano isento de LPS diluído 10 vezes em água até uma concentração final de 200 pg/ml. A amostra de comparação era endotoxina em água isenta de pirogênios.

Depois de se ter adicionado o LPS, submeteu-se o plasma a um tratamento térmico durante 15 minutos a 65° C, 10 minutos a 75° C e 5 minutos a 100° C, respectivamente.

te, para três amostras diferentes.

O ensaio foi levado a efeito em duplicado de modo substancialmente idêntico ao descrito no Exemplo 3 por preparação de uma série de diluições de cada uma das soluções de plasma obtidas acima usando como diluente plasma isento de LPS diluído e aquecido de modo idêntico. Os resultados são apresentados na Figura 7, a partir da qual se verifica que o tratamento do plasma durante 10 minutos a 75° C era o tratamento ótimo para a determinação quantitativa de LPS. Os valores de A_{492} observados na amostra de comparação de água isenta de endotoxina não eram significativamente diferentes dos observados nas amostras de plasma (dentro da limitação da variação do método de ELISA-LAL), indicando que os níveis de endotoxina nestas amostras estavam abaixo de 4 pg de endotoxina/ml (o limite de detecção) e que o método de ELISA-LAL não sofria interferência pela cor nem pela turvação do plasma. Os resultados obtidos demonstram que o processo da presente invenção é também útil como um processo sensível de análise de amostras clínicas para a presença de endotoxina.

EXEMPLO 5

Preparação de um anticorpo monoclonal contra coagulogênio (LAT)

Usando essencialmente o mesmo procedimento descrito no Exemplo 1 mas substituindo o LAL por lisado de amebócito de Tachypleus (LAT) (Tachypleus tridentatus) como material de partida, preparou-se um anticorpo monoclonal contra coagulogênio de LAT. O anticorpo era reactivo no ensaio de ELISA descrito no Exemplo 3.

EXEMPLO 6

Preparação de um conjugado de anticorpo anti-coagulogênio monoclonal com biotina

Conjugou-se biotina com um anticorpo anti-coagulogênio preparado conforme descrito no Exemplo 1 co

mo se segue:

Dialisou-se 1 ml de uma solução de anticorpo monoclonal purificado (1 mg de IgG/ml) contra tampão de NaHCO_3 100 mM (pH 8,0) a 4°C de um dia para o outro e em seguida misturou-se com 5 µl de N-hidroxí-succinimidobiotina (40 mg/ml; Sigma Chemical Co.). Após agitação à temperatura ambiente durante 2 horas, a mistura foi dialisada contra SSTF (pH 7,3) a 4°C de um dia para o outro. Adicionou-se o conjugado a um volume igual de glicerol (87%) e conservou-se a -20°C.

Este conjugado foi utilizado num procedimento de ELISA por adição de 100 µl de uma mistura de LAL e endotoxina padrão diluída incubada (preparada conforme descrito no Exemplo 3) a cada alvéolo de uma placa de microtitulação de 96 alvéolos (NUNC, Dinamarca) e incubação durante uma hora à temperatura ambiente. Após quatro lavagens com tampão de lavagem conforme descrito no Exemplo 3, adicionaram-se 100 µl do conjugado anticorpo monoclonal-biotina diluído a 1:2000 em tampão de diluição. Após incubação durante 1 hora, lavou-se a placa 4 vezes. Em seguida adicionaram-se 100 µl de conjugado de avidina-PRB (Sigma Chemical Co.) diluído a 1:4000 em tampão de diluição e incubou-se a placa durante 1 hora. A placa foi lavada 4 vezes e adicionaram-se 100 µl de solução de substrato (conforme descrito no Exemplo 3). Depois de 10 minutos de incubação, fez-se parar a reação por meio da adição de 150 µl de H_2SO_4 1 M. A absorvância foi medida a A_{492} .

O método de ELISA que usa um conjugado de PRB com anticorpo monoclonal inclui menos uma fase do que o método de ELISA que usa um conjugado de anticorpo monoclonal com biotina (a utilização de PRB-avidina) mas é muito mais fácil de produzir o conjugado de anticorpo monoclonal com biotina do que o conjugado de PRB com anticorpo monoclonal. Os conjugados eram estáveis quando conservados abaixo de 0°C. Uma vez que 1 mg do anticorpo monoclonal é suficiente para 20 000 ensaios simples, a utilização do anticorpo monoclonal não tornará caro o método ELISA-LAL.

EXEMPLO 7

Ensaio de várias endotoxinas diferentes e de (1-3)- β -D-glucano por ELISA-LAL

O padrão de referência de endotoxina foi adquirido a Whittaker M.A. Bioproducts, Inc. (10 ng/frasco). Os LPS (W) de Salmonella minnesota, Escherichia coli 0111:B4, Escherichia coli 055:B5, Salmonella abortus equi, Salmonella typhimurium e Salmonella enteritidis foram adquiridos a Difco Laboratories (Detroit, Michigan). Os LPS de alto grau de pureza de Escherichia coli J5 e de Pseudomonas aeruginosa foram gentilmente cedidos pelo Dr. Anders Fomsgaard (Departamento de Doenças Infecciosas, Rigshospitalet, Copenhagen).

Todos estes LPS foram reconstituídos e diluídos até a uma concentração de 1 mg/ml e congelados a -20° C até serem usados. Imediatamente antes da análise, prepararam-se várias diluições de LPS em água isenta de endotoxina. Todas as análises de LPS foram levadas a efeito em duplicado e foram calculadas médias dos valores salvo indicação em contrário.

Tornou-se (1-3)- β -D-glucano de Alcaligenes faecalis var. myxogenes IFO 13140 (Curdlan, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japão) isento de endotoxina conforme descrito por Obayashi et al. (63). A solução concentrada (1 mg/ml) foi conservada a 4° C até utilização.

O método ELISA-LAL foi levado a efeito conforme descrito no Exemplo 3 usando um conjugado de PRB-anticorpo monoclonal.

As Figuras 8 e 9 apresentam as curvas da análise por ELISA-LAL de 8 LPS purificados e a curva de (1-3)- β -D-glucano. As curvas dos LPS apresentam um declive acentuado sendo aparentemente paralelas entre si, o que implica uma similaridade intrínseca na sua reacção com LAL apesar de existir uma grande diferença de actividade. A actividade do (1-3)- β -D-glucano era pelo menos 1000 vezes mais baixa e o declive da respectiva curva de reacção era muito menos acentuado do que o da dos LPS, indicando uma velocidade de reacção com LAL muito mais baixa.

Tem sido descrito que várias outras

~~CONFIDENTIAL~~

substâncias para além das endotoxinas causam reacções positivas a altas concentrações (60,47). Mostrou-se que o (1-3)- β -D-glucano podia reagir com LAL a uma concentração de 1 ng/ml, sendo a substância mais activa a seguir às endotoxinas (23). No entanto, as conclusões destes estudos foram frequentemente postas em causa devido à possível contaminação de endotoxinas nos materiais ensaiados. No presente estudo o (1-3)- β -D-glucano foi ensaiado selectivamente usando o método de ELISA-LAL e a sua reactividade era pelo menos 1000 vezes inferior à das endotoxinas. Para além disso, o (1-3)- β -D-glucano parece comportar-se de um modo intrinsecamente diferente do das endotoxinas, como é evidenciado pela sua velocidade de reacção com LAL muito mais baixa. Este facto pode ser explicado pela descoberta de Morita et al. (23) de que a activação do LAL por (1-3)- β -D-glucano é realizada por uma via diferente da das endotoxinas. Julga-se que as duas vias têm uma fase em comum, nomeadamente a activação da pro-enzima de coagulação. Deste modo, a activação de qualquer das duas vias resulta na cisão do coagulogénio e na perda da sua antigenicidade. O método de ELISA-LAL pode ser uma ferramenta útil para um estudo mais aprofundado das substâncias com capacidade de reagir com LAL, uma vez que as reacções das endotoxinas e do (1-3)- β -D-glucano com LAL podem ser distinguidas cineticamente.

EXEMPLO 8

Deteção de endotoxina em plasma

Depositou-se sangue venoso de pacientes com suspeita de sepsia quando admitidos em tubos de vidro isentos de endotoxinas e contendo heparina (10 IU/ml de sangue). Diluiu-se plasma preparado por centrifugação a 2000 rpm durante 15 minutos 10 vezes em água isenta de endotoxinas e em seguida submeteu-se a aquecimento a 75°C durante 10 minutos. A análise por ELISA-LAL subsequente foi levada a efeito conforme descrito no Exemplo 3, excepto em que o LAL foi reconstituído conforme indicado pelo fornecedor. O limite de detecção da análise de ELISA-LAL para endotoxinas em plasma foi de 4 pg de endotoxina/ml. As concentrações de endotoxinas em especímenes foram calculadas a

partir da curva padrão tomando em consideração o factor de diluição.

O Quadro III apresenta os resultados da determinação de endotoxina nas amostras de plasma de 10 pacientes. Os níveis de endotoxina nestes pacientes com sepsia era geralmente baixo e nem sempre estava em relação com os resultados da cultura bacteriana do sangue ou do fluído cerebrospinal (FCE).

O paciente n.º. 1 tinha uma história de infecção por gonorreia e ao ser admitido suspeitou-se de sepsia. Não se conseguiu efectuar uma cultura das bactérias mas encontrou-se um aumento significativo do anticorpo específico da gonorreia no sangue. O paciente n.º. 4 tinha bactérias gram-positivas no sangue e no FCE e morreu de shock séptico 4 dias depois da admissão. O paciente n.º. 8 tinha uma suspeita de urosepsia e tinha uma bacteriuria significativa. O paciente n.º. 9 tinha uma suspeita de sepsia meningocócica mas não se conseguiu qualquer cultura de bactérias por ter sido tratado com penicilina antes da admissão.

A presença de concentrações muito baixas de endotoxina no sangue dos pacientes com sepsia (Quadro III) mostra a necessidade de um ensaio de LAL sensível. É interessante notar que não foram encontradas amostras de sangue normal com um conteúdo de endotoxina superior ao limite de detecção do ensaio de ELISA-LAL (4 pg de endotoxina/ml).

Para conclusão, o método de ELISA-LAL constitui um ensaio de LAL promissor para a detecção clínica de endotoxina porque tem uma alta sensibilidade, sofre menos interferências do plasma, tem um consumo mínimo de reagente de LAL e de amostra, apresenta boa reproductibilidade e é de fácil realização.

QUADRO III

Detecção de endotoxina em amostras de plasma
de pacientes com sepsia

Pac. nº.	Diagnóstico clínico	Cultura de sangue	Cultura de FCE	ELISA-LAL pg de CSE/ml	Outros critérios de diag.
1.	Gonorreia	neg	neg	200	Febre, ar- trite, vas- culite, TAG ⁺ elev.
2.	Mielomatose	P.aeruginosa	neg	24	
3.	Meningite	neg	N.menin- gitidis	28	Petéquia na pele, sepsia
4.	Meningite purulenta	S.pneumoniae	S. pneu	20	K.pneumo- niae no pulmão
5.	Meningite purulenta	neg	N.men-	8	Petéquia na pele, sepsia
6.	Febre tifóide	S. typhosa	neg	9	
7.	Meningite purulenta	N.meningiti	neg	8	Petéquia na pele, septicemia
8.	Meningite	neg	neg	8	Petéquia na pele, sepsia
9.	Septicemia	neg	neg	11	>10 ⁵ E.coli na urina
10.	Meningite	neg	N.me-	8	Petéquia na pele, sepsia

+ Título de Anticorpos de Gonorreia

EXEMPLO 9

Análise da actividade de inactivação de endotoxina do plasma humano

A inactivação em dependência da dose de LPS por soro e plasma humanos, plasma de Limulus, LAL e polimixina B foi demonstrada pelo método de ELISA-LAL descrito no Exemplo 3.


A cada tubo de vidro isento de endotoxina adicionaram-se sucessivamente 50 µl de cada uma das amostras a analisar (soro e plasma humanos, plasma de Limulus, LAL e polimixina B) e 50 µl de LPS (E. coli 0111:B4) em várias diluições em solução salina estéril. Misturou-se bem o conteúdo de cada tubo e incubou-se a 37° C durante 1 hora. As soluções referidas foram diluídas pelo menos 1000 vezes em água isenta de endotoxina a fim de alcançar a gama de análise de LPS (1 a 100 pg/ml) bem como para eliminar a possível interferência de amostras com o ensaio LAL subsequente. A determinação quantitativa do LPS residual foi feita usando LAL combinado com uma determinação por ELISA de coagulogénio, conforme descrito no Exemplo 3.

Todas as análises foram realizadas de forma independente pelo menos em duplicado e os valores foram calculados como médias.

A reacção do LAL com LPS gerou uma curva linear entre a absorvância e a concentração de LPS, determinada por um método de ELISA-LAL usando um anticorpo monoclonal contra coagulogénio, conforme descrito no Exemplo 3. A inibição pelo soro da reacção foi significativa mesmo quando a amostra de soro estava diluída 100 vezes. No entanto, a inibição desapareceu totalmente quando o soro estava diluído mais de 250 vezes.

A Figura 10 apresenta a inactivação de forma dependente da dose de LPS por soro e plasma humanos, polimixina B e plasma de Limulus. Não se observou qualquer diferença entre a EIA50 do soro e do plasma humanos. O plasma de Limulus aparentemente tinha uma capacidade significativamente mais elevada de inactivação de LPS do que o plasma humano.

Estes resultados indicam que o método de ELISA-LAL descrito no Exemplo 3 pode ser usado para anali-



sar o plasma a fim de determinar o seu efeito de inactivação de endotoxinas. O plasma que, de acordo com esta análise, possua um alto efeito de neutralização das endotoxinas pode ser administrado a pacientes com sepsia a fim de melhorar o respectivo estado.

INSTRUÇÕES

É possível detectar a activação do factor C por uma endotoxina por preparação do factor C de acordo com o método descrito por Nahamura et al. (64). Pode preparar-se então um anticorpo monoclonal contra o factor C purificado de acordo com o procedimento descrito no Exemplo 1. Este anticorpo monoclonal pode então ser conjugado tal como descrito nos Exemplos 1 ou 6 e pode ser usado num método de ELISA-LAL conforme descrito no Exemplo 3.

Este procedimento corresponde essencialmente ao descrito no Exemplo 3 com a excepção de que se determina a perda de antigenicidade do factor C e não do coagulogénio à medida que o factor C é convertido em factor C activo ao reagir com endotoxina.

É também possível detectar a activação do factor G por (1-3)- β -D-glucano por preparação de factor G de acordo com o método descrito por Morita et al. (23) e preparação e conjugação de um anticorpo monoclonal contra o factor G pelo procedimento descrito nos Exemplos 1 ou 6. Este anticorpo monoclonal conjugado pode então ser usado num método de ELISA-LAL conforme descrito no Exemplo 3.

Admite-se que, uma vez preparados os anticorpos monoclonais contra os factores C e G, é possível empregar o mesmo lisado para três ensaios diferentes usando factor G, factor C e coagulogénio como componentes do lisado, cuja presença ou ausência é detectada. Admite-se ainda que estes ensaios podem ser levados a efeito na mesma placa de microtitulação, acelerando deste modo o procedimento de, por exemplo, determinação da causa de sepsia em pacientes sépticos.




REFERÊNCIAS

1. Levin J, Bang FB (1968). Clottable Protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 19, 186-197.
2. Levin J, Bang FB (1964). A description of cellular coagulogen in limulus. *Bull. Johns. Hopkins Hosp.* 115, 337-345.
3. Bang FB (1958). A bacterial disease of Limulus polyphemus. *Bull. Johns. Hopkins Hosp.* 98, 325-351.
4. Jorgensen JH, Smith RF (1974). Measurement of bound and free endotoxin by the Limulus assay. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 1024-1031.
5. Fleishman J, Fowlkes F (1982). A comparison of pyrogenicity of bacterial endotoxins from a variety of Gram-negative bacteria as determined by the LAL test. *Prog. Clin. Biol. Res.* 93, 131-140.
6. Weary ME, Donohue G, Pearson FC, Stony K (1980). Relative potencies of four reference endotoxin standards as measured by the Limulus amoebocyte lysate and USP rabbit pyrogen tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 1148-1151.
7. Food and Drug Administration 1983. Draft guideline for validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. *Pharmacopeial Forum.* 9, 3012-3021.
8. Solum NO (1973). The coagulation of Limulus polyphemus hemocytes. A comparison of the clotted and non clotted forms of the molecule. *Thromb. Res.* 2, 55-70.
9. Liu TY, Seid RC Jr, Tai JY, Liang S-M, Sakmar TP, Robbins JB (1979). Studies of Limulus lysate coagulation system. In *Bio medical Applications of the Horseshoe Crab (Limulidae)* (ed. E. Cohen), pp. 147-158. Alan R. Liss, New York.
10. Holme R, Solum NO (1973). Electron microscopy of the gel protein formed by clotting of Limulus polyphemus hemocyte extracts. *J. Ultrastructure Res.* 44, 329-338.
11. Tai JY, Seid RC, Huhn RD, Lui TY (1977). Studies on Limulus amoebocyte lysate. II. Purification of the coagulogen and

- the mechanism of clotting. J. Biol. Chem. 252, 4773-4776.
12. Nakamura S, Takagi T, Iwanaga S, Niwa M, Takahashi K (1976a). Amino acid sequence studies on the fragments produced from horseshoe crab coagulogen during gel formation: homologies with primate fibrinopeptide. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 72, 902-908.
13. Nakamura S, Takagi T, Iwanaga S, Niwa M, Takahashi K (1976b). A clottable protein (coagulogen) from horseshoe crab hemocytes. Structural change of its polypeptide chain during gel formation. J. Biochem. 80, 649-652.
14. Gaffin SL (1976). The clotting of the lysed white cells of Limulus induced by endotoxin. I. Preparation and characterization of clot forming proteins. Biorheologi. 13, 273-280.
15. Shishikura F, Nakamura S, Takahashi K, Segiguchi K (1982). Horseshoe crab phylogeny based on amino acid sequence of the fibrinopeptide like peptide C. J. Exp. Zool. 223, 89-91.
16. Tai JY, Liu TY (1977). Studies on Limulus amoebocyte lysate. I. isolation of proclotting enzyme. J. Biol. Chem. 252, 2178-2181.
17. Ohki M, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S (1980). A new endotoxin-sensitive factor associated with hemolymph coagulation system of horseshoe crab (Limulidae). FEBS Letters 120, 217-220.
18. Nakamura S, Levin J (1982a). Fractionation of Limulus amoebocyte lysate. Characterization of activation of the proclotting enzyme by an endotoxin-mediated activator. Biochim. Biophys. Acta. 707, 217-225.
19. Nakamura S, Levin J (1982b). Endotoxin-mediated Limulus proclotting enzyme activator and detection of previously undescribed protease (protease N). Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 1619-1623.
20. Liang SM, Sakmar TP, Liu TY (1980). Studies of Limulus amoebocyte lysate. III. Purification of an endotoxin-binding protein from Limulus amoebocyte membranes. J. Biol. Chem. 255, 5586-5590.
21. Tanaka S, Nakamura T, Morita T, Iwanaga S (1982). Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of the Limulus coagulation system. Bio-

- chem. Biophys. Res. Commun. 105, 717-723.
22. Kakinuma A, Asano T, Torh H, Sugino Y (1981). Gelation of Li mulus amoebocyte lysate by an antitumor (1-3)- α -D-glucan. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 434-439.
 23. Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S (1981). A new (1-3)- α -D-glucan mediated coagulation pathway found in Limu lus amoebocytes. FEBS Letters 129, 318-321.
 24. Albaugh BR, Chandler CB (1982). Automated methodology for the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay using the multis- kan microplate reader, pp. 183-194. In Watson S, Levin J, Novitsky TJ (eds), Endotoxins and their detection with the Limulus lysate test. Alan R. Liss, Inc., New York.
 25. Fujita Y, Nakahara C (1982). Preparation and application of a new endotoxin determination kit, Pyrodick, using a chromo- genic substrate, pp. 173-182, In Watson S, Levin J, Novitsky TJ (eds), Endotoxins and their detection with the Limulus lysate test. Alan R. Liss, Inc., New York.
 26. Nandan R, Brown DR (1977). An improved in vitro pyrogen test to detect picograms of endotoxin contamination in intrave- nous fluids using Limulus amoebocyte lysate. J. Lab. Clin. Med. 89, 910-918.
 27. Dunczak JA, Cotter R, Dastoli FR (1979). Quantitative detec- tion of endotoxin by nephelometry, pp. 403-414. In E. Cohen (ed.), Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limuli dae). Alan R. Liss, Inc., New York.
 28. Jorgensen JH, Reichler AS (1982). Automation of the Limulus amoebocyte lysate pyrogen testing. J. Parenter. Sci. Technol. 36, 11-16.
 29. Nowitsky TJ, Ryther SS, Case MJ, Watson (1982). Automated LAL testing of parenteral drugs in Abbot MS-2. J. Parenter. Sci. Technol. 36, 11-16.
 30. Ditter VB, Becker KP, Urbascheck R, Urbascheck B (1982). De- tection of endotoxin in blood and other specimens of evalua- tion of photometrically registered LAL reaction kinetics in microtiter plates. Prog. Clin. Biol. Res. 93, 385-392.
 31. Frauch P (1974). Slide test as a micro-method of a modified Limulus endotoxin test. J. Pharm. Sci. 63, 808-809.

- 
32. Goto H, Watababe M, Nakamura S (1977). Studies on a simple Limulus test, a slide method. Jpn. J. Exp. Med. 47, 523-524.
 33. Goto H, Nakamura S (1979). Dry up method as a revised Limulus test with a new technique for gelation inhibitor removing Jpn. J. Exp. Med. 49, 19-25.
 34. Melvaer KL, Fystro D (1982). Modified micro-method of the Li mulus amoebocyte lysate assay for endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 43, 493-494.
 35. Flowers DJ (1979). A microtechnique for endotoxin assay by using Limulus lysate. Med. Lab. Sci. 36, 171-176.
 36. Okuguchi S (1978). Improvement of the micromethod for the Li mulus lysate test. Microbiol. Immunol. 22, 113-121.
 38. Kreeftenberg JG, Loggen HG, Van Ramshorst JD, Beuvery EC (1977). The Limulus amoebocyte lysate test micromethod and application in the control of sera and vaccines. Dev. Biol. Standard. 34, 15-20.
 39. Gardi A, Arpagaus GR (1980). Improved microtechnique for endotoxin assay by the Limulus amoebocyte lysate test. Anal. Biochem. 109, 382-385.
 40. Prior RB, Spagna VA (1979). Adaptation of a microdilution procedure to the Limulus lysate assay for endotoxin. J. Clin. Microbiol. 10. 394-395.
 41. Harris NS, Feinstein R (1979). The LAL-bead assay for endotoxin, pp. 265-274. In E. Cohen (ed.), Biomedical Applications of the Horseshoe crab (Limulidae), Alan R. Liss, Inc., New York.
 42. Munford RS (1978). Quantitative Limulus lysate assay for endotoxin activity: aggregation of radioiodinated coagulogen monomers. Anal. Biochem. 91, 509-515.
 43. Baek L (1983). New, sensitive rocket immunoelectrophoretic assay for measurement of the reaction between endotoxin and Limulus amoebocyte lysate. J. Clin. Microbiol. 17, 1013-1020.
 44. Elin RJ, Wolff SM (1973). Nonspecificity of the Limulus amoebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. J. Infect. Dis. 128, 349-352.
 45. Wildfeuer A, Heymer B, Schleifer KH, Haferkamp O (1974). Investigations on the specificity of the Limulus test for the

- detection of endotoxin. Appl. Microbiol. 28, 867-871.
46. Brunson KW, Watson DW (1976). Limulus amoebocyte lysate reaction with streptococcal pyrogenic exotoxin. Infect. Immun. 14, 1256-1258.
47. Mikami T, Nagase T, Matsumoto T, Suzuki S, Suzuki M (1982). Gelation of Limulus amoebocyte lysate by simple polysaccharides. Microbiol. Immunol. 26, 403-409.
48. Suzuki M, Mikami T, Matsumoto T, Suzuki S (1977) Gelation of Limulus lysate by synthetic dextran derivatives. Microbiol. Immunol. 21, 419-425.
49. Platica M, Harding W, Hollander VP (1978). Dithiols simulate endotoxin in the Limulus reaction. Experientia 34, 1154-1155.
50. Fine DH, Kessler RE, Tabak LA, Shockman GD (1977). Limulus lysate activity of lipoteichoic acid. J. Dent. Res. 56, 1500.
51. Seid RC Jr., Smith PF, Guevarra G, Hochstein HD, Barile MF (1980). Endotoxin-like activities of mycoplasmal lipopolysaccharides (lipoglycans) Infect. Immun. 29, 990-994.
52. Weinberg JB, Smith PF, Kahane I (1980). Bacterial lipopolysaccharides and mycoplasmal lipoglycans: a comparison between their abilities to induce macrophage-mediated tumor cell killing and Limulus amoebocyte lysate clotting. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 493-499.
53. Smith SM, Hill Jo, Snyder IS, Burrell R (1978). Mitogenicity of cell wall fractions of Micropolyspora faeni. Ann. Allergy 40, 12-14.
54. Lewis VJ, Thacher L, Mitchell SH (1979). Demonstration of Chlamydia endotoxin-like activity. J. Gen. Microbiol. 144, 215-216.
55. Felton SC, Prior RB, Spagna VA, Kreier JP (1980). Evaluation of Plasmodium berghei for endotoxin by the Limulus lysate assay J. Parasitol 66, 846-847.
56. Wexler H, Oppenheim JD (1979). Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the gram-positive organism Listeria monocytogenes. Infect. Immun. 23, 845-857.
57. Elin RJ (1979). Clinical utility of the Limulus test with blood, CSF and synovial fluid, pp. 279-292. In E. Cohen (ed.)

~~CONFIDENTIAL~~

Biomedical Applications of the Horseshoe Crab (Limulidae).
Alan R. Liss, Inc., New York.

58. Tubbs H (1980). Endotoxin in human and murine malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 121-123.
59. Galloway RE, Levin J, Butler T, Naff GB, Goldsmith GH, Saito H, Awoke S, Wallace CK (1977). Activation of protein mediators of inflammation and evidence for endotoxemia in *Borrelia recurrentis* infection. Am. J. Med. 63, 933-938.
60. Bæk L, Høiby N, Hertz JB, Espersen F (1985). Interaction between *Limulus* amoebocyte lysate and soluble antigens from *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* studied by quantitative immunoelectrophoresis. J. Clin. Microbiol. 22, 229-237.
61. Jorgensen JH (1986). Clinical applications of the *Limulus* amoebocyte lysate test. In Proctor RA (ed.), Handbook of Endotoxin 4: Clinical aspects of endotoxin shock. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.
62. Wilson MB and PK Nakane, in Immunofluorescence and Related Techniques (W. Knapp, H. Holubar and G. Wick, eds.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978, pp. 215-221.
63. Obayashi T, et al., Clinica Chimica Acta 149, 1985, pp. 55-65.
64. Nakamura T, Morita T and Iwanaga S. Lipopolysaccharide-sensitive serine protease zymogen (Factor C) found in *Limulus* hemocytes. Isolation and characterization. Eur. J. Biochem. 154, 1986, pp. 511-521.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1^a -

Processo para a determinação da presença de uma endotoxina ou dum material semelhante a uma endotoxina caracterizado por compreender as fases de:

- a) incubação de uma amostra com um componente dum lisado ou de hemofinfa de amebócito de límulo ou de um análogo sintético daqueles, estando as propriedades do referido componente alteradas se está presente na amostra qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina de tal modo que não tem lugar qualquer reacção com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou com um seu determinante imunológico ou de tal modo que um produto da reacção do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou com um produto semelhante a uma endotoxina na amostra reaja com um anticorpo suscitado contra o referido produto de reacção ou com um seu determinante imunológico.
- b) reacção da mistura incubada da referida amostra e do referido componente ou análogo resultantes da fase a) com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou contra um seu determinante imunológico, estando o anticorpo ligado ao referido componente ou ao referido análogo presentes na mistura, ou com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido produto de reacção ou contra um seu determinante imunológico, estando o anticorpo ligado a qualquer dos referidos produtos presentes na mistura.. e
- c) determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo na mistura de reacção resultante da fase b), mostrando a detecção de quantidades decrescentes do anticorpo ligado à presença de uma endotoxina ou de um material

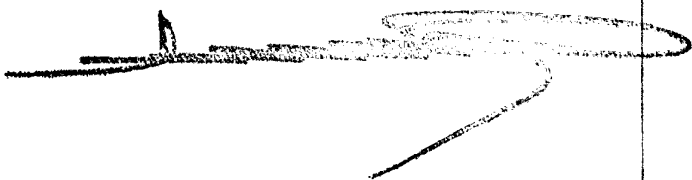
~~_____~~

semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou contra um seu determinante imunológico, e mostrando a detecção de quantidades crescentes do anticorpo ligado à presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente contra o referido produto da reacção ou contra um seu determinante imunológico, com a condição de que o referido componente ou análogo de qualquer dos referidos produtos de reacção presentes após a incubação da amostra com o componente ou análogo na fase a) está imobilizado num suporte sólido ou de que o referido anticorpo está imobilizado num suporte sólido ou acoplado a uma molécula intermédia ligada a um suporte sólido, ou de que qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina presente na amostra está imobilizada num suporte sólido.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o lisado ou a hemolinfa de amebócito de limulo ser seleccionado do grupo constituído por um factor de coagulação, p. ex. factor B, factor C, factor G, factor N, enzima pró-coagulação, enzima de coagulação activada, factor anti-LPS e coagulogénio, e uma aglutinina, p. ex. uma lecitina tal como limulina ou polifemina, ou por o produto da reacção do referido componente ou análogo com a referida endotoxina ou com o referido material semelhante a uma endotoxina ser seleccionado do grupo constituído por coagulina, peptídeo C, enzima de coagulação activada, factor B, C, G ou N activado e produtos de cisão destes factores e da enzima pró-coagulação.

- 3^a -



- 3^a -

Processo de acordo com a reivindica^{ção} 1, caracterizado por a endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina serem seleccionados de entre o grupo constituído por endotoxinas ou antigenes de superfície de microorganismos tais como bactérias gram-negativas ou gram-positivas, fungos, leveduras e algas.

- 4^a -


Processo de acordo com a reivindica^{ção} 1, caracterizado por o anticorpo ser um anticorpo específico, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal ou uma mistura de dois ou de mais anticorpos monoclonais.

- 5^a -

Processo de acordo com a reivindica^{ção} 1, caracterizado por o anticorpo ter uma marcação, p. ex. seleccionada de entre o grupo enzimas, substâncias fluorescentes ou quimioluminescentes, cromóforos, isótopos radioactivos e agentes de complexação.

- 6^a -

Processo de acordo com a reivindica^{ção} 1, caracterizado por o anticorpo estar imobilizado num suporte sólido ou acoplado a uma molécula intermédia ligada a um suporte sólido e qualquer componente referido que reste após a in-



cubação da amostra com o componente ou análogo na fase a) do processo da reivindicação 1 ser ligado ao anticorpo para reacção adicional com uma nova quantidade de anticorpo.

- 7ª -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o suporte sólido conter um polímero ou uma matriz revestida com um polímero.

- 8ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as fases de

- a) imobilização de um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogénio ou contra um seu determinante imunológico ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C ou acoplamento do referido anticorpo a uma molécula intermédia ligada ao referido suporte,
- b) incubação da amostra com um material que contenha coagulogénio de modo a cindir o coagulogénio em coagulina e peptídeo C se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina,
- c) adição da mistura incubada resultante da fase b) ao suporte sólido de modo a que qualquer coagulogénio presente na amostra fique ligado se o anticorpo imobilizado no suporte sólido é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogénio ou contra um seu determinante imunológico ou de modo a que qualquer coagulina ou peptídeo C presente na amostra fiquem ligados se o anticorpo imobilizado ao referido suporte é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C

- ou contra um seu determinante imunológico,
- d) adição ao suporte sólido de um anticorpo marcado suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico de modo a que qualquer coagulogênio ligado presente no suporte sólido fique ligado, ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico, de modo a que qualquer coagulogênio ligado ou qualquer coagulina ou peptídeo C ligado presentes no suporte sólido fiquem ligados, e
- e) determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo marcado ligado ao suporte sólido da fase d), mostrando a detecção de quantidades decrescentes do anticorpo ligado à presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico, e mostrando a detecção de quantidades crescentes do anticorpo ligado à presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico.

- 9ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as fases de

- a) incubação de uma amostra com um material contendo coagulogênio de modo a cindir o coagulogênio para formar coagulina ou peptídeo C se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina,
- b) adição da mistura incubada resultante da fase a) a um suporte sólido de modo a que qualquer coagulogênio presente na amo-


tra fique ligado ou a que qualquer coagulina ou peptídeo C presente na amostra fique ligada,

- c) adição ao suporte sólido de um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico de modo a que qualquer coagulogênio ligado presente no suporte sólido fique ligado, ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico, de modo a que qualquer coagulina ou peptídeo C ligado presente no suporte sólido fique ligado, e
- d) determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo marcado ligado ao suporte sólido da fase c), mostrando a detecção de quantidades decrescentes do anticorpo ligado à presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico, e mostrando a detecção de quantidades crescentes do anticorpo ligado à presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente contra coagulina ou peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico.

- 10^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as fases de

- a) imobilização de um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico ou suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico na superfície de partículas sólidas,
- b) incubação da amostra com um material que contenha coagulogê-




nio de modo a cindir o coagulogênio em coagulina e peptídeo C se estiver presente na amostra uma endotoxina ou um material semelhante a uma endotoxina,

- c) adição da mistura incubada resultante da fase b) ao anticorpo da fase b) de modo a causar a aglutinação das partículas sólidas na presença de coagulogênio se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico ou de modo a causar a aglutinação das partículas sólidas na presença de coagulina ou de peptídeo C se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico, e
- d) determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da ausência de aglutinação de partículas sólidas às quais se encontra ligado um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulogênio ou contra um seu determinante imunológico ou pela aglutinação das partículas às quais se encontra ligado um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra coagulina ou contra peptídeo C ou contra um seu determinante imunológico.

- 11^a -

Processo para a produção de um anticorpo monoclonal suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra um componente de lisado ou hemolinfa de amebócito de límulo ou contra um seu análogo sintético ou contra um seu determinante imunológico caracterizado por compreender as fases de

- a) imunização de um animal adequado ou de células de um animal adequado com um antigene constituído essencialmente por um componente de lisado ou de hemolinfa de amebócito de límulo ou de um seu análogo sintético ou de um seu determinante imunológico ou constituído essencialmente por um produto da reac



ção do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou com um material semelhante a uma endotoxina ou com um seu determinante imunológico de modo a obter células que produzem um anticorpo do referido antigene,

- b) fusão das células que produzem o anticorpo do referido antigene com células de mieloma de uma linha de células adequada,
- c) selecção e clonagem das células de hibridoma resultantes que produzem o referido anticorpo e
- d) cultura das células de hibridoma num meio adequado a fim de produzir o referido anticorpo.

- 12^a -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o componente de lisado ou de hemolinfa de amebócito de límulo ser seleccionado de entre o grupo constituído por um factor de coagulação, p. ex. factor B, factor C, factor G, factor N, enzima pró-coagulação, enzima de coagulação activada, factor anti-LPS ou coagulogénio, e uma aglutinima, p. ex. uma lecitina, tal como limulina ou polifemina.

- 13^a -

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o anticorpo monoclonal ser suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas um produto da reacção de um composto de lisado ou de hemolinfa de amebócito de límulo ou dum seu análogo sintético com uma endotoxina ou com um material semelhante a uma endotoxina ou contra um determinante imunológico do referido produto de reacção.

- 14^a -

- 14^a -

Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o referido produto de reacção ser seleccionado de entre o grupo constituído por coagulina, peptídeo C, enzima de coagulação activada, factor B, C, G ou N activado ou produtos de cisão destes factores e de enzima pró-coagulação.

- 15^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 11 ou 13, caracterizado por o anticorpo ter uma marcação, p. ex. seleccionada de entre o grupo enzimas, substâncias fluorescentes ou quimioluminescentes, cromóforos, isótopos radioactivos e agentes de complexação.

- 16^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 11 ou 13, caracterizado por o anticorpo estar imobilizado num suporte sólido ou acoplado a uma molécula intermédia ligada a um suporte sólido.

- 17^a -

Processo para a preparação de um conjunto de análise ("test kit") para a determinação da presença de um endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina numa amostra caracterizado por se incorporar

- a) um anticorpo quando preparado de acordo com qualquer das rei-

vindicações 11 a 16 e

- b) um componente de um lisado ou hemolinfa de um amebócito de límulo ou de um seu análogo sintético.

- 18^a -

Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o componente de lisado ou de hemolinfa de amebócito de límulo ser seleccionado de entre o grupo constituído por um factor de coagulação, p. ex. factor B, factor C, factor G, factor N, enzima pró-coagulação, enzima de coagulação activada, factor anti-LPS ou coagulogénio, e uma aglutina, p. ex. uma lecitina, tal como limulina ou polifemina.


- 19^a -

Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o anticorpo ser um anticorpo específico, um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal ou uma mistura de dois ou de mais anticorpos monoclonais.

- 20^a -

Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o anticorpo ter uma marcação, p. ex. seleccionada de entre o grupo enzimas, substâncias fluorescentes ou quimioluminescentes, cromóforos, isótopos radioactivos e agentes de complexação.

- 21^a -


- 21^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 17, caracterizado por o referido conjunto de análise conter
um suporte sólido.

- 22^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 21, caracterizado por o suporte sólido conter um polímero ou
uma matriz com um polímero ligado.

- 23^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 17, caracterizado por o referido conjunto de análise conter
tanto um anticorpo ligado como não ligado.

- 24^a -

Processo de acordo com a reivindica
ção 17, caracterizado por o referido conjunto de análise conter
adicionalmente uma endotoxina padrão.

- 25^a -


Processo de acordo com a reivindica
ção 17, caracterizado por o referido conjunto de análise conter

adicionalmente água isenta de pirogénios.

Os requerentes declaram que o primeiro pedido desta patente foi apresentado na Dinamarca em 20 de Maio de 1987, sob o nº. 2558/87.

Lisboa, 19 de Maio de 1988.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.




RESUMO

"PROCESSO PARA A DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ENDO- TOXINAS E PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLO- NAIS UTILIZADOS NESSA DETERMINAÇÃO"

A invenção refere-se a um processo para a determinação da presença de uma endotoxina ou dum material semelhante a uma endotoxina que compreende as fases de:

- a) incubação de uma amostra com um componente dum lisado ou de hemolinfa de amebócito de límulo ou de um análogo sintético daqueles, estando as propriedades do referido componente alteradas se está presente na amostra qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina de tal modo que não tem lugar qualquer reacção com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou com um seu determinante imunológico ou de tal modo que um produto da reacção do referido componente ou análogo com uma endotoxina ou com um produto semelhante a uma endotoxina na amostra reaja com um anticorpo suscitado contra o referido produto de reacção ou com um seu determinante imunológico,
- b) reacção da mistura incubada da referida amostra e do referido componente ou análogo resultantes da fase a) com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou contra um seu determinante imunológico, estando o anticorpo ligado ao referido componente ou ao referido análogo presentes na mistura, ou com um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido produto de reacção ou contra um seu determinante imunológico, estando o anticorpo ligado a qualquer dos referidos produtos presentes na mistura, e
- c) determinação da presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra por meio da detecção de qualquer anticorpo na mistura de reacção resultante da fase b), mostrando a detecção de quantidades decrescentes do an



ticorpo ligado a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente apenas contra o referido componente ou análogo ou contra um seu determinante imunológico, e mostrando a detecção de quantidades crescentes do anticorpo ligado a presença de uma endotoxina ou de um material semelhante a uma endotoxina na amostra se o anticorpo é um anticorpo suscitado contra ou dirigido substancialmente contra o referido produto da reacção ou contra um seu determinante imunológico,

com a condição de que o referido componente ou análogo de qualquer dos referidos produtos de reacção presentes após a incubação da amostra com o componente ou análogo da fase a) está imobilizado num suporte sólido ou de que o referido anticorpo está imobilizado num suporte sólido ou acoplado a uma molécula intermédia ligada a um suporte sólido, ou de que qualquer endotoxina ou material semelhante a uma endotoxina presente na amostra está imobilizada num suporte sólido.

.
. .
.

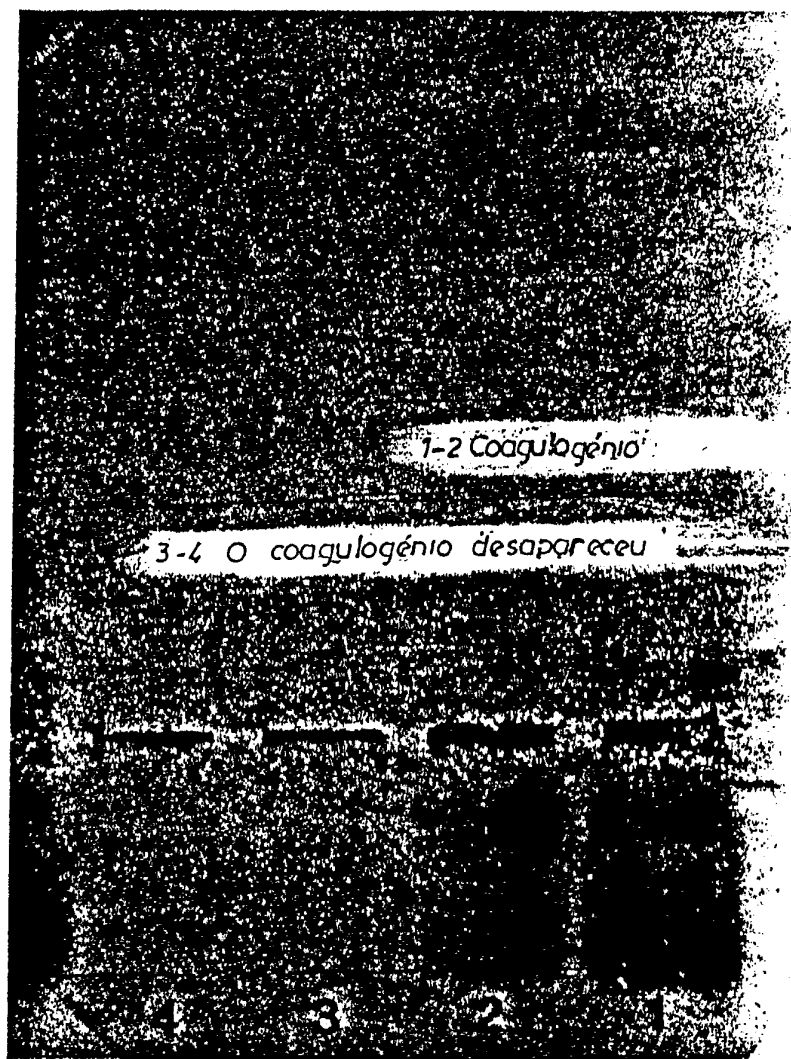


Fig. 1

Curva padrão de LAL ELISA

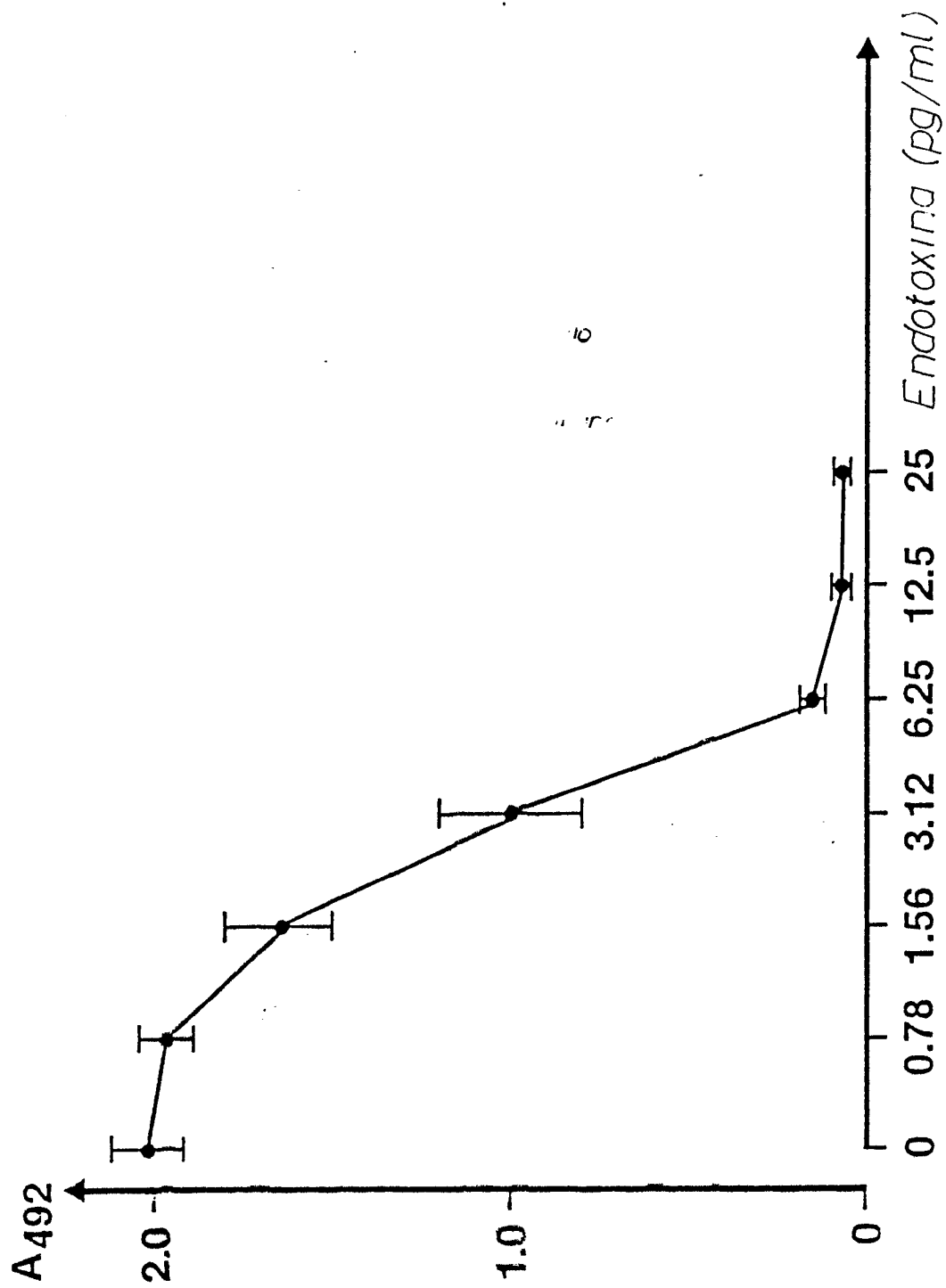


Fig. 2

Curvas de reacção LAL-LPS sob diferentes concentrações de
período de incubação e de diluição de LAL

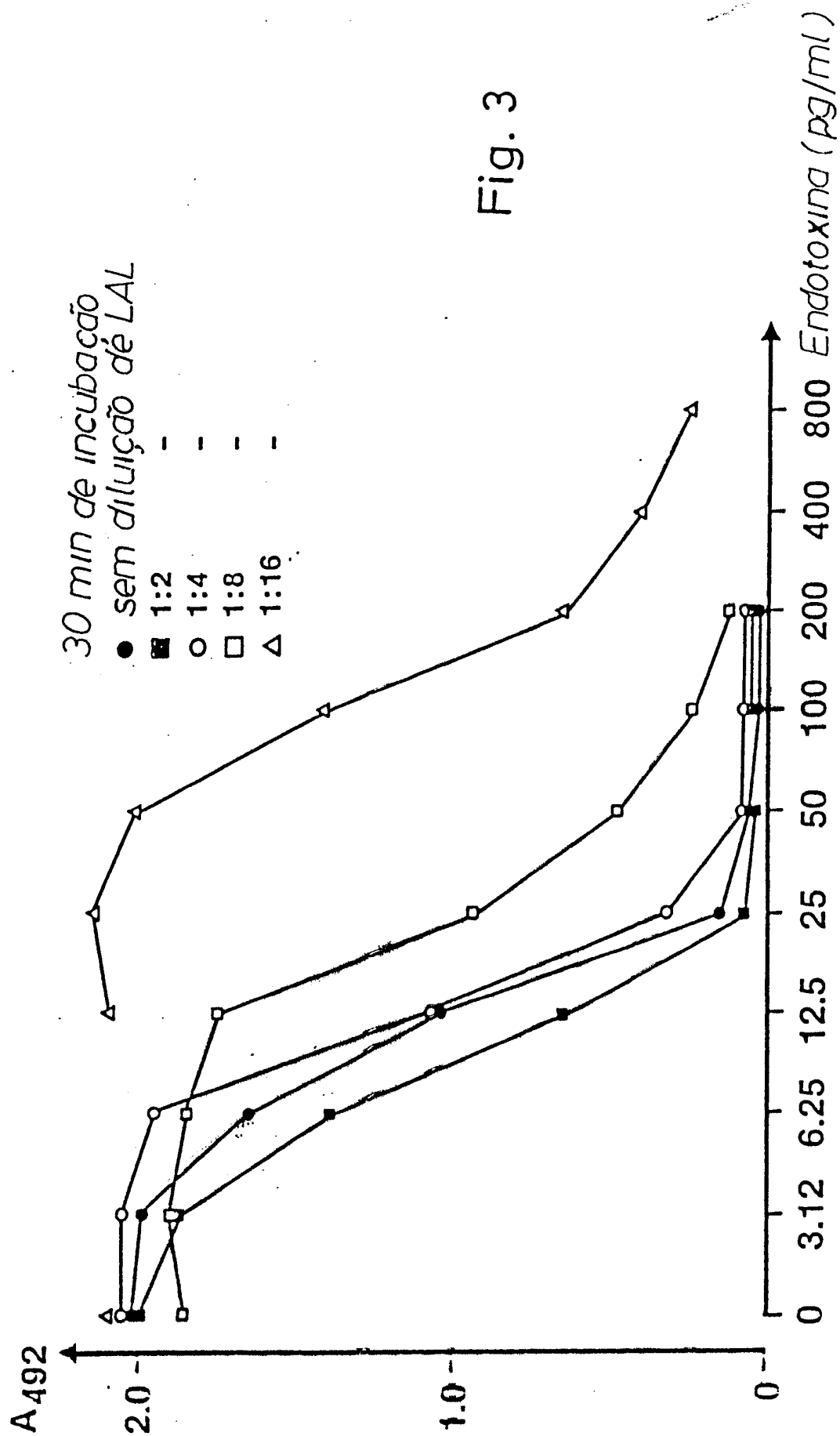
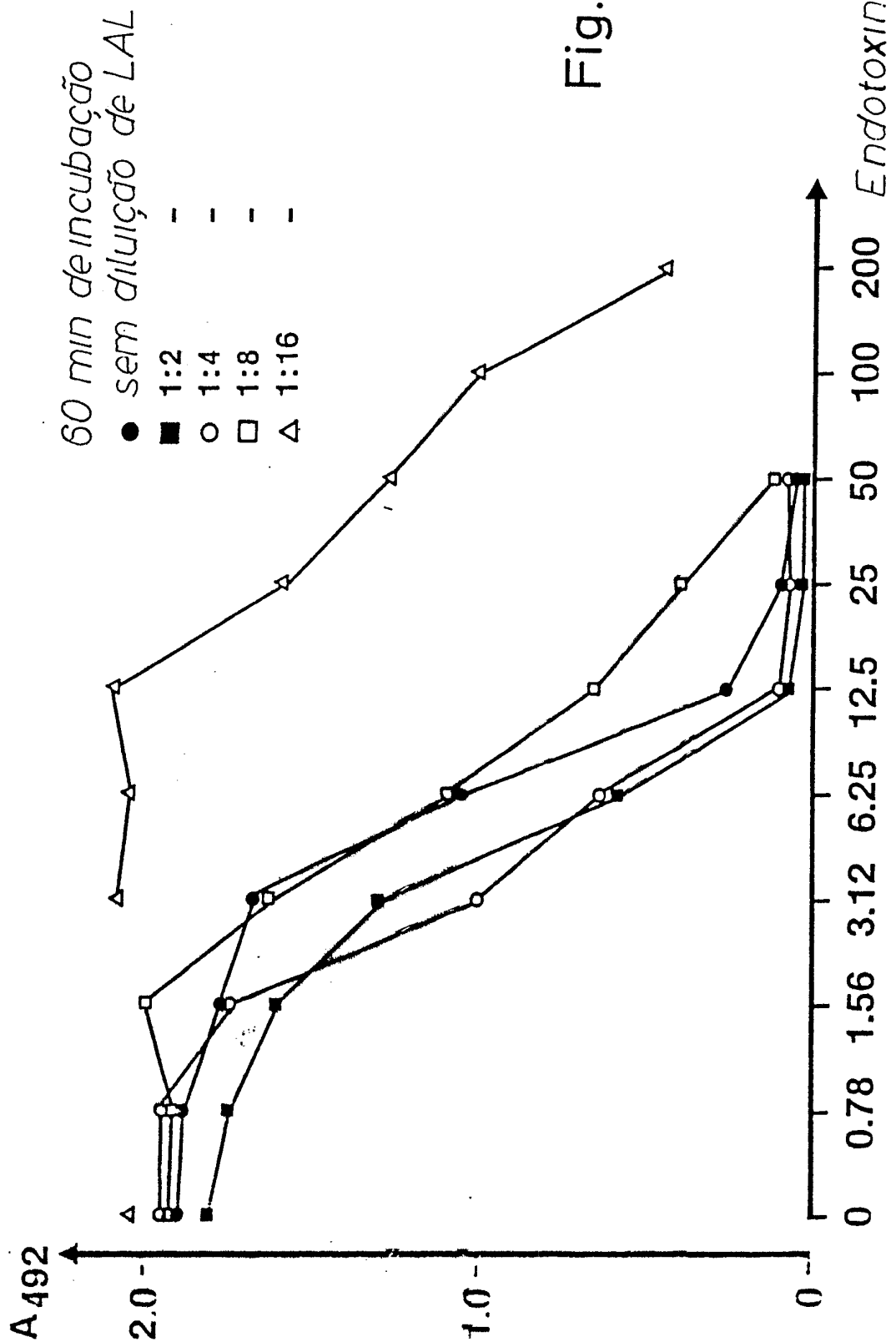


Fig. 3

curvas de reação LAL LPS sob diferentes condições de
período de incubação e de diluição de LAL



Curvas de reacção LAL LPS sob diferentes combinações de
período de incubação e de diluição de LAL

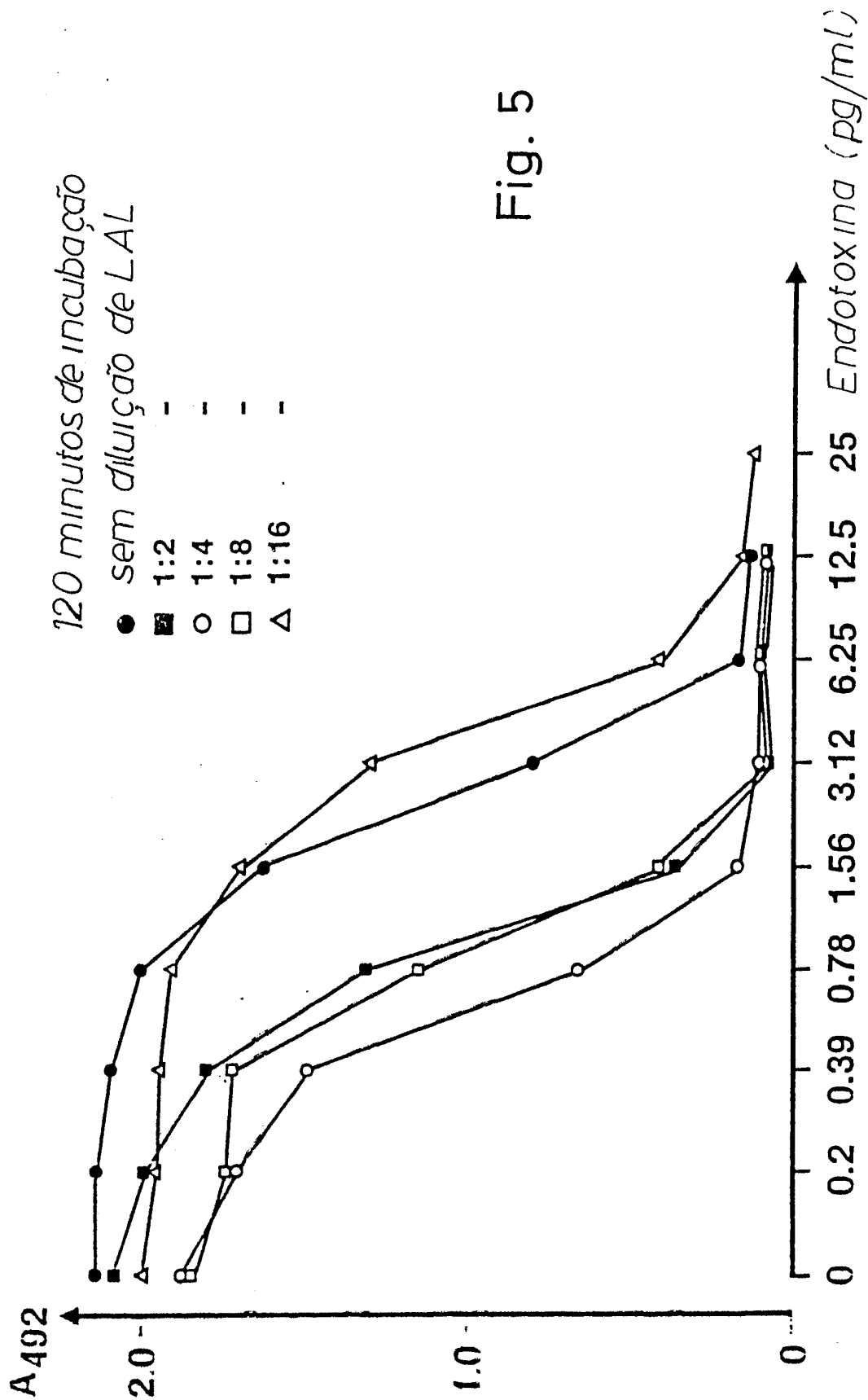


Fig. 5

período de incubação e de diluição de LAL

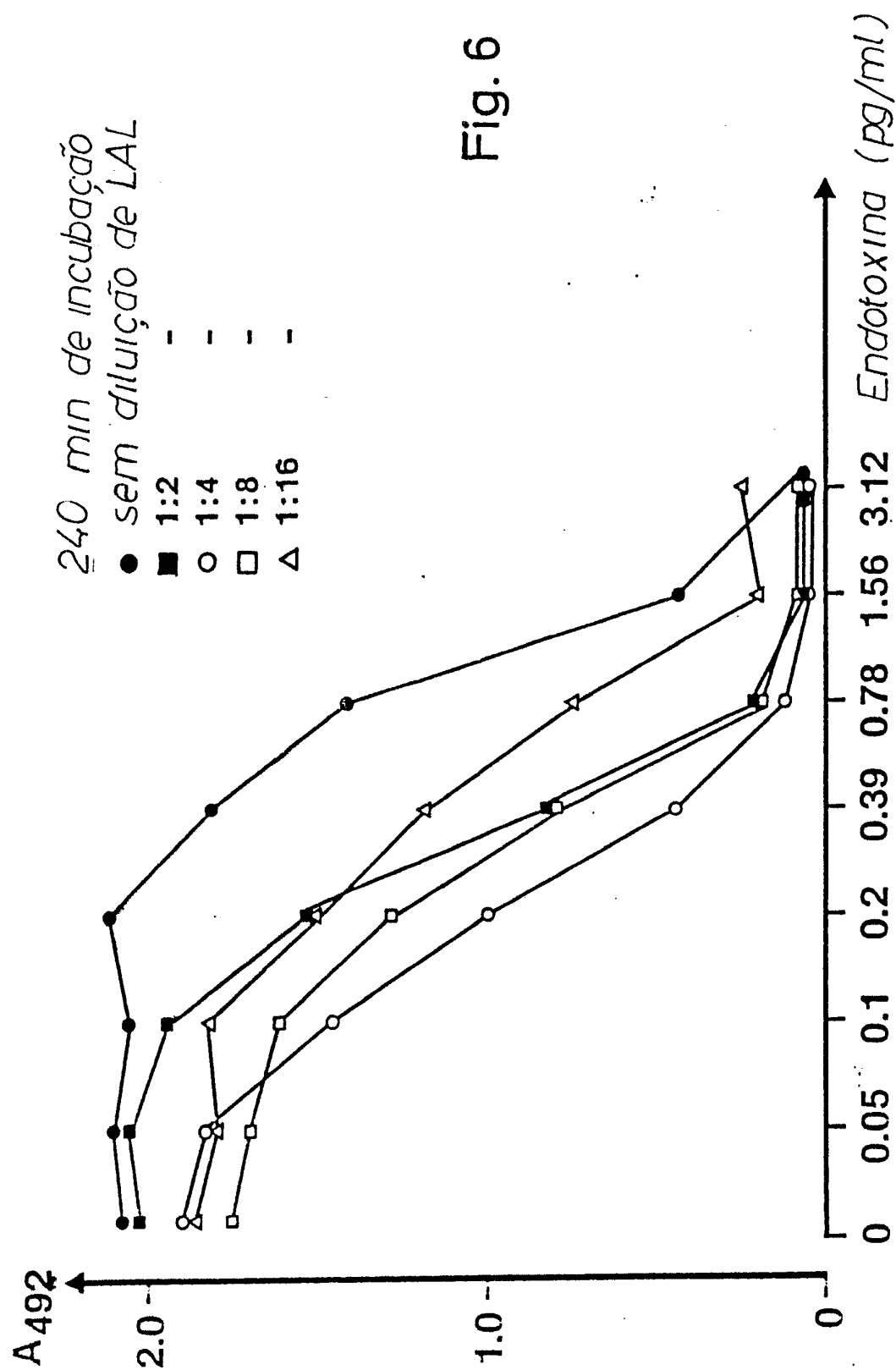


Fig. 6

Recuperação de LPS a partir de plasma

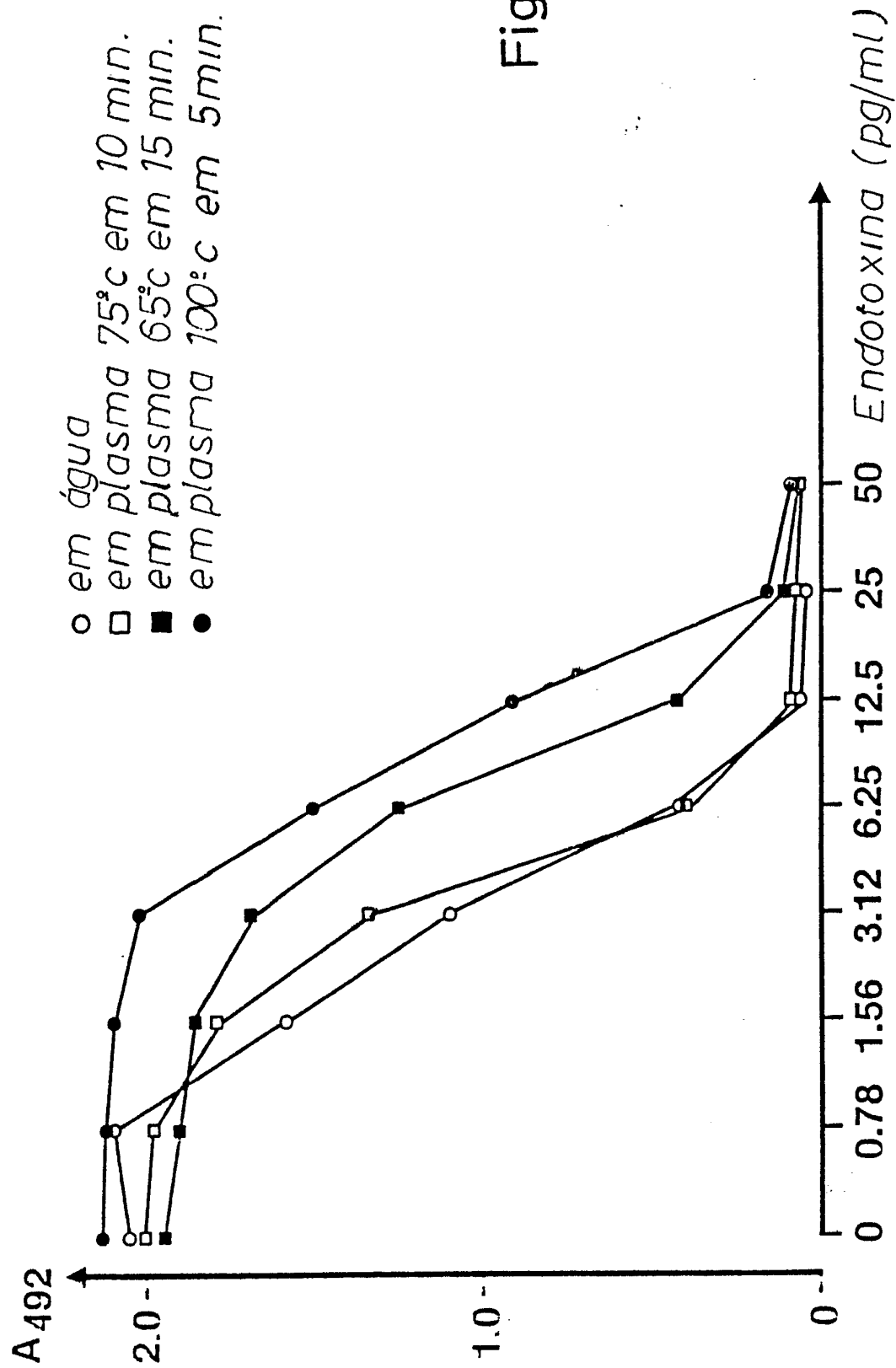


Fig. 7

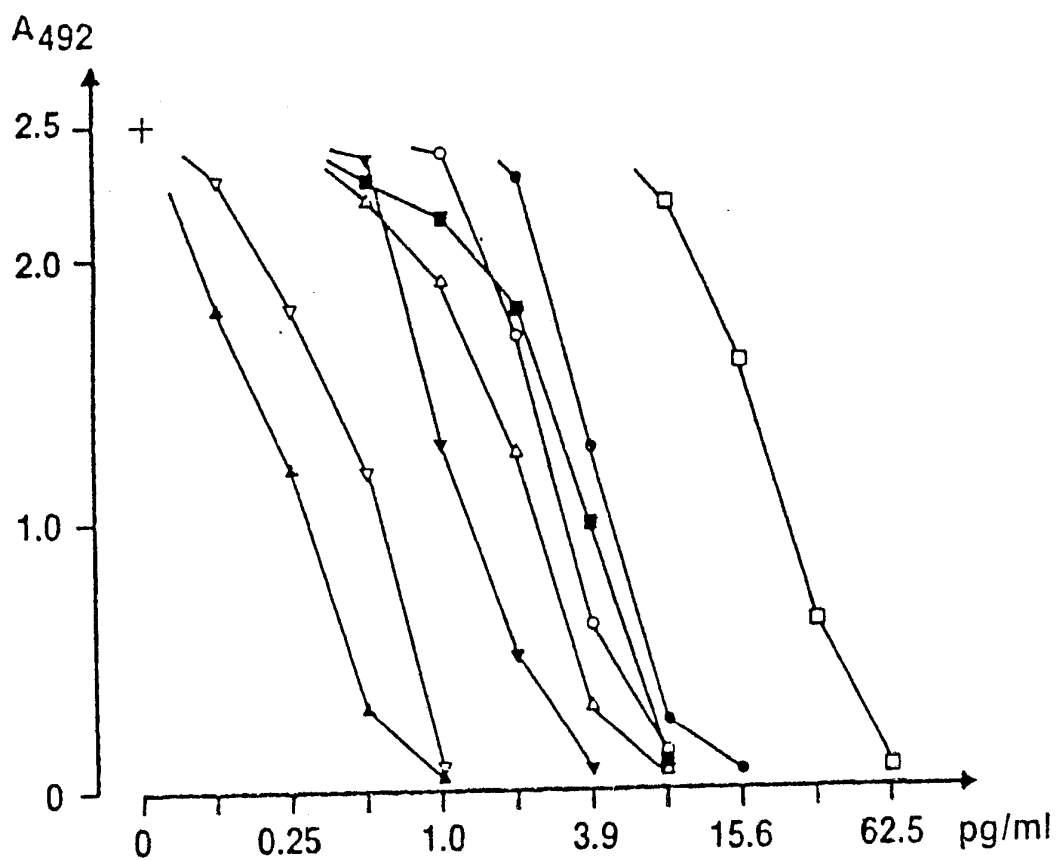


FIG. 8

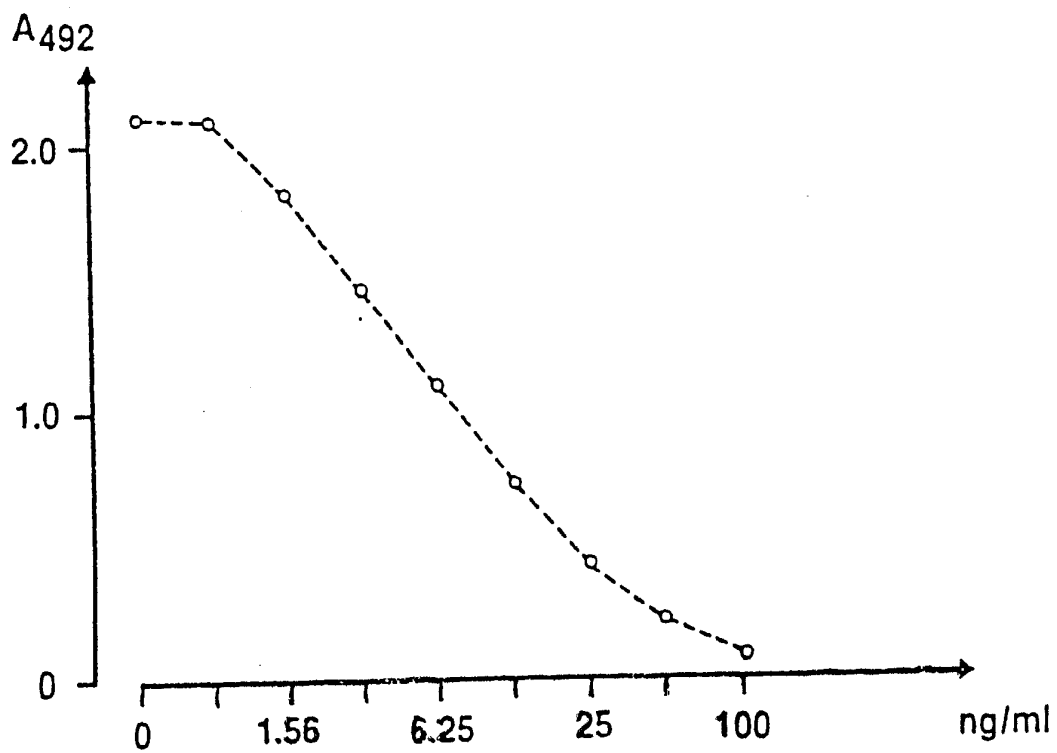


FIG. 9

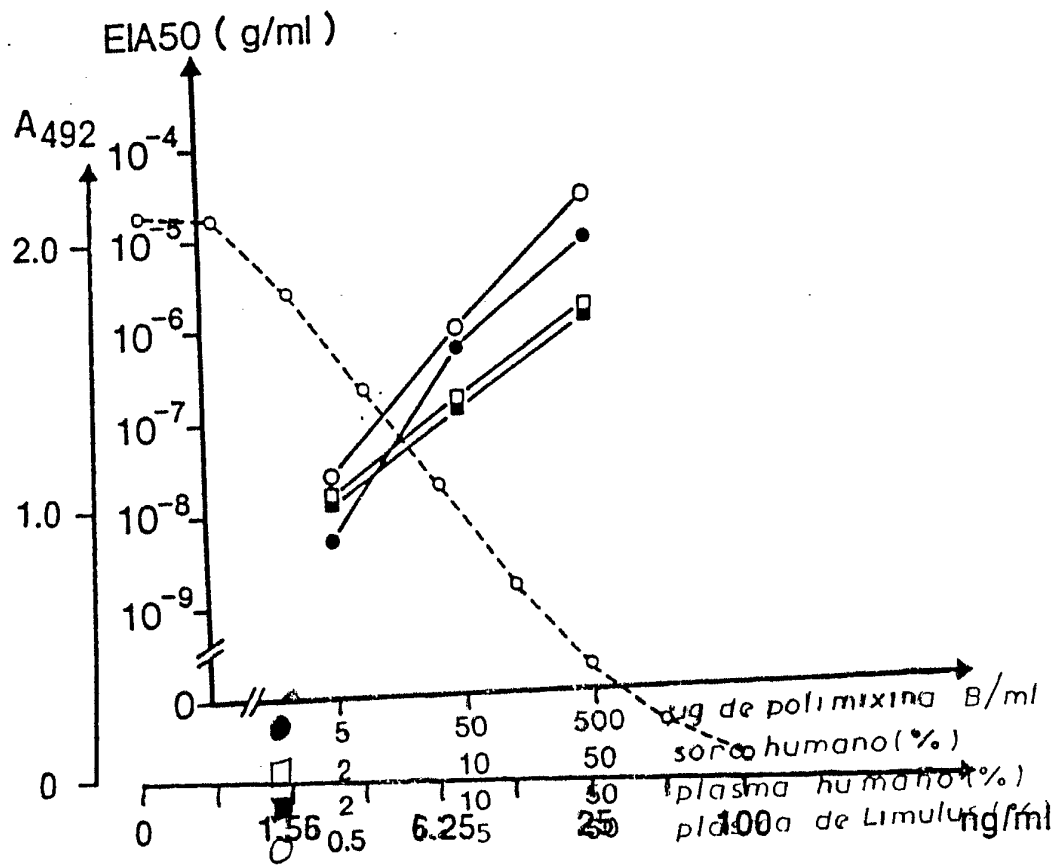


FIG. 10