



"Processo para reduzir a contaminação de soluções de macromoléculas por endotoxinas de origem bacteriana"

para que

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

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo para reduzir endotoxinas bacterianas, contaminantes numa macromolécula biologicamente útil. Um meio aquoso, contendo uma macromolécula contaminada por endotoxinas, é misturado com um surfactante dialisável e a mistura assim formada é posta em contacto com um sorvente de endotoxinas para formar uma mistura de fase sólida-líquida. O contacto é mantido até a endotoxina se ter ligado ao sorvente. O surfactante é separado por diálise da fase líquida aquosa numa altura não anterior ao passo de manutenção. Separa-se e recupera-se a fase líquida contendo a macromolécula.

-2-

MEMÓRIA DESCRITIVACampo de Aplicação

O presente invento descreve processos de separação e, em particular, um processo para separar endotoxinas de macromoléculas.

Antecedentes

As bactérias são muito resistentes e desenvolvem-se na água com exigência mínimas de nutrientes. As bactérias gram-negativas podem produzir endotoxinas a partir das paredes das suas células. As endotoxinas são também referidas como lipopolissacáridos (LPS). As endotoxinas são portanto um contaminante potencial de qualquer solução aquosa. Além disso, as endotoxinas são extremamente estáveis e resistem a temperaturas e a valores de pH extremos.

As endotoxinas têm um largo espectro de actividade biológica. Em particular, as endotoxinas são tóxicas para o homem e outros animais, provocam febre (são pirogénicas) quando presentes apenas em vestígios e podem causar choque hipotensivo, coagulação intravascular disseminada e mesmo a morte.

Ainda que utensílios de vidro ou de plástico, a água e muitos tampões possam ser eficientemente descontaminados de endotoxinas livres [ver por exemplo, Sofer Biotechnology, 2:1035-1038 (1984) e Issekutz, J. Immunol. Methods, 61: 275-281 (1983)] muitas macromoléculas proteínicas como as hormonas, imunoglobulinas e enzimas são biologicamente inactivas após tais tratamentos. Isto constitui um problema particularmente importante nos recentes progressos em biotecnologia. A contaminação bacteriana de produtos biologicamente úteis é considerada problema. [Wightsmith et al., Prog. Clin. Biol. Res. 43, 287 (1982)]. As bactérias produtoras de endotoxinas usadas em experiências de engenharia genética podem aumentar muito o risco de contaminação, por endotoxinas, dos materiais produzidos por estas técnicas.

-3-

A ultrafiltração, a diálise e muitos processos cromatográficos separam pequenas moléculas das endotoxinas, com base na diferença de tamanhos entre a pequena molécula e a endotoxina a qual se agrega em micelas de elevado peso molecular nas soluções aquosas. As endotoxinas e muitas macromoléculas são contudo de tamanho demasiado semelhante para poderem ser separadas usando só estas técnicas como meios de separação. Em solução, os monómeros de endotoxinas podem ligar-se a macromoléculas proteínáceas e manifestar ainda actividade de endotoxina em sistemas biológicos.

Têm sido usadas matrizes de cromatografia com substituintes adequados para adsorver as endotoxinas de soluções aquosas. A patente americana Nº. 3.897.309, de Grabner, descreve o uso de resinas básicas troca-aniões como os dietilaminoetil-dextranos para reduzir o número de endotoxinas de soluções de asparaginase. O enzima é dissolvido em tampão contendo sal (0,1 e 0,2 M) e passa através de uma coluna cheia com um derivado de dextrano. As endotoxinas aderem ao enchimento da coluna fornecendo portanto um eluído com menor concentração de endotoxinas. As concentrações de endotoxina em soluções de asparaginase podem ser reduzidas por aquele método, como se comprova pelos valores do ensaio de lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) de soluções tratadas e não tratadas.

A patente americana Nº. 4.381.239, de Chibata, descreve a remoção de pirogénios (como sendo endotoxinas) pelo uso de adsorventes compreendendo veículos insólúveis como a agarose, e um composto heterocíclico contendo azoto, directamente ligado ao veículo ou ligado por um espaçador ("spacer"). A maior parte das soluções que serviram de exemplo e que foram descontaminadas eram soluções salinas ou continham moléculas pequenas como as de glucose ou de um aminoácido. Também se trataram, contudo, soluções de imunoglobulina, enzimas e hormonas. Os níveis de pirogénios nas soluções tratadas, aquosas ou salinas, variaram entre 0 e 11 nanogramas por mililitro (ng/ml), medidos como endotoxinas. Com a insulina o nível de endotoxinas foi de 5 ng/ml até 0,4 ng/ml, isto é, uma redução de aproximadamente 10 vezes.



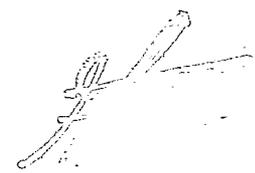
-4-

Morrison et al., Immunochemistry, 13 : 813-818 (1976) relatam que a polimixina B (PMB), um antibiótico de péptido cíclico lipofílico segregado pelo Bacillus polymyxa [The United States Pharmacopeia, Revisão 20ª, 638 (1980)], se liga à parte de lípido A da endotoxina dum modo que sugere uma relação estequiométrica de uma molécula de PMB para um monómero de endotoxina (LPS). A ligação de PMB ao LPS bloqueia as propriedades mitogénicas e outras propriedades biológicas, dependentes do lípido A, do LPS. Além disso, o LPS modificado pela PMB (PMP-LPS) é, segundo aquele trabalho, menos letal em embriões de frangos, ratinhos, coelhos e cães.

Duff et al., em Clinical Research, 30, 365A (1982) descrevem um método de remoção de endotoxinas por afinidade cromatográfica usando a PMB. Resumidamente, a polimixina B (PMB) ligada a Sepharose 4B activada foi misturada com endotoxina dissolvida em água ou soro salino, livres de pirogénios, e a mistura resultante foi agitada até se obter o equilíbrio. Pelo menos 90% de endotoxina ficou retida na resina associada à PMP. O método de Duff et al. separa soluções de água ou de soro salino, isentos de pirogénios, de LPS adicionado. O método não foi usado com soluções de macromoléculas e LPS. Além disso os autores não afirmam que o processo seja adequado para remover endotoxinas de soluções de macromoléculas.

Issekutz, em J. Immunological Methods, 61 : 275-281 (1983) descreve um método semelhante em que se usa a PMB ligada a Sepharose 4B, como adsorvente de afinidade para o LPS. Issekutz também usa o adsorvente para separar o LPS de soluções de pequenas moléculas como as de um meio de cultura de tecidos isentos de sal ou de soro e mostra ainda um exemplo isolado em que a endotoxina é separada dum meio de cultura de tecidos contendo 10% de soro. Issekutz afirma que a presença de soro não altera a eficiência da remoção das endotoxinas.

Issekutz também descreve a remoção de pelo menos 85% de 500 microgramas de endotoxina ligada a PMB, numa coluna, por eluição com uma solução de desoxicolato de sódio a 1% num tampão Tris 0,1 molar a um pH de 8,0. O desoxicolato foi separado, por



-5-

diálise, da endotoxina eluída.

Como adiante se descreve, trataram-se soluções que continham o enzima catalase contaminado com endotoxina, por cromatografia de afinidade com Sepharose 4B ligada a PMB, segundo o processo de Issekutz. A solução resultante, contendo catalase, retinha apenas metade da proteína da solução original e cerca de 7 a 12% da endotoxina original. Aproximadamente 10% da endotoxina restante estava firmemente associada ao enzima e permaneceu associada ao enzima durante os tratamentos subsequentes com PMP-Sepharose 4B. Crê-se portanto que a remoção menos eficiente de endotoxina de uma solução contendo proteína se deve ao facto da endotoxina estar complexada com a proteína no soro.

A patente americana Nº. 4.276.050, de Firca et al., descreve um método para detectar endotoxinas em fluidos do corpo como sangue, plasma e soro. De acordo com a patente, a associação de endotoxinas com lípidos e proteínas no fluido mascara a actividade biológica da endotoxina. Além disso sabe-se que os fluidos do corpo contêm inibidores do ensaio de lisado de amébocitos de *Limulus*, usado para avaliar a presença de LPS.

A patente descreve genericamente como desmascarar as endotoxinas por tratamento com sal, detergentes ou soluções de produtos químicos orgânicos como o Tween 80 a 2%, o sulfato de dextrano a 2%, cloreto de sódio a 3%, ou o tiocianato de amónio a 2% e, de preferência, a benzamidina. O exemplo da patente de Firca et al. utiliza soluções 0,002 M de benzamidina ou dos seus sais ácidos de adição biologicamente compatíveis. Estas soluções são misturadas com os fluidos do corpo e separadas por cromatografia de afinidade. As endotoxinas "desmascaradas" aderem à coluna e são eluídas com soluções fortes de detergentes ou de sais, como as de dodecilsulfato de sódio a 2% (SDS), desoxicolato de sódio a 3% ou MgCl 2M. As endotoxinas eluídas são precipitadas com álcool e detectadas por métodos já conhecidos.

Ainda que se afirme que a técnica separa endotoxinas de proteínas e lípidos dos fluidos do corpo obtendo-se endotoxinas purificadas, não se refere que a separação de proteínas e lí-

-6-

pidos de endotoxinas produza proteínas e lípidos purificados, suficientemente isentos de endotoxinas para serem usados via parentérica num animal.

Por exemplo, se forem removidas 90% de endotoxinas e concentradas na coluna, como acima se descreveu por técnica semelhante dada por Duff, o método de Firca et al produzirá endotoxinas suficientemente purificadas para permitir a quantificação.

Esse método, contudo, permitirá que cerca de 10% da endotoxina presente na origem, ainda permaneça associada à proteína a ser eluída da coluna. A presença desses 10% de endotoxina associada à proteína pode não afectar a avaliação da endotoxina. Não obstante, a proteína contaminada com endotoxina pode permanecer pirogénica. Assim, ainda que o método de Firca et al seja útil para a purificação de endotoxinas não permite purificar a proteína ou outras macromoléculas ao ponto de serem suficientemente isentas de endotoxinas para serem usadas por via parentérica, segundo a avaliação de *Limulus* ou por outras determinações.

Seria útil dispor de um método para separar endotoxinas de macromoléculas biologicamente úteis que pudesse remover suficiente endotoxina e produzir uma macromolécula que passasse o ensaio pirogénico no coelho, da farmacopeia americana [The Pharmacopeia of the United States of America, 17ª Revisão, 863 (1965)]. Seria vantajoso que esse método não prejudicasse substancialmente a actividade biológica da macromolécula e que não resultasse num produto com outras substâncias adicionadas que pudessem ser perigosas para a administração parentérica.

Resumo do Invento

O presente invento refere-se a um processo para reduzir a concentração de endotoxinas bacterianas numa solução contendo macromoléculas biologicamente úteis, caracterizado por compreender as seguintes operações:

(a) misturar um surfactante dialisável com uma macromolécula biologicamente útil que contenha uma quantidade de endotoxina,



-7-

contaminante, num meio aquoso, obtendo-se uma mistura aquosa. O surfactante assim utilizado tem uma concentração crítica de micelas (cmc) de pelo menos cerca de 0,2% em peso ou pelo menos de cerca de 5 milimolar e, de preferência cerca de 0,5% em peso ou pelo menos cerca de 8 milimolar, é não pirogénico, é tolerável fisiologicamente, é não desnaturante e não revela carga eléctrica global ao pH da mistura aquosa. O surfactante é usado em concentração superior à da sua cmc,

(b) aquela mistura aquosa é posta em contacto com um adsorvente de endotoxinas, insolúvel em água, de fase sólida, contendo um agente adsorvente de endotoxinas como a polimixina B ligada a uma matriz sólida que pode ser monolítica ou em partículas, para formar uma mistura de fase sólida-líquida,

(c) mantém-se o contacto da mistura de fase sólida-líquida, de preferência de modo substancialmente contínuo, por agitação ou por fluxo, durante um período de tempo predeterminado suficiente para que a endotoxina se ligue ao adsorvente de fase sólida formando assim uma segunda mistura de fase sólida-líquida na qual a fase líquida contém água, a macromolécula e uma reduzida proporção de endotoxina/macromolécula quando comparada com a proporção que estava presente na primeira mistura de fase sólida-líquida. A segunda mistura da fase sólida-líquida pode ainda conter surfactante,

(d) separaram-se as fases sólida e líquida da segunda mistura de fase sólida-líquida,

(e) o surfactante é separado por diálise da fase líquida não antes da fase (c), isto é, (i) quer durante a operação de manter o contacto, (ii) quer após separação das fases sólida e líquida, obtendo-se uma fase líquida substancialmente isenta de surfactante,

(f) e recolhendo depois a fase líquida, isenta de surfactante, que contém a macromolécula e uma concentração reduzida de endotoxina contaminante a uma concentração de macromoléculas adequada para administração in vivo.

Num arranjo deste invento, o surfactante está presente

na segunda mistura líquida e é separado por diálise da solução na operação (e), isto é, após separação das fases sólida e líquida. Num outro arranjo, o surfactante é separado por diálise da composição durante as operações de pôr em contacto e de manter esse contacto.

A macromolécula descontaminada produzida por um dos processos deste invento é particularmente útil na administração parentérica in vivo a animais como os animais de laboratório, p. ex. ratinhos, ratos e coelhos, e animais como cavalos, vacas, cães e carneiros e ainda ao homem.

Uma vantagem do invento é que as soluções de macromoléculas ^{biologicamente} úteis, contaminadas com endotoxinas, podem ser descontaminadas pelo processo do invento de modo a que as soluções passem o Ensaio Pirogénico do Coelho U.S.P. a uma concentração de macromoléculas adequada à introdução em animais como aqueles.

Outra vantagem é que as macromoléculas purificadas pelo método do invento permanecem biologicamente activas.

Uma outra vantagem do invento é que as macromoléculas podem ser utilizadas in vitro ou in vivo, livres dos efeitos das endotoxinas do sistema.

O processo tem a vantagem de ser simples, prático e adequado para tratar grandes volumes de material numa instalação comercial.

Outros benefícios e vantagens tornar-se-ão evidentes aos peritos na arte a partir da descrição detalhada que se segue.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é um desenho que contém sete gráficos (painéis) (A-H) que ilustram a resposta à febre em coelhos durante o ensaio pirogénico U.S.P. adiante descrito. Os coelhos foram injectados com 1 mililitro (ml) de solução contendo 0,2 miligramas (mg) de catalase tratada ou não tratada ou 1 ml de solução de controlo. Todos os animais são estabilizados duas horas antes da injeccão e têm uma temperatura basal de 37,5 a 29,5°C.

-9-

Os animais do gráfico A foram injectados com catalase não tratada, os do gráfico G foram injectados apenas com soro salino como um controlo, enquanto que os do gráfico H foram injectados com uma solução que continha 1 micrograma (μg) de endotoxina da Salmonella minnesota Re595 como segundo controlo. Os animais foram injectados com catalase que, para outras experiências, foi tratada do modo seguinte: painel de experiência B = polimixina B ligada a Sepharose 4B (PB-Seph 4B); painel C = polimixina B (PB) não ligada e octilglucopiranosídeo (OBDG); painel D = PB sózinha; painel E = OBDG sózinha; e painel F = PB-Seph 4B mais OBDG. Os resultados indicam que apenas a catalase dada por tratamento completo (painel F) satisfaz os critérios de não-pirogeneidade.

A Figura 2 contém cinco gráficos de painéis de experiências (A-E) que ilustram os comportamentos de gradientes de CsCl em composições: de catalase sózinha (linha a cheio assinalada com ●; painel A); ^3H -LPS sózinho (linha a tracejado assinalada com O; painel B) e suas misturas. Quando a catalase e ^3H -LPS são misturados e mantidos em contacto, observa-se (painel C) um deslocamento do ^3H -LPS para a região da catalase, indicando ligação, à proteína, da endotoxina. O tratamento PB-Seph 4B da mistura (painel D) produziu uma redução de ^3H -LPS mas o LPS permanece claramente associado ao pico de proteína. O painel E comprova que o tratamento com PB-Seph 4B mais OBDG tem como resultado uma remoção completa do ^3H -LPS, indicando a capacidade do OBDG dissociar o ^3H -LPS ligado à proteína.

A actividade da catalase (●), em unidades Bergmeyer por 10 microlitros (Unidades/10 μl), está indicada no eixo de ordenados da esquerda. A actividade LPS (O), em contagens por minuto (cpm), está indicada no eixo interior de ordenadas, à direita. O peso específico, em gramas por centímetro cúbico (g/cc), está indicado na linha a cheio das ordenadas mais à direita. As fracções do gradiente, do fundo para o topo e da esquerda para a direita, estão indicadas em abcissas.

A figura 3 contém seis painéis de experiências (gráficos A-F) que mostram comportamentos de ultracentrifugação de CsCl

-10-

do $^3\text{H-Re595 LPS}$ ($^3\text{H-LPS}$) quando tratado ou não tratado com OBDG antes de misturar e de manter em contacto (incubação), com soro normal de coelho (NRS). O painel A mostra o comportamento observado do gradiente quando $^3\text{H-LPS}$ é incubado com NRS sem o tratamento pelo OBDG. O painel B mostra o comportamento observado do gradiente quando $^3\text{H-LPS}$ é tratado com OBDG a uma concentração final ^{de} 5 milimolar (5 mM), antes de incubar com NRS. O painel C mostra os resultados observados quando a concentração de OBDG é aumentada até 10 mM e mostra um deslocamento parcial das contagens de $^3\text{H-LPS}$ em direcção à posição da lipoproteína de alta densidade (HDL). O painel D mostra o resultado obtido quando a concentração de OBDG foi ainda aumentada até 20 mM e mostra um deslocamento completo das contagens de $^3\text{H-LPS}$ para a posição da HDL. O tratamento de $^3\text{H-LPS}$ com OBDG 20 mM, seguido de incubação com soro salino mas na ausência de NRS, mostrou não haver deslocamento da posição do pico de contagem (painel E). O painel F mostra o resultado obtido quando o NRS foi tratado com OBDG 10 mM antes de incubar com o $^3\text{H-LPS}$ e mostra um efeito não distinto do visto no painel C que utilizou um pré-tratamento de $^3\text{H-LPS}$ com a mesma concentração final de OBDG.

Descrição Detalhada do Invento

A - Processo para Remover Endotoxinas

O presente invento descreve um processo prático e eficiente de reduzir a quantidade de endotoxina bacteriana contaminante numa solução que contenha macromoléculas biologicamente úteis, em particular macromoléculas proteínáceas tais como um enzima, uma imunoglobulina, ou semelhantes, sem prejudicar substancialmente a actividade biológica das macromoléculas. Na variante prática preferida, o processo permite obter uma macromolécula substancialmente isenta de endotoxina, com a concentração particular à qual a macromolécula é usada na administração in vivo, como no caso da administração parentérica a um animal.

O processo inclui, genericamente, as seguintes operações:

(a) misturar a macromolécula biologicamente útil que contenha uma quantidade contaminante de endotoxina com um surfactante dia

-11-

lisável num meio aquoso, obtendo-se uma mistura líquida, aquosa, tendo o surfactante utilizado uma concentração crítica de micelas (cmc) de, pelo menos, cerca de 0,2% em peso ou, pelo menos, cerca de 5 milimolar, e estando presente sob a forma de dispersão, no meio aquoso, em quantidade acima da sua cmc;

(b) a mistura aquosa é posta em contacto com um adsorvente de endotoxinas, insolúvel em água, de fase sólida, contendo um agente adsorvente de endotoxinas como a polimixina B ligada a uma matriz sólida, obtendo-se uma mistura de fase sólida-líquida;

(c) o contacto da mistura de fase sólida-líquida é mantido (de preferência de modo contínuo) por um predeterminado período de tempo suficiente para a endotoxina se ligar ao adsorvente, formando-se assim uma segunda mistura de fase sólida-líquida cuja fase líquida contém água, a macromolécula e uma proporção em peso de endotoxina/macromolécula reduzida em relação à mesma proporção na primeira mistura aquosa; a segunda mistura líquida pode ainda conter surfactante; forma-se também uma fase sólida que contém o adsorvente e a endotoxina a ele ligada;

(d) separam-se as fases sólida e líquida da segunda mistura de fase sólida-líquida;

(e) o surfactante é substancialmente separado por diálise da fase líquida nunca antes da operação (c) de manutenção isto é, quer (i) durante a operação em que se mantém o contacto, quer (ii) após separação das fases sólida e líquida; e

(f) recolhe-se a fase líquida substancialmente isenta de surfactante.

Em qualquer das sequências, a fase líquida produzida no fim é uma solução aquosa da macromolécula que está substancialmente isenta de surfactante e contém apenas uma reduzida quantidade de endotoxina, a uma concentração de macromoléculas utilizada para administração in vivo.

Num arranjo do processo mencionado, a diálise é realizada após o passo de manutenção de contacto, enquanto que, num outro arranjo de maior preferência, as operações de manutenção do con

-12-

tacto e de diálise se realizam praticamente ao mesmo tempo. Estes dois arranjos e as suas variantes são discutidas abaixo.

Numa primeira variante do arranjo mencionado em primeiro lugar, o adsorvente de endotoxinas apresenta-se em partículas sob a forma de pequenas pérolas ou em pó (quando seco) e está de preferência contido numa coluna usada como coluna cromatográfica. O meio aquoso contendo as macromoléculas, a endotoxina sua contaminante e o surfactante são carregados na coluna contendo adsorvente e depois eluídos segundo as operações de pôr em contacto e de manter esse contacto. O eluído aquoso resultante que constitui a fase líquida separada da segunda mistura de fase sólida-líquida é depois dialisado para remoção do surfactante.

Numa segunda variante, o adsorvente sólido é monolítico tendo o agente adsorvente de endotoxinas fixado numa ou mais superfícies. Normalmente, um adsorvente monolítico encontra-se sob a forma de uma ou mais folhas ou telas, ou de uma superfície dum tubo ou de outro tipo de vaso. Nesta variante, as operações de pôr em contacto e de manter esse contacto, são ainda realizados pela passagem de um meio aquoso sobre a superfície que contém o adsorvente, seguida de diálise.

Num outro arranjo ainda mais preferido, as operações de contacto e de diálise realizam-se praticamente ao mesmo tempo.

Numa primeira variante deste segundo arranjo, o adsorvente em fase sólida encontra-se sob a forma de partículas e pode ser o mesmo adsorvente em partículas atrás descrito. Nesta variante, a mistura atrás descrita é posta em contacto com a adsorvente de endotoxinas, em fase sólida, num saco de diálise cuja exclusão de pesos moleculares do soluto molecular é inferior ao peso molecular da macromolécula. O contacto entre o adsorvente de fase sólida e a fase líquida é de preferência mantido de modo praticamente contínuo quer agitando quer revolvendo o saco com o líquido de diálise, de modo a que as concentrações de macromoléculas, endotoxinas e surfactantes sejam praticamente homogêneas em toda a fase líquida e em qualquer altura durante o período de tempo da operação conjunta contacto-diáli-

-13-

se, e o adsorvente de endotoxinas possa facilmente contactar o líquido dentro do saco de diálise. A operação contacto-diálise normalmente termina quando a fase líquida da segunda mistura formada esteja substancialmente isenta de surfactante. As fases sólida e líquida são depois separadas, p. ex. por centrifugação, de modo a obter uma fase líquida, aquosa, separada que contenha a macromolécula substancialmente livre de surfactante, bem como uma quantidade reduzida de endotoxina contaminante, a uma concentração de macromoléculas utilizada para administração in vivo.

Uma segunda variante deste segundo arranjo utiliza um adsorvente de endotoxinas, monolítico, que constitui a superfície de uma membrana semi-permeável cuja exclusão de peso molecular de soluto seja inferior ao da macromolécula. Esta variante é semelhante à variante referida imediatamente acima, excepto em que o adsorvente de endotoxinas, como a polimixina B, está fixado à superfície da membrana, de modo a que o fluxo da primeira mistura aquosa através da superfície da membrana que inclui o agente adsorvente de endotoxinas, permite obter o contacto contínuo preferido durante o período de tempo que a mistura líquida percorre o dispositivo de diálise.

Assim, esta variante permite obter uma descontaminação e separação relativamente simples e directas. A primeira mistura aquosa de macromoléculas contaminadas com endotoxinas e de surfactante vai alimentar o dialisador, p. ex. um dispositivo de diálise por fibras ôcas usado em hemodiálise, a endotoxina presente é adsorvida à superfície da membrana em contacto com a mistura à medida que o líquido atravessa o dispositivo, o surfactante é separado por diálise da mistura durante esse mesmo percurso, e as fases sólida e líquida são separadas à medida que o líquido sai do dialisador, onde a fase líquida emergente contém a macromolécula e uma quantidade reduzida de endotoxina contaminante, a uma concentração de macromoléculas utilizada para administração in vivo.

Examinando os arranjos descritos e as suas variantes, pode ver-se que, no primeiro arranjo, macromoléculas biológica

-14-

mente úteis, contendo uma quantidade de endotoxinas pirogênicas ou contaminantes, são misturadas com um surfactante dialisável num meio aquoso, obtendo-se uma mistura aquosa. Esta mistura é posta em contacto com um adsorvente de endotoxinas, de fase sólida, em partículas ou monolítico (primeira e segunda variante, respectivamente), que contém um agente ou agentes adsorventes de endotoxinas ligados, ou fixados por qualquer outro modo, a uma matriz sólida, obtendo-se uma primeira mistura de fase sólida-líquida. Este contacto é mantido por um período de tempo predeterminado suficiente para a endotoxina se ligar, formando portanto uma segunda mistura de fase sólida-líquida. Separaram-se as fases sólida e líquida resultantes, e a fase líquida contendo o surfactante e as macromoléculas é dialisada para se remover o surfactante e se obter uma solução aquosa das macromoléculas.

A primeira variante do segundo arranjo inclui as operações de contacto contínuo da mistura líquida acima descrita com o adsorvente de fase sólida, em partículas, para formar uma primeira mistura de fase sólida-líquida, enquanto se dialisa a mistura de fase sólida-líquida assim formada. A diálise e o contacto contínuo são mantidos por um período de tempo suficiente para que a endotoxina se ligue ao adsorvente e para que se separe por diálise o surfactante do líquido, formando-se uma segunda mistura de fase sólida-líquida. Separaram-se as fases sólida e líquida da segunda mistura e recolhe-se a fase líquida contendo as macromoléculas substancialmente isentas de surfactante.

A segunda variante do segundo arranjo inclui as seguintes operações: uma mistura líquida como acima se descreveu é dialisada usando uma membrana semi-permeável, de fase sólida, contendo um agente adsorvente de endotoxinas fixado sobre a superfície da membrana contactada pela mistura líquida. Continua-se a diálise por um período de tempo suficiente para ligar a endotoxina bem como para remover o surfactante presente na mistura líquida (formando assim uma segunda mistura de fase sólida-líquida), e recolhe-se o dialisado (fase líquida separada).

A solução de macromoléculas acima descrita, antes do tra

-15-

tamento por um dos processos do invento, é referida como contendo uma quantidade contaminante de endotoxina. Depois da aplicação do processo, a solução de macromoléculas diz-se descontaminada, isto é, contém uma concentração reduzida de endotoxinas contaminantes ou é referida com uma frase semelhante. A presença e as concentrações reduzidas (ou quantidades) de endotoxina são avaliadas à concentração da macromolécula em causa a ser utilizada na administração in vivo a um animal, p. ex. um animal de laboratório como o ratinho, o rato ou macaco, ou um animal como o cavalo, vaca, cão ou carneiro, ou ainda o homem.

Sem atender à macromolécula ou animal ao qual ela deve ser administrada, a presença ou relativa isenção (concentração reduzida) de endotoxina é determinada por um de dois ensaios de avaliação. A primeira avaliação é pelo lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) enquanto que o segundo é o ensaio pirogênico do coelho, U.S.P.. Ambos os processos são discutidos a seguir.

Assim, uma solução da macromolécula com uma concentração para uso in vivo num animal que no ensaio LAL seja negativa quanto à endotoxina ou que seja não pirogênica no ensaio pirogênico do coelho, USP, é considerada como sendo isenta de endotoxina contaminante ou como contendo uma quantidade reduzida ou não contaminante de endotoxina. Por contraste, a solução da macromolécula que, na concentração de uso, for positiva quanto à endotoxina no ensaio LAL ou que for pirogênica no ensaio do coelho, U.S.P., será considerada contaminada ou conterá uma quantidade contaminante de endotoxina. Note-se que uma dada solução de macromoléculas pode conter endotoxinas pelo ensaio LAL e não ser pirogênica. De modo análogo uma solução pode estar isenta de endotoxinas pelo ensaio LAL e ser contudo pirogênica. O ensaio a utilizar será portanto dependente do uso que se pretender para a solução, como é sabido dos peritos da arte.

Numerosos tipos de macromoléculas biologicamente úteis podem ser separados das endotoxinas contaminantes pelo processo deste invento. Por exemplo, o processo pode ser usado para descontaminar soluções de proteínas contaminadas com endotoxi-

-16-

nas, incluindo os enzimas como a catalase, imunoglobulinas como a IgG do ratinho ou do homem, hormonas como insulina, tiroglobulina e hormonas da pituitária e outras proteínas que se encontram no corpo como os factores de crescimento, interferões, factores de coagulação e semelhantes. O invento é útil para separar soluções contaminadas de proteínas da parede das células derivadas das bactérias gram-negativas, proteínas de invólucro viral, e outras macromoléculas úteis na preparação de vacinas. O invento é também útil para separar outras macromoléculas que não contenham co-factores lipídicos essenciais como os ácidos nucleicos e semelhantes.

A macromolécula contaminada deve ela própria ser suficientemente grande para que não passe através da membrana de diálise. As macromoléculas com pesos moleculares de pelo menos cerca de 10.000 daltons são suficientemente grandes para que não sejam separadas da solução por diálise com as membranas de diálise vulgarmente usadas. Assim, uma molécula com peso molecular de cerca de 10.000 dalton ou superior, pode ser aqui definida como uma macromolécula. Podem obter-se membranas de diálise na Amicon Corporation, p. ex., que têm exclusão de pesos moleculares abaixo de 10.000 daltons. Por consequência uma definição mais adequada de macromolécula é a de uma molécula que não se separa da mistura por diálise nas condições em que o surfactante é separado por diálise.

A macromolécula é portanto não dialisável enquanto que o surfactante é dialisável quando se usa o ensaio padrão de diálise a seguir discutido.

Num arranjo preferido, a macromolécula é uma proteína presente na mistura aquosa macromolécula-surfactante antes de contactar com o adsorvente de endotoxinas, a uma concentração de cerca de 200 microgramas por mililitro ($\mu\text{g/ml}$) até cerca de 100 miligramas por mililitro (mg/ml) e, com maior preferência, de cerca de 1 até cerca de 50 mg/ml . Como se poderá ver pelos resultados adiante indicados, perde-se uma parte relativamente pequena das macromoléculas durante o processo de purificação enquanto que a concentração da endotoxina decresce 100

-17-

a 10.000 vezes. Assim, a proporção em peso de endotoxina/macro molécula é mais pequena na fase líquida da segunda mistura de fase sólida-líquida do que a mesma proporção na mistura líquida aquosa original. Que a proporção tenha sido reduzida pode facilmente ser verificado comparando a diluição no ensaio de Limulus necessária para a ausência de endotoxinas, a uma dada concentração de proteína na mistura líquida aquosa antes de usar este processo, com a da fase líquida após diálise.

Um surfactante útil no presente invento é por si próprio não pirogénico, tolerável fisiologicamente, não desnaturante e dialisável. O surfactante não revela carga eléctrica global ao valor do pH da primeira mistura aquosa e é, de preferência, não iónico.

Os termos "não pirogénico" são aqui usados para significar que qualquer resíduo de surfactante, presente na solução de macromoléculas dialisada ou presente numa solução de macromoléculas mais concentrada resultante da solução de macromoléculas dialisada, não provoca por si próprio uma resposta pirogénica no ensaio padrão do coelho, U.S.P., adiante discutido. Dito de modo diferente, o surfactante é não pirogénico às concentrações presentes quando a macromolécula for utilizada in vivo (via parentérica).

Sendo não pirogénico, o surfactante está isento de endotoxinas. A ausência de endotoxinas pode ser facilmente verificada pelo ensaio do lisado de amebócito de Limulus (LAL). De novo, a ausência de endotoxinas no surfactante é avaliada à concentração do surfactante residual presente quando se utilizarem as macromoléculas. Descreve-se adiante um estudo de exemplo de um surfactante.

O surfactante é geralmente também tolerável (aceitável) fisiologicamente em animais, numa quantidade residual que pode acompanhar a macromolécula à concentração em que a macromolécula é utilizada in vivo. A pirogeneidade é uma forma de intolerância fisiológica que pode ser revelada por uma substância administrada por via parentérica. Contudo, uma vez que uma das finalidades deste invento é descontaminar uma macromolécula pa

-18-

ra uso parentérico in vivo, o surfactante residual não poderá também causar efeitos secundários adicionais intoleráveis como é o caso de qualquer substância administrada por via parentérica. A tolerância fisiológica do surfactante residual pode ser determinada pelos ensaios farmacológicos normalmente utilizados e bem conhecidos dos peritos da arte.

A característica não desnaturante de um surfactante útil é normalmente determinada em função da capacidade do surfactante solubilizar, e depois reconstituir, as proteínas da membrana usando técnicas já bem conhecidas. A literatura emitida pelos fabricantes e distribuidores frequentemente dá informação sobre as características desnaturantes de um particular surfactante bem como sobre os ensaios para as determinar.

A frase "isento de carga eléctrica global" e outras equivalentes aqui usadas significam que o surfactante é electricamente neutro a um certo valor de pH. Assim, o surfactante pode ser não iónico, forma preferida, ou pode ser zwitteriónico onde as cargas positivas e negativas se equilibram, mas não pode ser aniónico, como no caso do SDS ou de um ácido da bÍlis, nem cationiónico como no caso de um surfactante contendo uma amina quaternária.

A capacidade de um surfactante ser dialisado é de particular importância para o presente invento pois que é através da diálise, como aqui se define, que o surfactante é separado das macromoléculas biologicamente úteis. Praticamente todas as moléculas de surfactante podem ser removidas de uma solução por diálise se for usado um período de tempo suficiente, sendo a diálise aqui considerada uma ocorrência relativamente rápida.

Normalmente, um surfactante com uma concentração crítica de micelas (cmc) relativamente elevada é mais rapidamente separado por diálise de uma solução (ou dispersão) do que um surfactante com uma cmc relativamente baixa. Pensa-se que isto é devido à presença de uma concentração relativamente elevada de surfactante monómero presente na solução para um surfactante de elevada cmc, quando comparado com um surfactante de cmc relativamente baixa, pois que é o surfactante monómero que dialisa

através da membrana.

O ponto de separação entre valores de cmc relativamente elevados e valores de cmc relativamente baixos, para os fins do presente invento, parece ser a uma concentração de pelo menos cerca de 5 milimolar (mM) e de preferência a pelo menos cerca de 8 mM. Assim, é considerado útil um surfactante com uma cmc de cerca de 5 mM ou superior até cerca de 50 mM, desde que o surfactante seja também por si próprio fisiologicamente tolerável, não pirogênico, isento de endotoxinas e não desnaturante.

Numa base de percentagem em peso, de preferência a uma base milimolar, um surfactante útil tem uma cmc de pelo menos cerca de 0,2 gramas por 100 mililitros (g/100 ml) ou pelo menos cerca de 0,2% em peso e, de preferência, uma cmc de pelo menos de 0,5% em peso e até cerca de 2-3% em peso. (Note-se que a percentagem em peso e os valores milimolares não estão exactamente correlacionados para todos os surfactantes úteis pois que estes surfactantes podem diferir muito nos seus pesos moleculares).

Outro meio de avaliar a capacidade de diálise é por um ensaio padronizado. Um ensaio útil é semelhante ao aqui utilizado para a remoção de endotoxinas mas realizado na ausência das macromoléculas e do adsorvente de endotoxinas. Assim, o surfactante é disperso em cerca de 40 ml de soro salino tamponado com fosfato (PBS-Phosphate-Buffered Saline) a uma concentração de surfactante cerca de 4 vezes a cmc do surfactante, p. ex. para o OBDG a cerca de 100 mM. Aqueles 40 ml de líquido são colocados num saco de diálise Spectrophor com uma exclusão de pesos moleculares da ordem dos 12.000-14.000. O saco e o seu conteúdo são depois colocados num vaso fechado de 2 litros cheio com PBS como fluido de diálise, e submeteram-se o vaso e saco a agitação constante por um período de tempo de 48 horas à temperatura ambiente (20-22°C), com pelo menos quatro mudanças do fluido de diálise realizadas a intervalos regulares durante 48 horas.

A quantidade de surfactante que permanece no saco é en-

-20-

tão determinada. Se o surfactante que permanece na solução, neste ensaio, não for mais do que cerca de 2% da quantidade originalmente presente, isto é, 2% de uma quantidade que seja 4 vezes o valor da cmc do surfactante, o surfactante pode considerar-se dialisável para os fins deste invento e o líquido aquoso que contém aquela quantidade de surfactante, pode considerar-se substancialmente livre de surfactante. Por exemplo, usando OBDG a uma concentração inicial de 100 mM (2,94% em peso), encontrou-se, após remoção de endotoxinas, um valor médio de 0,016% em peso ou cerca de 0,5% em peso da quantidade originalmente presente.

Usando as macromoléculas nas mesmas condições com uma concentração inicial conhecida de cerca de 1-10 mg/ml, a retenção de pelo menos cerca de 95% em peso das moléculas inicialmente presentes indica que as macromoléculas não são dialisáveis.

Prefere-se o uso de surfactante desde cerca de 2 até cerca de 6 vezes a sua concentração crítica de micelas para assegurar que todos os complexos endotoxina-macromolécula estejam dissociados. Contudo o uso de concentrações maiores não oferece qualquer vantagem adicional. Além disso concentrações maiores fazem perder surfactante e aumentar o tempo necessário para reduzir a concentração de surfactante até à concentração desejada.

Um surfactante é um emulsionante eficiente apenas a concentrações acima da sua cmc. O surfactante usado no método deste invento deve portanto estar presente inicialmente a uma concentração superior à da sua cmc.

O quadro 1 abaixo, indica as cmc de vários surfactantes disponíveis no comércio, expressas em gramas por 100 ml de solução e, nalguns casos, em concentrações milimolares (mM). Os valores do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB-Hydrophilic-Lipophilic Balance) para vários surfactantes escolhidos, estão também indicados.

QUADRO 1

Concentração Crítica de Micelas de Vários Surfactantes

Surfactante	<u>CMC</u> (g/100 ml)*	<u>CMC</u> (mM)*	<u>HLB</u> ⁶
Tween 80 ¹	0,0013	-	15,0
digitonina ²	0,001-0,004	-	0,4
Triton N-101 ³	0,085	-	13,4
Triton X-100 ³	0,015-0,02	0,24	13,5
Nonidet P-40 ²	-	0,29	13,5
dodecilsulfato de sódio	0,15- 0,23**	0,52- 8,2**	40,0
desoxicolato de sódio	0,20	4-6	16,0
CHAPS & CHAPSO ⁴	0,49-0,50	8	-
colato de sódio ²	0,57	15	18,0
octil-beta-D- -glucopiranosídeo ⁴	0,736	25	-
octil-beta-D- -tioglucopiranosídeo ⁴	0,28	9	-
Zwittergent 3-10 ⁴	1,2	-	-
Zwittergent 3-08 ⁴	grande ⁵	-	-
Zwittergent 3-06 ⁴	grande ⁵	-	-

¹ disponível na ICI Americas, Inc., Wilmington, DE.

² disponível na Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

³ disponível na Rohm and Haas Company, Inc., Philadelphia, PA.

⁴ disponível na Calbiochem, La Jolla, CA.

⁵ maior do que 1,2.

⁶ HLB significa Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo. Os números de HLB constituem um sistema para seleção de agentes emulsionantes para um determinado uso. Os emulsionantes lipofílicos (não polares) têm números de HLB abaixo de 9, enquanto que os emulsionantes hidrofílicos (polares) têm números HLB acima de

QUADRO 1 (Continuação)

11. *CMC = concentração crítica de micelas, expressa em gramas por 100 mililitros (g/100 ml) e milimolaridade (mM). **Valores de CMC relativos a NaCl 0,5 molar e a água respectivamente. He lenius et al., Biochim. Biophys. Acta, 415 : 29-79 (1975).

As soluções de SDS são citadas como capazes de remover LPS de polimixina B fixa a uma matriz sólida, SDS é um desnatu rante de proteína bem conhecido e por essa razão não é aqui utilizado. Além disso, verificou-se que o SDS se separa mal, por diálise, de uma solução nas condições aqui consideradas úteis, e portanto parece que o valor da cmc do SDS está mais perto do valor 0,015 indicado no Quadro 1 do que do valor 0,23% em peso também indicado naquele quadro nas condições nor malmente aqui usadas.

Os ácidos da bÍlis, colato de sódio e desoxicolato de sódio, poderiam ser aqui úteis com base nos seus valores de cmc mas, como no caso de outros surfactantes que revelam, em solução, carga eléctrica global, não são aqui utilizados. Os ácidos da bÍlis, ainda que sejam geralmente classificados como brandos e não desnaturantes, têm sido citados como provocando desnatura ção. Além disso, devido às suas cargas aniónicas aos valores de pH do uso normal, os ácidos aniónicos da bÍlis (bem como os detergentes catiónicos) podem ligar-se à macromolécula o que é desfavorável. Ainda mais, como anteriormente se fez notar, Isse kutz e Firca et al. descrevem o uso de 1 a 3% de desoxicolato, respectivamente, para retirar dos adsorventes de afinidade a en dotoxina ligada, havendo portanto mais uma razão para evitar o uso destes surfactantes.

Os surfactantes úteis no presente invento estão também livres de carga eléctrica global, ao valor do pH da diálise, isto é, pH 6-9. De preferência o surfactante é também não iónico.

São também aqui úteis os surfactantes octil-beta-D-glucopiranósido, octil-beta-D-tioglu copiranósido, MEGA-8, -9 e -10 (o octanoil-, nonoil- e decanoil-N-metilglucamidas, respectivamente; podem obter-se na Calbiochem), CHAPS (3- γ -(3-colamidopro

-23-

pil)-dimetilamónio-1-propano-sulfonato), CHAPSO (3-(3-cola
 midopropil)dimetilamónio-2-hidroxi-1-propano-sulfonato) e
 ZWITTERGENT 3-10, 3-08, 3-06, (N-decil- e N-octil- e N-hexil-
 -N,N-dimetil-3-amónio-1-propano-sulfonatos, respectivamente).
 Estes surfactantes têm concentrações críticas de micelas supe-
 riores a cerca de 0,2% em peso ou, pelo menos, cerca de 5 mM
 de acordo com a informação citada. Os surfactantes MEGA são ci-
 tados na literatura dos distribuidores como sendo facilmente
 removidos por diálise e não desnaturantes. No primeiro relató-
 rio sobre os surfactantes MEGA [Hildreth, Biochem. J., 207 :
 363-366 (1982)] o autor diz que os valores cmc não puderam ser
 medidos mas que os resultados obtidos indicavam valores de cmc
 semelhantes aos do octil-glicopiranosido.

Qualquer dos surfactantes mencionados não mostra carga
 eléctrica global aos valores de pH aqui considerados. Contudo,
 como já se fez notar, os surfactantes não iónicos, como o octil-
 -glicopiranosido, são preferíveis aos surfactantes zwitteriôni-
 cos.

Um surfactante de maior preferência é o octil-beta-D-
 -glicopiranosido (também referido como octil-glicopiranosido ou
 OBDG) (Calbiochem, La Jolla, CA). O surfactante tem uma cmc de
 0,736% em peso [25 mM]. O octil-glicopiranosido é usado a uma
 concentração acima de cerca de 25 mM e, de preferência, a uma
 concentração desde cerca de 50 até cerca de 150 mM. Com cerca
 de 48 horas de diálise, em saco de diálise contra tampão isento
 de surfactante, pode reduzir-se uma solução de OBDG de uma con-
 centração de 100 mM até menos do que cerca de 0,05% em peso
 (cerca de 1,7 mM).

A diálise, a ultrafiltração (também chamada osmose inver-
 sa) e a diafiltração são processos de separação que realizam
 funções semelhantes. A diálise é um processo de concentração
 química conduzido por osmose, por difusão selectiva de molécu-
 las relativamente pequenas através de uma membrana semi-permeá-
 vel até igualar a concentração das pequenas moléculas em cada
 lado da membrana. A ultrafiltração é um processo de membrana

-24-

conduzido por pressão hidrostática no qual as moléculas são retidas ou passadas através da membrana com base no seu tamanho de modo semelhante, nos outros aspectos, ao da diálise. A diafiltração é também conduzida por pressão hidrostática, mas o líquido entra na câmara de diafiltração numa quantidade substancialmente equivalente à que passa através da membrana. O líquido diafiltrado resultante contém portanto aproximadamente a mesma concentração de macromoléculas antes e depois de se realizar a diafiltração.

Ainda que a diálise, a ultrafiltração e a diafiltração sejam processos diferentes, cada processo opera usando uma membrana semi-permeável que exclui ou passa moléculas com base no tamanho molecular e cada um deles produz um resultado semelhante nas condições deste invento. Qualquer desses processos pode ser usado para remover monómeros de surfactantes úteis, de soluções contendo macromoléculas.

A palavra "diálise" é aqui usada para referir a diálise no seu sentido restrito, como anteriormente se definiu, e também a ultrafiltração e a diafiltração.

As membranas para diálise podem obter-se na Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles CA, e os seus distribuidores como a Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, sob a marca SPECTRA/POR e são normalmente fornecidas em formato de tubos que se podem transformar em sacos fechando ambos os extremos. Estas membranas são feitas de celulose regenerada e podem ser submetidas a vários tratamentos, antes de serem usadas, para ajustamento do tamanho do poro e, portanto, do peso molecular das moléculas retidas (ou excluídas) do soluto. Ver Craig, Capítulo 8, "Dialysis and Ultrafiltration", em Methods in Immunology and Immunochemistry, ed. Williams and Chase, Vol. II, Academic Press, New York (1968), pág. 119-133.

As membranas porosas de diálise preparadas a partir de vários materiais e adequadas para este fim podem também encontrar-se em diversos fornecedores do comércio, tal como são descritas na patente e na literatura científica. Por exemplo, a polissulfona porosa pode obter-se na Amicon Corp, Lexington,

-25-

MA, enquanto que as fibras celulósicas se podem obter na Cole-Parmer. A patente americana Nº. 3.441.142 descreve uma membrana porosa feita de um material celulósico, do qual uma parte dos grupos hidroxilo é convertida em grupos oxi de metal alcalino que reagem depois com uma halo-alquil-dialquilamina e são depois quaternizados. O sal quaternário reage então com um sal de metal alcalino de um composto anti-trombogénico como a heparina, não sendo este último passo aqui necessário. Outras membranas porosas úteis para diálise que são preparadas a partir de polímeros de enxerto de poli(etilenoimina) e de nylon 6-6 ou acetato de celulose, estão descritas na patente americana Nº. 3.857.782, enquanto que a patente americana Nº. 3.457.256 descreve membranas celulósicas com grupos carboxilo que reagem com aminas ou com ácidos carboxílicos na presença de uma carbodiimida solúvel em água.

Podem também obter-se na Amicon Corp. membranas planas úteis para diálise. Estes filtros são normalmente utilizados em células agitadas de ultrafiltração ou de diafiltração e podem obter-se numa larga gama de pesos moleculares de exclusão, em solução. Estes filtros podem também ser usados numa grande variedade de meios aquosos e numa larga zona de pressões de diálise.

Todo o material apresenta um mínimo de solubilidade em água. Por consequência os termos "insolúvel em água" aqui usados pretendem significar que, quando se prepara a primeira mistura sólida-líquida, a matriz e o adsorvente desse material são recuperados substancialmente intactos e substancialmente na mesma quantidade que foi misturada com o meio aquoso. A matriz e o adsorvente normalmente aumentam de volume na água e podem formar uma fase sólida tipo gel, mantendo-se porém dentro do âmbito da definição de material insolúvel na água aqui considerada.

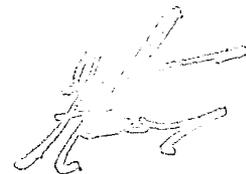
Como se fez notar têm sido considerados úteis vários agentes adsorventes de endotoxinas quando ligados a uma matriz de fase sólida insolúvel em água para formar um adsorvente de endotoxinas. Algumas matrizes insolúveis em água e agentes adsorventes de endotoxinas considerados úteis serão aqui discu

tidos mais tarde.

Por exemplo, Gendrich et al. na patente americana Nº. 4.491.660 descrevem adsorventes de fórmula geral A-X-B-Y-Z onde A é um polímero insolúvel em água; X é um primeiro grupo de ligação; B é um grupo espaçador; Y é um segundo grupo de ligação; e Z é um grupo arilo substituído ou não substituído. A, X, B, Y e Z podem ser, cada um, um entre vários grupos específicos. De modo análogo, Chibata et al, na patente americana Nº. 4.381.239 descreveram adsorventes de endotoxinas compreendendo um polímero insolúvel em água ligado a um composto heterocíclico contendo azoto, substituído. O uso de resinas, insolúveis em água, permutadoras de aniões, como adsorventes de endotoxinas está descrito por Grabner na patente americana Nº. 3.897.309. Cada um dos adsorventes de endotoxinas acima descritos e cujas descrições são aqui incluídas para referência, encontra-se sob a forma de partículas e é usado como tal para ser posto em contacto com uma solução aquosa contendo endotoxinas. Estes adsorventes em partículas são aqui considerados úteis.

Um adsorvente de endotoxinas particularmente preferido contém polimixina B (PMB ou PB) ligada a uma matriz de polímero insolúvel em água. Como anteriormente se descreveu, a PMB é um antibiótico lipofílico que complexa com endotoxinas livres, em solução. Na The Merck Index, 10ª ed., 1093 (1983) encontra-se uma breve descrição dos antibióticos de polimixina, incluindo a polimixina B e o sulfato de polimixina B. The United States Pharmacopeia, 20ª ed, 638 (1980) também descreve a polimixina B. Quando fixa a uma matriz de fase sólida insolúvel em água, a PMB forma um eficiente adsorvente de afinidade para endotoxinas, de fase sólida insolúvel em água.

Uma matriz de fase sólida, em partículas, preferida é a agarose reticulada. Uma agarose reticulada especialmente preferida é a Sepharose 4 B activada pelo brometo de cianogénio (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) que se liga facilmente à PMB para formar um adsorvente de fase sólida. Como exemplo, um volume de 5 ml de polimixina B-Sepharose 4 B (PB-



-27-

-Seph 4 B) é capaz de adsorver cerca de 12 mg de endotoxina, o que é bastante mais do que a quantidade de endotoxina presente em todas as soluções de macromoléculas excepto nas mais altamente contaminadas. Além disso o adsorvente pode voltar a ser lavado com, por exemplo, detergentes fortes como seja uma solução de SDS a 1% ou de desoxicolato de sódio a 1-3%, para restaurar a capacidade de ligação à endotoxina. O adsorvente pode portanto ser reusado.

A Sepharose 4 B é aqui utilizada como exemplo de matriz de fase sólida. Contudo, são também úteis outras matrizes de fase sólida em partículas ou monolíticas. São exemplo destas matrizes a Sepharose 6 B, pérolas de vidro, ou superfícies interiores e exteriores de fibras porosas úteis na hemodiálise ou ultrafiltração (discutidas adiante), e as várias matrizes descritas nas patentes americanas Nº. 4.491.660, Nº. 4.381.239 e Nº. 3.897.309 atrás referidas, bem como os polímeros amino-reactivos descritos nas patentes americanas Nº. 3.597.220, Nº. 3.597.221, Nº. 3.597.351, Nº. 3.650.900 e Nº. 3.650.901, aqui citadas para referência.

Normalmente é adequada toda a matriz de fase sólida insolúvel em água que reaja com um grupo amino ou um grupo carboxilo. Além das matrizes aqui especificamente mencionadas, várias matrizes adequadas, em partículas ou em pérolas, estão indicadas no catálogo de 1984 da Sigma Chemical Company nas pág. 98 a 113.

Os métodos de fixação da PMB à matriz são também bem conhecidos pelos peritos na arte e não precisam ser aqui tratados em maior detalhe. A título de exemplo, cita-se que estes métodos incluem o uso de grupos carboxilo activados como os obtidos por tratamento pelo brometo de cianogénio de produtos sólidos contendo glucose, e reacções químicas que utilizam a tecnologia da carbodiimida solúvel em água, a ligação pelo glutaraldeído e outros semelhantes.

Além disto, a patente americana Nº. 4.357.311, de Schutt, descreve um processo para preparar um substrato microporoso activado ao qual se pode ligar, de modo covalente, um anticorpo

através da tricloro-triazina, obtendo-se um substrato activado. Este método pode também ser usado para ligar a PMB ou outro agente adsorvente de endotoxinas, em vez do anticorpo, ao substrato microporoso. Vários métodos para imobilização de enzimas, aplicáveis para a fixação de um agente adsorvente de endotoxinas a um suporte, estão discutidos na Enzyme Technology, publicado pela Noyes Data Corporation (1983) nas páginas 38-59.

Várias técnicas já publicadas são úteis para ligar o agente adsorvente de endotoxinas a uma matriz monolítica, como é o caso da segunda variante, atrás descrita, dos arranjos do invento, onde o adsorvente de endotoxinas é monolítico.

Por exemplo, Sampson et al, Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs, XVII : 54-59 (1972), cita a ligação L-asparaginase a superfícies de placas de poli(metilmetacrilato) (PMM). A reacção realiza-se em três fases: (1) a superfície áspera de PMM é aminada por reacção com uma solução aquosa de gama-aminopropil trietoxi-silano; (2) os grupos amino são depois activados por reacção com glutaraldeído aquoso; e (3) segue-se a reacção com 0,1 mg de asparaginase/ml de tampão fosfato 0,15 M, pH 6,7. A substituição da L-asparaginase por uma quantidade equimolar de um agente adsorvente de endotoxinas, como a PMB, permite obter um adsorvente útil para por ele passar o meio aquoso contendo as macromoléculas. Um dispositivo semelhante está também descrito por Tapia et al, Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, XXIII, 443-337 (1977).

Podem também ser preparados adsorventes úteis de endotoxinas a partir de um agente adsorvente de endotoxinas e de nylon tubular por um processo análogo ao descrito por Allison et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 47 : 66-73 (1972) ou partir de dacron como foi descrito por Cooney et al., Biochem. Pharm. 24 : 503-515 (1975), em que a L-asparaginase é substituída pelo agente adsorvente de endotoxinas.

A polimixina B, ou outro agente adsorvente de endotoxinas, pode também ser ligada a um dialisador de fibras porosas por métodos já conhecidos. Por exemplo, Jackson et al., J.

-29-

Pharmacol. Exp. Ther. 209 : 271-274 (1979) ligou um enzima à superfície exterior de uma membrana de diálise, de fibra porosa de celulose reconstituída. O agente adsorvente de endotoxinas é aqui ligado à superfície interior das fibras porosas do seguinte modo: após lavagem das fibras celulósicas, faz-se passar uma solução 0,15 N de NaOH através das fibras para adicionar grupos hidroxilo. Após lavagem e ajustamento do pH com tampão de bicarbonato e de carbonato, fez-se passar uma solução de CNBr através das fibras para as activar e lavam-se depois as fibras até ficarem livres de CNBr. Passa-se depois uma solução aquosa contendo um agente adsorvente de endotoxinas, contendo amina, tal como a PMB, através das fibras activadas e deixa-se reagir com a fibra activada pelo CNBr. Após eliminação, por lavagem, do agente adsorvente de endotoxinas que não reagiu, quaisquer grupos de imidocarbonato que não tivessem reagido podem agora reagir com lisina, glucina, dietanolamina ou semelhantes. Após lavagem final, as fibras porosas estão prontas a serem usadas.

Os métodos de preparação de membranas de diálise revelados nas patentes americanas N.º. 3.457.256, N.º. 3.799.356 e N.º. 3.857.782, cujas descrições são aqui incorporadas para referência, são também úteis. Para a patente americana N.º. 3.799.356 o agente quaternizante contém de preferência um ácido carboxílico como o ácido 3-cloropropiónico, e a fase de quaternização é seguida de uma fase em que o adsorvente de endotoxinas, contendo amina, é ligado à matriz do polímero. Normalmente, a ligação realiza-se depois de se formar a fibra e é facilmente conseguida pelo uso de uma carbodiimida solúvel em água. As membranas da patente americana N.º. 3.857.782 podem tornar-se úteis neste processo fazendo reagir primeiro o agente adsorvente de endotoxinas com tricloro-triazina e fazendo depois reagir aquele aducto com as fibras da membrana, contendo amina, da patente, seguindo o processo do Exemplo 2 da patente americana N.º. 4.357.311. A mistura aquosa constituída pelo líquido contendo macromoléculas contaminadas com endotoxinas é de preferência mantida continuamente em contacto com o adsorvente de fase sólida que fornece uma área superficial suficientemente grande para a ligação à

endotoxina. O contacto é praticamente contínuo quer o adsorvente seja monolítico quer esteja em partículas. As endotoxinas libertadas são então adsorvidas pelo adsorvente por afinidade.

O contacto contínuo é obtido, no caso do adsorvente monolítico, por passagem da mistura líquida aquosa sobre a superfície do adsorvente. O contacto contínuo de um adsorvente em partículas pode ser obtido numa coluna, por passagem de uma primeira mistura aquosa através da coluna com o adsorvente como fase sólida. O adsorvente em partículas pode também ser agitado num recipiente, como um copo ("beaker") de laboratório que contenha a mistura líquida. Normalmente este recipiente é mantido fechado para evitar contaminação e evaporação.

O contacto contínuo pode também ser obtido agitando um suporte de fase sólida, em partículas, no meio aquoso de modo a conseguir-se uma suspensão do adsorvente de fase sólida na fase líquida, por exemplo, colocando um dispositivo de diálise por saco numa plataforma sob agitação, ou usando um dispositivo que faz rodar o aparelho de diálise, ou agitando a mistura de diálise, ou por processos semelhantes. No presente estudo usou-se inicialmente uma plataforma agitada sobre a qual se colocou um recipiente que continha o saco de diálise e a solução de diálise. Para diminuir a possibilidade de ruptura mecânica do saco e de trauma na proteína, o aparelho foi mudado para um dispositivo de rotação (de revoltar) no qual a mistura de fase sólida-líquida contida no saco de diálise foi agitada por rotação lenta do saco e da solução externa, dentro de um recipiente alongado, fechado, cuja rotação provoca a agitação dentro do saco de diálise. Assim, usou-se a gravidade para ajudar a assegurar que o adsorvente permanecia em suspensão de modo a que o contacto fosse contínuo.

Prefere-se manter o contacto e dialisar a mistura surfactante-macromolécula com o adsorvente de fase sólida, num meio aquoso com uma concentração iónica inferior a cerca de 2 molar (M), com maior preferência de cerca de 0,01 a cerca de 1,0 M. É claro que o fluido de diálise deve ter a mesma concentração iónica para que se mantenha a concentração em sal através do período de contacto e de diálise.

-31-

O processo deste invento para reduzir a concentração de endotoxinas em soluções contendo macromoléculas é um sistema eficiente, fácil e reprodutível, para descontaminar macromoléculas, como as proteínas em solução.

Como adiante se refere, o uso acima discutido de polimixina B ligada à Sepharose 4B, sem um surfactante, não consegue reduzir adequadamente, durante a diálise, a concentração de endotoxinas de soluções de proteínas contaminadas com LPS. Este resultado, que utilizou técnicas semelhantes às descritas por outros e acima discutidas, e os resultados da diálise, sugerem que a ligação da endotoxina à proteína pode limitar a capacidade do sistema de adsorventes sózinhos, ou mesmo quando ligados por diálises simultâneas, de eliminar eficientemente as toxinas de tais soluções. Nenhum dos métodos anteriormente descritos para descontaminar soluções de proteínas encara o problema da inacessibilidade das endotoxinas ligadas a macromoléculas na remoção por métodos cromatográficos de adsorventes por afinidade, qualquer que seja o adsorvente de fase sólida usado.

Em termos de eficiência, a vantagem do processo deste invento, em comparação com os processos anteriormente publicados, é evidente. Além de provocar um decréscimo de cerca de uma a dez mil vezes, na reactividade do ensaio de Limulus de uma preparação de catalase bovina, o uso do processo eliminou respostas pirogénicas, em coelhos, às proteínas tratadas.

Além disto, os animais a quem foi dada catalase, após a sua descontaminação pelo processo do invento, ficaram protegidos da reacção geral de Schwartzman produzida com catalase não tratada, contaminada com endotoxinas.

A actividade da catalase não foi significativamente afectada pelo processo de redução de endotoxinas. Outras macromoléculas examinadas retiveram, de modo semelhante, a sua actividade e resistiram ao tratamento do surfactante juntamente com uma diálise prolongada e agitação.

Ao contrário dos processos cromatográficos por afinida-

de que não quebram o complexo macromolécula-endotoxina, este processo pode realizar-se repetidas vezes com uma redução contínua da concentração de endotoxinas. Uma característica constante do processo foi a perda de alguma proteína devida à ligação não específica ao adsorvente de fase sólida, ainda que esta perda tenha diminuído com o uso de um elevado teor de sal (de cerca de 0,3 até cerca de 0,8 molar, e especialmente 0,5 molar) durante a diálise. Além disso, com a ajuda de um micro-dialisador, foi possível extrair endotoxinas de volumes tão pequenos como 200 microlitros (μ l) e quantidades da ordem dos 500 microgramas (μ g). Ainda que se perdesse alguma proteína durante a descontaminação, antes do tratamento nenhuma porção de proteína estava em condições de ser usada para introdução no sangue ou numa cavidade do corpo de um animal, enquanto que, após descontaminação pelo processo do invento, as macromoléculas purificadas estavam normalmente utilizáveis.

Ainda que não se pretenda estar preso a uma só hipótese, crê-se que os reagentes e manipulações do presente processo contribuem para a obtenção dos resultados observados pelo mecanismo seguinte: o surfactante separa a endotoxina que está ligada à macromolécula que se deseja purificar e emulsiona, pelo menos em parte, tanto a macromolécula como a endotoxina nas suas micelas. A diálise liberta lentamente a mistura de moléculas do surfactante e liberta portanto as endotoxinas e macromoléculas emulsionadas para o meio aquoso.

A endotoxina, dissolvida no meio, pode recombinar-se com a macromolécula ou complexar com o agente adsorvente de endotoxinas, de fase sólida. Como a endotoxina é no fim encontrada complexada com o adsorvente, pensa-se que a afinidade do agente adsorvente, como a polimixina B pelo LPS, é maior do que a afinidade do LPS pela macromolécula. O contacto contínuo da fase líquida da mistura com o adsorvente sólido ajuda a assegurar que haja uma relativamente elevada concentração ou capacidade do agente adsorvente, fixo à fase sólida, de complexar a endotoxina libertada. Assim, à medida que a diálise prossegue, mais e mais LPS é libertado das micelas do sur-

-33-

factante e cada vez mais LPS se complexa com o adsorvente, descontaminando ou purificando a macromolécula.

Os resultados adiante descritos referem-se a dados obtidos usando como exemplo, arranjos particulares do presente invento. Note-se que os resultados são meramente ilustrativos do invento e, portanto, não o limitam.

B. Avaliação da Redução de Endotoxinas

Os resultados do quadro 2, abaixo, mostram que se conseguiu uma importante redução da reactividade das endotoxinas, medida pelo ensaio de Limulus descrito em pormenor na Secção J (7)a, em todas as soluções de macromoléculas descontaminadas de acordo com o processo deste invento. Os resultados do Quadro 2 mostram as diluições (títulos de Limulus) das fases aquosas contendo macromoléculas, necessárias para se conseguir nenhuma reactividade no ensaio de Limulus. Os resultados do Quadro 2 também mostram uma recuperação inicial relativamente baixa da macromolécula pretendida (uma média de 57%) que foi melhorada (média de 68-72%) pelo uso de cloreto de sódio 0,5 molar (M) num tampão de bicarbonato de sódio 0,1 M a um pH de 8,0 para a amostra e para o dialisado. Estes resultados mostram também que um exemplo do processo deste invento fez baixar a reactividade de LAL das soluções contendo macromoléculas, em 2 ou 3 ordens de grandeza, enquanto se perdiam quantidades relativamente pequenas da macromolécula pretendida, neste caso a catalase ou um anticorpo monoclonal.

QUADRO 2Títulos de Limulus

<u>Solução de</u> <u>Macromoléculas</u> ¹	<u>Antes do</u> <u>Tratamento</u>	<u>Após</u> <u>Tratamento</u>	<u>Perda Média de</u> <u>Proteína (%)</u>
Catalase ² (8) ³	+>1:100.000	+1:50 -1:100	43(25-54) ⁴
Catalase ⁵ (3) ³	+>1:100.000	+1:50 -1:100	24(20-39) ⁴
Catalase ⁶ (8) ³	+>1:100.000	+1:20 -1:50	28(22-43) ⁴
OKT4 Ab ^{6,7} (3) ³	+1:500 -1:100	+1:20 -1:50	32(21-40) ⁴
Extr. bact. ⁸ (1) ³	+>1:100.000	+1:50 -1:100	80

¹As concentrações das soluções de macromoléculas, a origem das macromoléculas e quaisquer manipulações realizadas antes do método de redução, estão descritas na Secção J(1). O sinal "maior do que" (>) indica a presença de endotoxina a diluições maiores do que a indicada. Os sinais "mais" (+) indicam a presença de endotoxinas a uma diluição particular, enquanto que o sinal "menos" (-) indica a ausência de endotoxinas à concentração dada.

²A concentração de endotoxinas foi reduzida por um exemplo do processo do invento, usando PMB ligada à Sepharose 4B e ao surfactante octil-glucopiranosido 100 mM, como se descreveu na Secção J(2).

³O número de ensaios realizados encontra-se entre parêntesis.

⁴A faixa de valores do ensaio está entre parêntesis.

⁵O processo de redução de endotoxinas está indicado na Nota 1 excepto em que a solução de macromoléculas e o dialisado foram

-35-

ajustados até à concentração 0,5 molar (M) de NaCl, para minimizar a perda de proteínas.

⁶O processo de redução de endotoxinas está indicado na Nota 5, excepto em que a solução de macromoléculas foi misturada e mantida com o surfactante (OBDG) durante 6 horas antes de conta-ctar com a PMB-Sepharose 4B, a fim de melhorar a separação da endotoxina e da macromolécula que interessava.

⁷Anticorpo monoclonal OKT4, obtido da Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, N.J., patente americana Nº. 4.381.295 (ATCC CRL 80C2)

⁸Um extracto bacteriano de "pili" da Neisseria gonorrhoea foi tratado pelo processo de redução de endotoxinas como se descreveu na Nota 6, excepto em que se manteve a solução a um valor de pH de 9,5 para evitar precipitação.

C. Determinação da Redução de Endotoxinas

O ensaio de lisado de amebócitos de Limulus (LAL) e o ensaio pirogénico de coelho, U.S.P., são dois métodos vulgarmen-te usados para determinar a presença de endotoxinas numa solu-ção. Ambos os ensaios estão adiante discutidos em pormenor. Uma comparação dos métodos e dos resultados dos processos encontram-se no Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 78 : 138-148 (1971).

O ensaio pirogénico sobre coelhos, descrito em pormenor na Secção J(7)b, foi usado para determinar a eficiência de re-dução de pirogénio, do processo, para uma solução da macromo-lécula catalase em comparação com os processos que omitem sur-factantes, polimixina B ou a ligação do agente adsorvente da endotoxina da polimixina B a uma matriz de Sepharose 4B. Foi usada como controlo uma amostra de solução de catalase purifi-cada usando o método do invento como se descreve em pormenor na Secção J(2). Outras amostras da solução de catalase foram misturadas, postas em contacto e mantidas em contacto com um dos seguintes reagentes durante a diálise: só polimixina B-Se-pharose 4B; só surfactante (octil-glucopiranosido 100 mM); só polimixina B (100 mg); e polimixina B (100 mg) mais surfactan-

te (octil-glucopiranosido 100 mM). Depois deste tratamento, 0,2 miligramas (mg) de cada amostra de catalase foram levados até ao volume de 1 mililitro (ml) com soro salino isento de pirogénios e foram injectados em coelhos como se descreveu em pormenor na Secção J(7)b.

A Figura 1 mostra os resultados expressos em graus centígrados (C) de variação de temperatura (T) por cada período de tempo de 30 minutos para os cinco grupos de tratamento, com o soro salino isento de pirogénios e a catalase não tratada servindo de controlos respectivamente negativo e positivo.

Como se mostra na Figura 1, 1 mililitro (ml) de solução de catalase bovina não tratada (0,2 mg/ml; painel A) foi sempre pirogénica nos coelhos com as subidas iniciais de temperatura ocorrendo nos 30 minutos após injeção, alcançando-se um máximo entre as 3 e as 3,5 horas. O aumento máximo na temperatura basal foi de 1 a 2 graus C (média 1,45°C). O tipo de subida da temperatura e o seu nível máximo foram semelhantes ao apresentado por coelhos injectados com 1 nanograma (ng) de um padrão conhecido de endotoxina (Re595LPS; painel H). Os animais de controlo com soro salino isento de pirogénio (painel G) não mostraram um aumento significativo na temperatura basal ao longo de 6 horas (máximo 0,3°C). Enquanto que os outros tratamentos pareceram influenciar ligeiramente a curva da temperatura, o uso do processo deste invento (painel F) forneceu uma solução de catalase que satisfizes os critérios de um ensaio negativo pirogénico da U.S. Pharmacopeia, isto é, uma su bi da de temperatura, ao longo de 3 horas, de me no s de 0,6°C pa ra três coelhos, com uma soma de subidas de temperatura, para estes três animais, inferior a 1,4°C.

Num outro ensaio para determinar a eficiência biológica da técnica de redução de endotoxinas, determinou-se a capacidade de catalase, tratada e não tratada, estimular a coagulação intravascular da reacção geral de Schwartzman. Observou-se uma leucocitose de 24 horas, característica da administração de endotoxinas, em coelhos que receberam catalase não tratada mas não nos que receberam catalase tratada, como se pode ver

nos dados do Quadro 3.

QUADRO 3

Modificação da Reacção de Schwartzman Induzida por
Catalase Contaminada por Endotoxinas

<u>Estimulação por catala- se</u>	<u>(Desafio) pela Endoto- xina (μg)</u>	<u>Contagens WBC (média) 24 hr/mm^c</u>	<u>Resultados no Rim</u>		
			<u>Macroscopia^a</u>	<u>Histologia^b</u>	<u>Fibrina^c</u>
10 mg não tratada	50 (n=6)	13.500	2/6	2/6	2/6
	250 (n=5)	19.300	3/5	5/5	5/5
10 mg tratada	50 (n=7)	7.000	0/6 ^d	0/6	0/6
	250 (n=5)	9.300	0/4 ^d	0/4	0/4
Soro salino	50 (n=5)	7.500	0/5	0/5	0/5
	250 (n=7)	9.400	0/6 ^d	0/6	0/6

^aEvidência de hemorragia e de necrose cortical bilateral.

^bNecrose difusa ou segmentária com depósitos capilares glomerulares.

^cDepósitos de fibrina capilares glomerulares.

^dUm coelho morreu pouco depois da administração de endotoxina.

*O primeiro algarismo indica o número de animais que revelam essa característica, enquanto que o segundo algarismo representa o número de animais estudados.

Nos coelhos estimulados com catalase não tratada e com 250 microgramas (μ g) de Re595 LPS encontraram-se sinais evidentes de necrose cortical bilateral ou de necrose focal e deposição de fibrina capilar glomerular consistente com coagulação intravascular. Não se encontraram elementos da reacção de Schwartzman em coelhos estimulados com a preparação

-38-

de catalase tratada pelo processo deste invento. A frequência da reacção de Schwartzman foi menor quando se usou um estímulo de 50 µg de endotoxina.

D. Concentração de Octil-glucopiranósido e Actividade da Catalase após Descontaminação

O octil-glucopiranósido residual foi avaliado em soluções de anticorpo monoclonal OKT4 após descontaminação por um processo deste invento e deu em média 0,016% em peso (entre 0,011% e 0,023%). A adição de octil-glucopiranósido, nesta gama de concentrações, a soluções de referência de endotoxina Shigella flexneri (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) com concentrações de 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml e 1 mg/ml de endotoxina, não afectou o resultado do ensaio de Limulus.

A actividade foi avaliada em todas as amostras de catalase, antes e depois do tratamento de purificação. A junção, em média, após descontaminação foi de 89% dos níveis antes da descontaminação (de 75% a 95%).

E. Redução das Endotoxinas em Soluções de Proteínas

Os resultados do Quadro 4, abaixo, mostram que o contacto contínuo da solução de macromoléculas (catalase), contaminadas com endotoxinas, com a PMB-Sepharose 4B, ao longo da diálise durante a operação de contacto-diálise, não é tão eficiente como o uso do processo deste invento que também inclui o surfactante dialisável, durante a operação de contacto-diálise. Neste caso, juntou-se LPS radio-marcado (³H-LPS) a soluções de macromoléculas de proteínas (IgG humana ou catalase) e misturaram-se porções iguais das soluções resultantes, com PMB-Sepharose, com PMB-Sepharose mais OBDG, ou foram deixadas sem adição de reagentes, sendo depois dialisadas sob agitação por um período de tempo de 48 horas. Procedeu-se então a uma estimativa da proteína da fase aquosa e determinou-se o número de contagens numa alíquota da fase aquosa, de modo a que as quantidades relativas de proteína e de LPS presentes na fase aquosa pudessem ser determinadas.

A seguir à redução de endotoxinas de acordo com este invento, tratou-se o adsorvente PMB-Sepharose 4B, em fase sólida, com uma solução a 1% de SDS para remover o LPS ligado. As contagens retiradas da mistura macromoléculas-LPS foram eluídas (97,4%) do adsorvente, demonstrando assim que o resto de LPS estava ligado ao adsorvente. Os resultados de estudos adicionais mostraram que o adsorvente PMB-Sepharose 4B, em fase sólida, que se tinha libertado das endotoxinas ligadas, pelo tratamento SDS, poderia ser re-usado com sucesso em posteriores remoções de endotoxinas.

QUADRO 4

CPM de Preparações Dialisadas de Macromoléculas com ³H-LPS

<u>Proteína</u>	<u>Sem Reagentes</u>		
	<u>Adicionais</u>	PMB-Sepharose	PMB-Sepharose/OBDG
IgG humano	331.357 ¹ (99,4) ²	39.470 ¹ (11,8) ²	260 ¹ (0,0) ²
Conc. prot.	53 ³ (100) ⁴	23 ³ (43,4) ⁴	25 ³ (47,2) ⁴
Catalase	398.300 ¹ (99,7) ²	28.544 ¹ (7,1) ²	1.472 ¹ (0,0) ²
Conc. prot.	1 ³ (100) ⁴	0,625 ³ (62,5) ⁴	0,6 ³ (60,0) ⁴

¹Contagens por quantificação por radiação beta, em contagens por minuto (cpm).

²Percentagem de contagens adicionadas.

³Conc. prot. = concentração da proteína em miligramas por mililitro (mg/ml), determinada pelo ensaio de Lowry.

⁴Proporção proteína recuperada/proteína inicial, expressa em percentagem.

Os resultados do Quadro 4 mostram um decréscimo na concentração de LPS de cerca de 3 ordens de grandeza, entre a proteína de controlo não tratada e a proteína descontaminada de acordo com este invento. Estes resultados também mostram o decréscimo em LPS de cerca de 1 a 2 ordens de grandeza devido à presença de um surfactante dialisável durante a diálise da mistura de fase sólida-líquida em contínuo contacto, não se observando substancial diferença na quantidade de proteína recuperável presente, quer na presença quer na ausência do surfactante dialisável. Assim, os resultados indicam que a presença de surfactante dialisável, durante a diálise, melhora a redução de LPS sem influenciar a recuperação de proteína.

F. Análise, por Gradiente de Densidade do Cloreto de Césio, da Ligação da Endotoxina à Proteína em Solução

Uma vez que os estudos acima resumidos sugerem que há uma quantidade pirogénica de endotoxina que resiste à remoção da solução pela extracção pela polimixina B-Sepharose 4B sem surfactante, a localização da endotoxina, em relação à proteína da catalase presente na solução, foi determinada por análise de gradiente de densidade de CsCl como adiante se descreve em pormenor. Os resultados desse estudo estão indicados na Figura 2.

Como se pode ver no painel C dessa Figura, há um deslocamento significativo do pico da endotoxina (painel B) no gradiente, em direcção à vizinhança do pico da actividade da catalase (painel A). Além disso, ainda que cerca de 75% da endotoxina tenha sido removida por diálise e contacto com a polimixina B-Sepharose (painel D), o resto fica muito estreitamente associado ao pico da catalase. Na amostra descontaminada de acordo com este invento (painel E), contudo, não se registaram contagens de trítio e portanto não estava presente nenhum LPS radio-marcado. As linhas de gradiente de densidade sobrepõem-se nos gráficos confirmando que cada amostra foi submetida ao mesmo gradiente.

Estes resultados confirmam que a endotoxina que não é removida das soluções de proteína pelo tratamento da polimixi-

-41-

na B-Sepharose está ligada à proteína. Essa ligação é responsável pela resistência à remoção da endotoxina e pelo sucesso do uso de um surfactante dialisável para melhorar a eficiência da descontaminação.

G. Redução das Endotoxinas pelo Uso de uma Coluna

Num outro arranjo do invento, a concentração de endotoxinas numa solução de catalase foi reduzida por cromatografia. Neste caso, uma solução aquosa de macromoléculas de catalase contaminadas com LPS foi misturada com OBDG e a mistura aquosa resultante foi posta em contacto com o adsorvente em partículas de polimixina B-Sepharose 4B, anteriormente mencionado, por passagem através de uma coluna contendo o adsorvente como fase sólida. O eluído da coluna (fase líquida separada) foi recolhido e dialisado para remover o surfactante. O teor de endotoxina foi controlado pelo ensaio de Limulus (LAL). A recolha de proteína foi em média de 78%. Os resultados estão indicados no Quadro 5, abaixo.

QUADRO 5

Redução de Endotoxinas Usando OBDG e Cromatografia¹

<u>Tratamento</u>	<u>Reactividade LAL (diluição mais elevada +/-)</u>	
	<u>Antes da Cromat.</u>	<u>Após Cromat.</u>
Catalase + OBDG sobre adsorvente	+1:100.000	-1:100 (n=3)
Catalase sózinha sobre adsorvente	+1:100.000	-1:10.000 (n=3)
Catalase + OBDG não exposta ao adsorvente ³	+1:100.000	-1:1000 (n=1)
	+1:100.000	-1:10.000 (n=1)
	+1:10.000	-1:1000 (n=1)

-42-

- ¹Todas as amostras foram dialisadas contra Tris 50mM (pH 9,5) antes do ensaio, com resultados referidos às diluições discutidas no Quadro 2.
- ²Antes da Crom. = antes da cromatografia; após Crom. = após cromatografia e diálise.
- ³Usaram-se 3 amostras diferentes de catalase.

Como se pode ver nos resultados do Quadro 5, a mistura com OBDG seguida de cromatografia sobre PB-Seph 4B e diálise do eluído para remover o OBDG produziu uma redução da reactividade LAL (1000 vezes) semelhante à alcançada com o método no qual a mistura líquida, contendo macromoléculas contaminadas, foi dialisada na presença do adsorvente em partículas.

A solução cromatográfica usou uma proporção PB-Seph 4B/Catalase mais elevada do que a do método de diálise. Quando se reduziu a proporção, baixando a quantidade de adsorvente colocado na coluna, a quantidade de reactividade LAL removida baixou de um volume de 0,4 ml de adsorvente, isto é, 0,2 ml na coluna do mesmo diâmetro, fez baixar apenas 100 vezes a reactividade LAL. Pensa-se que o decréscimo observado na remoção de endotoxinas se deve a um tempo de contacto, entre o adsorvente e a mistura aquosa, relativamente mais pequeno.

A catalase passada sobre a coluna sem prévia exposição a OBDG apresentou uma redução de 10 vezes da reactividade LAL. A mistura OBDG com catalase mas sem exposição ao adsorvente de fase sólida, seguida de diálise, teve como resultado reduções de 10 a 100 vezes da reactividade LAL, quando se estudaram diferentes lotes de catalase.

H. Efeitos do OBDG sobre Re595 LPS

A mistura de Re595 LPS com OBDG parece reduzir de algum modo a resposta pirogénica in vivo normalmente provocada pelo LPS (fig. 1, painel E). Uma explicação para este facto é que o OBDG altera a estrutura desta preparação de LPS e facilita a ligação do LPS à HDL presente no sangue. Já tinha sido assinalado por Ulevitch e seus colaboradores que os complexos LPS-HDL

têm a sua capacidade de induzir uma resposta pirogênica, nitidamente reduzida [Ulevitch et al., J. Clin. Invest. 62 : 1313-1324 (1978)].

No caso do Re595 LPS, a ligação à HDL no soro é controlada em parte pelo teor de catiões divalentes no soro, e a presença de EDTA aumenta a quantidade de complexos Re595 LPS-HDL formados in vitro. Em estudos separados, verificou-se que se conseguia reduzir o tamanho das partículas de LPS, com detergentes. Ver Shands et al., J. Biol. Chem. 255 : 1221-1226 (1980).

Procurou-se portanto determinar se o pretratamento dos Re595 LPS com OBDG facilitava a ligação do LPS à HDL no soro normal de coelho (NRS). Os resultados deste estudo estão resumidos na Figura 3 onde se mostra que a exposição de Re595 LPS a OBDG altera a estrutura dos Re595 LPS de modo a promover a sua ligação à HDL no soro normal de coelho, na ausência de EDTA adicionado.

I. Descontaminação com Detergentes Adicionais Dialisáveis

Foram estudados outros detergentes diálisáveis que se compararam ao OBDG por um processo deste invento, usando, como macromolécula, 43 mg/ml de catalase e o processo de diálise por revolução (rotacional), aqui discutido como meio de pôr em contacto o adsorvente de fase sólida com a mistura aquosa que continha as macromoléculas. Os resultados desse estudo usando o ensaio LAL estão indicados no Quadro 6, abaixo.

QUADRO 6Redução de Endotoxinas com Vários Surfactantes¹

Surfactante Misturado ²	Diluição do ensaio LAL					
	<u>10⁻²</u>	<u>10⁻³</u>	<u>10⁻⁴</u>	<u>10⁻⁵</u>	<u>10⁻⁶</u>	<u>10⁻⁷</u>
Sem tratamento ³			+	+	+/-	-
1	+	+	-			
2	+	-	-			
3	+	+	+	-		
4	+	+	-			
só adsorvente ⁴			+	+	-	-

¹As amostras foram preparadas contendo o adsorvente e os surfactantes particulares indicados abaixo, e dialisadas pela técnica de revolução discutida na Secção de Materiais e Métodos. Após diálise, as amostras foram avaliadas pelo ensaio LAL usando as diluições indicadas. Um sinal (+) indica que a amostra, a essa diluição, deu resultado positivo quanto à presença de endotoxina, enquanto que o sinal negativo (-) indica que a amostra, a essa diluição, mostrou, no ensaio, estar isenta de endotoxinas.

²Os surfactantes usados foram: 1 = octil-beta-D-glucopiranosídeo a 100 mM; 2 = octil-beta-D-tioglucopiranosídeo a 40 mM; 3 = Zittergent 3-08 [N-octil-N,N-dimetil-3-amino-1-propano-sulfonato] a 2% em peso; e 4 = Zittergent 3-10 [N-decil-N,N-dimetil-3-amino-1-propano-sulfonato] a 2% em peso.

³Solução de catalase ensaiada sem tratamento.

⁴Adsorvente usado sem detergente.

Como se pode ver dos resultados no referido Quadro, obtiveram-se melhorias até cerca de 10000x usando um processo deste

-45-

invento que incluía um dos surfactantes dialisáveis anteriormente referidos. Cada um desses surfactantes foi usado a uma concentração acima da sua concentração crítica de micelas. Cada uma dessas melhorias apresentou também um nível de endotoxinas, após diálise, que foi de pelo menos um décimo do apresentado por uma composição tratada de modo semelhante mas sem surfactante.

J. Materiais e Métodos

1 - Soluções de Macromoléculas

Usou-se uma preparação de catalase de fígado de boi (peso molecular 248.000 daltons), cristalizada duas vezes e suspensa em água contendo um por cento (1%) de timol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). A solução, a uma concentração de 43 mg/ml, foi dialisada durante 48 horas contra soro salino tamponado com fosfato 0,01 M (PBS) a pH 7,4, a 4°C, para remover o timol presente na preparação como agente bacteriostático.

A seguir ao tratamento de redução de endotoxinas pelo processo deste invento e à liofilização, a preparação de catalase purificada foi reconstituída formando uma solução de 1 mg/ml para uso em outros estudos aqui descritos.

O OKT4, um anticorpo monoclonal (IgG2b; peso molecular cerca de 150.000 daltons) contra um determinante de linfócitos, foi fornecido por Ortho Diagnostic Systems, Inc., Raritan, N.J., numa solução salina tamponada de pH 7,4 a uma concentração de 1 mg/ml.

Um extracto de paredes de células de proteínas (pili) da bactéria Neisseria gonorrhoeae foi fornecido por Dr. Magdalene So da Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA. O extracto foi suspenso num tampão Tris 0,05 M, de pH 9,5, a uma concentração de 0,45 mg/ml.

IgG humano, liofilizado, estéril (da Hyland, S.A. Travertol Laboratories N.V., Lessines, Bélgica) foi reconstituído, formando uma solução de 50 mg/ml e tratado pelo processo deste invento.

2. Processo de Redução de Endotoxinas

Ligou-se polimixina B a Sepharose 4B para se obter um adsorvente de endotoxinas, em partículas, insolúvel em água, como adiante se descreve na Secção G. Misturou-se o surfactante, octil-glucopiranosido (OBDG) com solução de catalase a uma concentração de 43 mg/ml, a uma concentração final de 100 mM de octil-glucopiranosido, para se obter uma mistura líquida aquosa. Manteve-se (incubou-se) esta solução à temperatura ambiente por um período de tempo de 30 minutos. Misturou-se um volume de adsorvente Sepharose 4B-polimixina B com quatro volumes da mistura catalase-OBDG para se obter uma mistura de fase sólida-líquida.

A mistura de fase sólida-líquida foi imediatamente transferida para um saco de diálise Spectrophor (Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, CA) com uma exclusão de pesos moleculares de 12.000-14.000. O saco foi então colocado num recipiente fechado de 2 litros cheio de PBS como fluido de diálise. A unidade inteira foi submetida a agitação vigorosa para manter a Sepharose em suspensão e em contacto com a mistura aquosa dentro do saco de diálise. O contacto contínuo e a diálise simultânea continuaram por um período de tempo de 48 horas com, pelo menos, quatro mudanças de fluido de diálise até que o surfactante tenha sido substancialmente dialisado da primeira mistura de fase sólida-líquida, obtendo-se uma segunda mistura de fase sólida-líquida que estava praticamente isenta de surfactante.

No fim do período de diálise, abriu-se o saco e transferiu-se a segunda mistura de fase sólida-líquida para um tubo de plástico, de centrífuga, estéril, usando uma pipeta estéril. A solução foi então centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos para sedimentar o adsorvente de fase sólida e separar portanto as fases líquida e sólida. A fase líquida (sobrenadante) foi transferida para um outro tubo e avaliada quanto ao seu teor proteico e reactividade Limulus, como se descreveu nas Secções J(4) e J(7)a, respectivamente.

O sobrenadante foi ainda avaliado quanto à actividade do enzima catalase que foi comparada com a actividade da amostra

-47-

não tratada com a mesma concentração proteica. Realizou-se também um ensaio de octil-glucopiranosídeo.

Depois de se retirarem alíquotas para o ensaio, a solução foi dialisada por mais 48 horas a 4°C contra água destilada para remover o sal. O composto resultante, virtualmente isento de sal, foi então liofilizado em material de vidro previamente tratado com um reagente destinado a remover endotoxinas de superfícies de vidro (E-Toxa-Clean; Sigma) e foi guardado a 4°C até ser usado. Quando se re-dissolveu a catalase, tratada, executou-se um novo ensaio de Limulus na solução resultante.

Deve ser frisado e entendido pelos peritos na arte que todo o material de vidro e reagentes usados num processo de descontaminação de endotoxinas devem eles próprios estar isentos de endotoxinas, devem ser estéreis, e as manipulações devem ser executadas em condições próprias para evitar a recontaminação de endotoxinas de bactérias.

3. Modificações ao Processo de Redução de Endotoxinas

Várias modificações ao processo referido podem influenciar o rendimento em proteína e reduzir a pirogeneidade da amostra da catalase.

O teor de sal da solução de proteínas e do dialisado foi aumentado para baixar a perda de proteínas por adsorção não específica sobre o adsorvente contendo Sepharose. Misturou-se cloreto de sódio à solução de proteínas para se obter uma concentração final de 0,5 M. Juntou-se também bicarbonato de sódio até uma concentração final de 0,1 M para tamponar a solução a um valor de pH de 8,0. O dialisado foi ajustado de modo a manter estas concentrações através do período de diálise.

O surfactante foi mantido (incubado) com a amostra por um período de tempo alargado, antes da mistura com o adsorvente, para maximizar a dissociação da endotoxina e da proteína, verificou-se que um período de tempo de incubação de 6 horas, antes do contacto e diálise, aumentava a eficiência da redução de endotoxinas por um factor de 2, em comparação com soluções

-48-

que tinham contactado o adsorvente 30 minutos após a adição de octil-glucopiranosido.

Devido ao pequeno volume das amostras usadas nos estudos de catalase bovina-LPS com trítio, descritos nas Secções 4 e 5 (adiante), introduziu-se uma nova modificação no processo. Em vez de um saco de diálise usou-se um microdialisador (BRL, Gaitherberg, MD) que empregou um sistema de fluxo de dialisado de uma só passagem. O aparelho inteiro foi colocado num recipiente fixo a um banho de água, agitado, e foi vigorosamente agitado por um período de tempo de 48 horas durante o qual se realizou a diálise. Logo que a diálise se completou, tomaram-se alíquotas de 20 microlitros (μ l) para determinação do ^3H -LPS por quantificação por radiação beta e para determinação do teor em proteína pelo processo de Lowry.

O processo de agitação vigorosa foi também substituído por um dispositivo rotativo mais suave que utilizou a força da gravidade para manter as partículas do adsorvente em suspensão durante o período de tratamento em que os estudos eram realizados usando maiores volumes de amostras. Ainda que não haja indicação que esta modificação tenha tido qualquer efeito na redução de endotoxinas, ela submeteu a proteína a um trauma menor no decurso do tratamento e pode ter aumentado a actividade da amostra tratada.

4. Redução de Endotoxinas Adicionadas, de Proteínas em Solução

Preparou-se bio-sinteticamente lipopoli-sacárido marcado com trítio (^3H -LPS) a partir de S. minnesota (Re595) (Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA) por incorporação de ^3H -acetato no meio de cultura de Salmonella minnesota Re595, sendo depois isolado e caracterizado o LPS, de acordo com o descrito por Tobias et al., J. Immunol., 128 : 1420-1427 (1982).

Misturaram-se 50 microlitros de solução de ^3H -LPS, contendo 225 microgramas (μ g) de ^3H -LPS e 1×10^6 cpm de ^3H , com 4 ml de solução IgG humana (50 mg/ml). A mistura resultante foi mantida (incubada) num suporte de tubos rotativos durante 6 ho

-49-

ras à temperatura ambiente. Dividiu-se a mistura em três partes alíquotas de igual volume.

Misturou-se uma alíquota de 20 μ l da solução de ^3H -LPS, contendo 90 μ g de ^3H -LPS e 4×10^5 cpm de ^3H , com cada uma de três alíquotas de 300 μ l de uma preparação de catalase, reconstituída a 1 mg/ml, que tinha sido previamente descontaminada por um dos processos do invento. Manteve-se cada alíquota num suporte de tubos rotativo, por um período de tempo de 6 horas, à temperatura ambiente, como acima se referiu.

Alíquotas de um terço de cada uma das misturas de IgG e de catalase ^3H -LPS, foram misturadas em separado com (1) polimixina B ligada a Sepharose 4B e octil-glucopiranosídeo, (2) apenas polimixina B-Sepharose 4B, ou (3) nenhum reagente adicionado. Cada mistura de alíquotas assim preparada foi então dialisada durante 48 horas, sob agitação.

No fim da diálise, estimou-se a proteína pelo processo de Lowry, J. Biol. Chem. 193 : 265-275 (1951). Uma alíquota de 200 μ l de cada amostra foi contada, durante um minuto, num contador beta, após a adição de 3 ml de "cocktail" de cintilação líquida. Os resultados estão indicados no Quadro 4 anterior.

O sedimento do adsorvente de fase sólida da preparação da amostra purificada de acordo com este invento, foi suspenso em tampão de bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,0, que continha cloreto de sódio 0,5 M, para se obter uma mistura de fase sólida-líquida que se manteve (que se incubou) à temperatura ambiente durante a noite num suporte de tubos rotativo. No dia seguinte, centrifugou-se a mistura a 1500 rpm durante 10 minutos para separar as fases líquida e sólida. A fase líquida foi avaliada quanto ao seu teor de proteína e quanto à radiação beta.

A fase sólida, contendo adsorvente, foi então misturada com uma solução de SDS a 1% para se obter uma segunda mistura de fase sólida-líquida que se manteve (incubou) à temperatura ambiente durante a noite. Seguiu-se a separação das fases líquida e sólida por centrifugação, sendo a fase líquida de novo avaliada quanto às contagens beta. Por eluição das contagens do adsorvente por tratamento com SDS, demonstrou-se que o res-

to do LPS se tinha ligado à matriz de polimixina B-Sepharose.

5. Análise de Densidade, pelo Cloreto de Césio, da Ligação das Endotoxinas às Proteínas em Solução

Executou-se a análise de gradiente de densidade para avaliar a ligação das endotoxinas introduzidas numa solução de proteínas e para demonstrar que o uso de polimixina B-Sepharose 4B e octil-glucopiranosido diferiu do uso do adsorvente de apenas polimixina B-Sepharose 4B, na sua capacidade de reduzir as endotoxinas das proteínas durante a diálise com agitação. A proteína estudada foi a catalase bovina previamente tratada para reduzir a contaminação por endotoxinas, pelo processo deste invento.

Resumidamente, misturaram-se 20 μ l de ^3H -LPS com alíquotas de 300 μ l de uma solução a 10 mg/ml de catalase. As misturas resultantes foram mantidas (incubadas) por um período de tempo de 6 horas à temperatura ambiente. As amostras foram depois misturadas quer com (1) polimixina B-Sepharose 4B mais octil-glucopiranosido, quer com (2) apenas polimixina B-Sepharose 4B, quer ainda (3) sem reagente adicionado, seguindo-se a diálise das misturas resultantes, como acima se descreveu.

Dissolveu-se cloreto de césio de grau analítico (Chemetal GmbH, Frankfurt am Main, FRG) em tampão Tris 0,1M, pH 8,0, até uma concentração final de 42 g/100 ml. Juntaram-se uma alíquota de 5 ml de solução de CsCl e uma alíquota de 320 μ l de uma amostra a cada um de seis tubos de ultracentrífuga de Beckman. Os tubos foram centrifugados a 40.000 rpm durante 72 horas num rotor SW50.1 numa ultracentrífuga de Modelo L, Beckman, a 4°C. Recolheram-se 18 fracções de cada tubo de centrífuga usando um tubo capilar, inserido centralmente, ligado a um collector de fracções Gilson FC-100. Usando um refractómetro (Carl Zeiss) determinou-se o índice de refração de uma alíquota de cada uma das fracções. Calculou-se também a correspondente densidade para cada alíquota. Determinaram-se as posições da catalase e do LPS em cada função gradiente, por um ensaio in vitro de actividade da catalase, como se descreveu na Secção 9 e por quantificação da radiação beta, respectivamente.

6. Ligação da Polimixina B à Matriz da Sepharose

O adsorvente de fase sólida, aqui utilizado como exemplo continha Sepharose 4B como matriz que se ligou à polimixina B. Consegue-se a ligação da matriz à polimixina B por activação da matriz pelo brometo de cianogénio, seguida da adição de polimixina B às ligações activadas assim formadas. O processo seguido foi semelhante ao de Issekutz, J. Immunol. Methods 61 : 275-281 (1983) para a preparação de uma coluna, de 5 ml, de purificação por afinidade.

Resumidamente, 1,6 gramas de Sepharose 4B activada pelo brometo de cianogénio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) foram solubilizados (inchados-"swollen") e lavados, e depois misturados com 50 miligramas de sulfato de polimixina B (Sigma) de acordo com as instruções do fornecedor (Sigma).

Os locais que não reagiram activados pelo brometo de cianogénio, foram bloqueados usando uma solução aquosa a 0,2 M de glicina.

Depois da ligação e do bloqueamento, a polimixina B-Sepharose 4B foi lavada à temperatura ambiente usando três misturas alternadas com acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0, e com borato de sódio 0,1 M, pH 8,0. A matriz do adsorvente polimixina B-Sepharose 4B foi sempre usada no próprio dia da sua preparação.

7. Avaliação da Contaminação por Endotoxinas

a. Ensaio Limulus (LAL-"Limulus amoebocyte lysate")-

Usou-se E-Toxate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em todos os ensaios de acordo com o protocolo do Sigma Technical Bulletin, Nº 210. Resumidamente, misturaram-se 100 microlitros (μ l) de uma amostra com 100 μ l de E-Toxate, em pó, reconstituído. Usou-se uma solução de referência, de endotoxina (Shigella flexneri; Sigma) como controlo positivo e água isenta de pirogénios ou soro salino isento de pirogénios (Travenol Laboratories, Inc., Deerfield, IL) como controlo negativo. Estas misturas foram mantidas, sem qualquer perturbação, em banho de água a uma temperatura de 37°C durante 1 hora.

-52-

Conseguia-se um resultado positivo (presença de endotoxinas) quando se formava um gel firme que podia ser completamente invertido sem perda de integridade. Os geles que não retinham a sua integridade quando invertidos eram considerados resultados negativos, isto é, as endotoxinas estavam ausentes. A sensibilidade deste ensaio foi consistentemente entre 0,1 e 0,5 nanogramas por mililitro (ng/ml) de endotoxina. Foram executadas diluições em série para todas as amostras ensaiadas.

Os resultados expressam-se como positivos ou negativos, às várias diluições. Por exemplo, nalguns casos, a diluição 1:50 foi a mais alta diluição estudada que deu um resultado positivo no ensaio Limulus, enquanto que a diluição de 1:100 foi a diluição mais baixa à qual o gel perdia a sua integridade e fornecia um resultado negativo. Tais resultados estão indicados no Quadro 2 como +1:50 e -1:100. Quando se mostra apenas uma única diluição +1:100.000, é necessária uma maior diluição para fornecer um resultado negativo, de isenção de endotoxinas.

b. Ensaio Pirogénico em Coelhos

Imobilizaram-se sobre pranchas coelhos brancos, machos, da Nova Zelândia, pesando entre 2 e 3 quilogramas (Kg) e inseriram-se termómetros nos seus rectos (6 polegadas). A temperatura medida para cada animal foi lida por meio de um transdutor portátil ligado aos termómetros. Os coelhos foram deixados quietos durante duas horas enquanto a temperatura interior do corpo baixava e estabilizava entre os 38 e os 38,5°C. Juntaram-se 100 microlitros de soluções da amostra a 0,9 ml de soro salino isento de pirogénios, e injectou-se um volume final de 1 ml na veia marginal da orelha de cada coelho. As temperaturas foram depois controladas em cada 30 minutos, ao longo de 5 h. Como controlo positivo usou-se 1 micrograma de uma endotoxina conhecida (Salmonella minnesota, Re595; Scrips Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA) dissolvido num ml de soro salino isento de pirogénios, e, como controlo negativo, 1 ml de soro salino isento de pirogénios.

8. Avaliação de Octil-glucopiranósido

O método de ensaio de Spiro, "Analysis of Sugars Found in Glycoproteins", em Methods in Enzymology, ed^a Colowick and Kaplan, VIII, 3, Academic Press Inc. (1966) foi adaptado ao uso de placas de microtitulação. Este ensaio baseia-se na quantificação de açúcares neutros (hexoses).

Neste ensaio, os açúcares neutros são convertidos em de rivados do furfural. Assim, depois da ci são das glicoproteínas por tratamento com ácido sulfúrico concentrado e fervura, os derivados de furfural assim obtidos reagem com antrona e o pro duto da reacção é analisado colorimetricamente. Prepararam-se padrões de octil-glucopiranósido às concentrações de 0,01%, 0,05% e 0,1% (p/v). Usou-se água destilada como controlo nega tivo.

Para preparar uma solução de antrona, misturaram-se 720 ml de ácido sulfúrico concentrado com 280 ml de água destilada. A esta mistura juntaram-se 500 miligramas de antrona e 10 g de tioureia e arrefeceu-se a mistura resultante até à temperatura de 4°C para se obter a solução de antrona utilizada.

Misturaram-se alíquotas de 100 microlitros de cada amo tra com 500 μ l de solução de antrona em tubos de pirex. Cada mistura destas foi aquecida num aquecedor de tubo seco ("dry tube heater") a 100°C durante 15 minutos. Arrefeceram-se as misturas até 37°C e, após 20 minutos, pipetaram-se três alíquo tas de 50 μ l de cada mistura para um poço de uma placa de mi crotitulação.

Os valores da absorvância foram lidos a 620 nanómetros (nm). Fez-se uma curva com os valores dos padrões. Os valores de absorvância dos padrões foram usados para estabelecer a con centração do surfactante em cada amostra. As proteínas das so luções a serem avaliadas foram também submetidas ao ensaio de octil-glucopiranósido para eliminar falsas leituras baseadas na reactividade das proteínas no sistema do ensaio.



9. Avaliação da Catalase

Usou-se a técnica de Beers et al., J. Biol. Chem., 195: 133-140 (1952) para quantificar a catalase. O ensaio baseia-se na capacidade do enzima cindir uma quantidade conhecida de peróxido de hidrogénio adicionado. Resumidamente, uma alíquota de 10 μ l de uma amostra a ser ensaiada é misturada com 2 ml de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0) para se obter uma primeira mistura. Mistura-se 1 ml de solução de peróxido de hidrogénio no mesmo tampão, com a primeira mistura para se obter uma segunda mistura tal que a concentração final de peróxido de hidrogénio na segunda mistura seja 15 mM.

A cisão do peróxido de hidrogénio foi seguida espectrofotometricamente a 240 nm. As leituras dos valores da absorvância foram tomadas a intervalos de 15 segundos. A velocidade constante do enzima foi calculada a partir da taxa inicial de queda dos valores da absorvância. A comparação das constantes de velocidade calculadas e das concentrações proteicas, antes e depois da purificação, permitem obter um ensaio de estabilidade do enzima neste processo de purificação.

A actividade da catalase foi expressa em unidades Bergmeyer usando a seguinte equação

$$1 \text{ unidade} = \frac{K}{6,93 \times 10^{-3}}$$

$$\text{onde } K = \frac{2,3}{dt} \times \log\left(\frac{E_0}{E_1}\right)$$

e dt é 20 segundos, e E_0 e E_1 , são os valores da absorvância medidos a 240 nm no tempo zero e aos 20 segundos.

10. Valores da Contaminação Inicial por Endotoxinas das Soluções - Exemplo, pelo Ensaio de Limulus

Todos os lotes de E-Toxate mostraram sensibilidade semelhante na detecção de endotoxinas. Todas as soluções foram ensaiadas pelo menos seis vezes. Um gel firme que resistia a uma

inversão completa no tubo foi considerado como reacção positiva, como se descreveu no Sigma Technical Bulletin e, anteriormente, aqui. Os resultados do ensaio de Limulus usando água destilada e ainda quatro macromoléculas de proteína antes da sua descontaminação com LPS, estão indicados no Quadro 7, abaixo, para diluições em que se obtiveram ensaios positivos e negativos.

QUADRO 7

Resultado do Ensaio LAL

<u>Substância Ensaada</u> (Concentração inicial)	<u>Diluições da Amostra</u>	
	<u>Positivo</u>	<u>Negativo</u>
Água isenta de pirogénios ¹	não observado	1:1
Endo. de ref. (0,1 ng/ml) ²	1:1	1:2
Catalase (43 mg/ml) ³	1:100.000	não registado
OKT4 (1 mg/ml) ⁴	1:500	1:1.000
Extr. bact. (0,4 mg/ml) ⁵	1:100.000	1:1.000.000
Água destilada	1:10-1:100	1:1.000

¹Disponível nos Travenol Laboratories, Inc., Deerfield, Illinois.

²Solução de referência, de endotoxina (Shigella flexneri) da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

³Disponível na Sigma Chemical Company e dialisada como se descreveu na Secção 1 para remoção do timol.

⁴Disponível na Ortho Pharmaceutical Corporation, Raritan, N.J.

⁵Extracto de paredes de células bacterianas (pili) da Neisseria gonorrhoeae em tampão Tris 0,5 M, pH 9,5.



-56-

O que acima se mencionou destina-se a ilustrar o presen
te invento mas não a limitá-lo. Podem realizar-se numerosas va
riações e modificações sem afastamento do espírito e âmbito dos
novos conceitos do invento. Entenda-se que não se pretende nem
deve inferir qualquer limitação em relação às composições espe-
cíficas e usos aqui descritos.

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para reduzir endotoxinas bacterianas contaminantes duma composição aquosa contendo uma macromolécula biologicamente útil, caracterizado por compreender os passos seguintes:

(a) misturar uma macromolécula biologicamente útil, contaminada por endotoxinas, com um surfactante dialisável, em meio aquoso, para formar uma mistura aquosa, na qual o referido surfactante não exhibe carga eléctrica efectiva ao valor do pH da referida mistura aquosa, e esteja presente, na referida mistura, numa concentração superior à concentração crítica das micelas do surfactante;

(b) pôr em contacto a referida mistura aquosa com um sorvente de endotoxinas de fase sólida, insolúvel em água, que compreende uma matriz de fase sólida ligada a um agente sorvente de endotoxinas, para formar uma mistura de fase sólida-líquida;

(c) manter o referido contacto durante um período de tempo suficiente para que as referidas endotoxinas se liguem ao referido sorvente e formem uma segunda mistura de fase sólida-líquida cuja fase líquida contém água, a referida macromolécula e uma reduzida proporção em peso de endotoxinas para macromoléculas, quando comparada com a proporção em peso presente na referida mistura aquosa;

(d) separar as fases sólida e líquida da referida segunda mistura de fase sólida-líquida;

(e) dialisar o referido surfactante da referida fase líquida, numa altura não anterior ao passo (c), para se obter uma fase líquida que contenha as referidas macromoléculas e esteja substancialmente isenta de surfactante; e

(f) recuperar em seguida a fase líquida que está substancialmente isenta de surfactante.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido passo de diálise ser realizado após o pas

so (d).

3 - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o contacto, a manutenção e a separação dos passos (b), (c) e (d) se realizarem numa coluna.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido passo de diálise ser realizado durante o referido passo de manutenção (c).

5 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido agente sorvente de endotoxinas ser a polimixina B.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida matriz insolúvel em água se apresentar em partículas.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido surfactante ter uma concentração crítica de micelas de, pelo menos, cerca de 0,2 por cento em peso ou de, pelo menos, cerca de 5 milimolar.

8 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido surfactante ser escolhido entre os do grupo constituído por 3-[3-colamidopropil)-dimetilamónio]-1-propano-sulfonato, 3-[3-colamidopropil)-dimetilamónio]-2-hidroxi-1-propano-sulfonato, N-octil-N,N-dimetil-3-amónio-1-propano-sulfonato, N-decil-N,N-dimetil-3-amónio-1-propano-sulfonato, octil-beta-D-glucopiranósido, octil-beta-D-tioglucopiranósido, octanoíl-N-metilglucamida, nonoíl-N-metilglucamida e decanoíl-N-metilglucamida.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido surfactante ser não-iónico.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o referido surfactante ser escolhido entre os do grupo constituído por octil-beta-D-glucopiranósido, octil-beta-D-tioglucopiranósido, octanoíl-N-metilglucamida, monoíl-N-metilglucamida e decanoíl-N-metilglucamida.

11 - Processo para reduzir endotoxinas bacterianas con-

taminantes de uma composição aquosa contendo uma macromolécula biologicamente útil, caracterizada por compreender os passos seguintes:

(a) misturar uma macromolécula biologicamente útil, contaminada por endotoxinas, com um surfactante, num meio aquoso, para formar uma mistura aquosa, na qual o referido surfactante não exhibe carga eléctrica efectiva ao valor do pH da referida mistura e está presente na referida mistura numa concentração superior à concentração crítica das micelas do referido surfactante.

(b) pôr em contacto a referida mistura aquosa com um sorvente de endotoxinas, de fase sólida, insolúvel em água, compreendendo uma matriz de fase sólida ligada a um agente sorvente de endotoxinas, para formar uma mistura de fase sólida-líquida;

(c) manter o referido contacto por um período de tempo suficiente para que as referidas endotoxinas se liguem ao referido sorvente e formem uma segunda mistura de fase sólida-líquida cuja fase líquida contém água, o referido surfactante, a referida macromolécula e uma reduzida proporção em peso de endotoxinas/macromoléculas quando comparada com a proporção em peso presente na referida mistura aquosa;

(d) separar as fases sólida e líquida da segunda mistura de fase sólida-líquida;

(e) dialisar o surfactante da referida fase líquida separada, para obter uma fase líquida substancialmente isenta de surfactante; e

(f) recuperar a referida fase líquida substancialmente isenta de surfactante.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por o referido sorvente de fase sólida, se apresentar em partículas.

13 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o referido contacto ser substancialmente contínuo e ser mantido por agitação do referido sorvente em partículas.

14 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o referido surfactante ter uma concentração crítica de micelas de pelo menos cerca de 0,2 por cento em peso, ou de pelo menos cerca de 5 milimolar.

15 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o referido surfactante ser não-iônico.

16 - Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o referido surfactante ser escolhido entre os do grupo constituído por octil-beta-D-glucopiranosido, octil-beta-D-tioglucopiranosido, octanoíl-N-metilglucamida, nonoíl-N-metilglucamida e decanoíl-N-metilglucamida.

17 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por a referida macromolécula estar presente na referida mistura aquosa numa concentração de cerca de 200 microgramas por mililitro a cerca de 100 miligramas por mililitro.

18 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o referido meio aquoso ter uma força iónica inferior a cerca de 2 molar.

19 - Processo para reduzir endotoxinas bacterianas contaminantes, de uma composição aquosa contendo uma macromolécula biologicamente útil, caracterizado por compreender os passos seguintes:

(a) misturar uma macromolécula biologicamente útil, contaminada por endotoxinas, com um surfactante, num meio aquoso, para formar uma mistura aquosa, na qual o referido surfactante não exhibe carga eléctrica efectiva ao valor do pH da referida mistura e está presente, na referida mistura, numa concentração superior à concentração crítica das micelas do referido surfactante;

(b) pôr em contacto a referida mistura aquosa com um sorvente de endotoxinas, de fase sólida, insolúvel em água, compreendendo uma matriz de fase sólida ligada a um agente sorvente de endotoxinas, para formar uma mistura de fase sólida-líquida.

(c) manter o referido contacto enquanto se dialisa a referida mistura de fase sólida-líquida durante um período de tem

po suficiente para que as referidas endotoxinas se liguem ao referido sorvente e formem uma segunda mistura de fase sólida-líquida cuja fase líquida contém água, a referida macromolécula, uma reduzida proporção em peso de endotoxinas/macromolécula quando comparada com a proporção em peso presente na referida mistura aquosa, e está substancialmente isenta do referido surfactante;

(d) separar as fases sólida e líquida da referida segunda mistura de fase sólida-líquida; e

(e) recuperar a referida fase líquida separada.

20 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o referido sorvente de fase sólida se apresentar em partículas.

21 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o referido contacto ser substancialmente contínuo e ser mantido por agitação do referido sorvente em partículas.

22 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o referido surfactante ter uma concentração crítica de micelas de pelo menos cerca de 0,2 por cento em peso ou de pelo menos cerca de 5 milimolar.

23 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o referido surfactante ser não iónico.

24 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o referido surfactante ser escolhido entre os do grupo constituído por octil-beta-D-glucopiranosídeo, octil-beta-D-tioglucopiranosídeo, octanoíl-N-metilglucamida, nonoíl-N-metilglucamida e decanoíl-N-metilglucamida.

25 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a referida macromolécula estar presente na referida mistura aquosa, numa concentração de cerca de 200 microgramas por mililitro a cerca de 100 miligramas por mililitro.

26 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por o referido meio aquoso ter uma força iónica inferior a cerca de 2 molar.

-62-

27 - Processo de acordo com a reivindicação 19, caracte_rizado por o referido sorvente ser monolítico, por compreender uma membrana de diálise com o referido agente sorvente de endo_toxinas ligado à superfície em contacto com a referida fase lí_ quida, e por o referido contacto ser obtido fazendo passar a fase líquida através da superfície que contém o agente sorven- te.

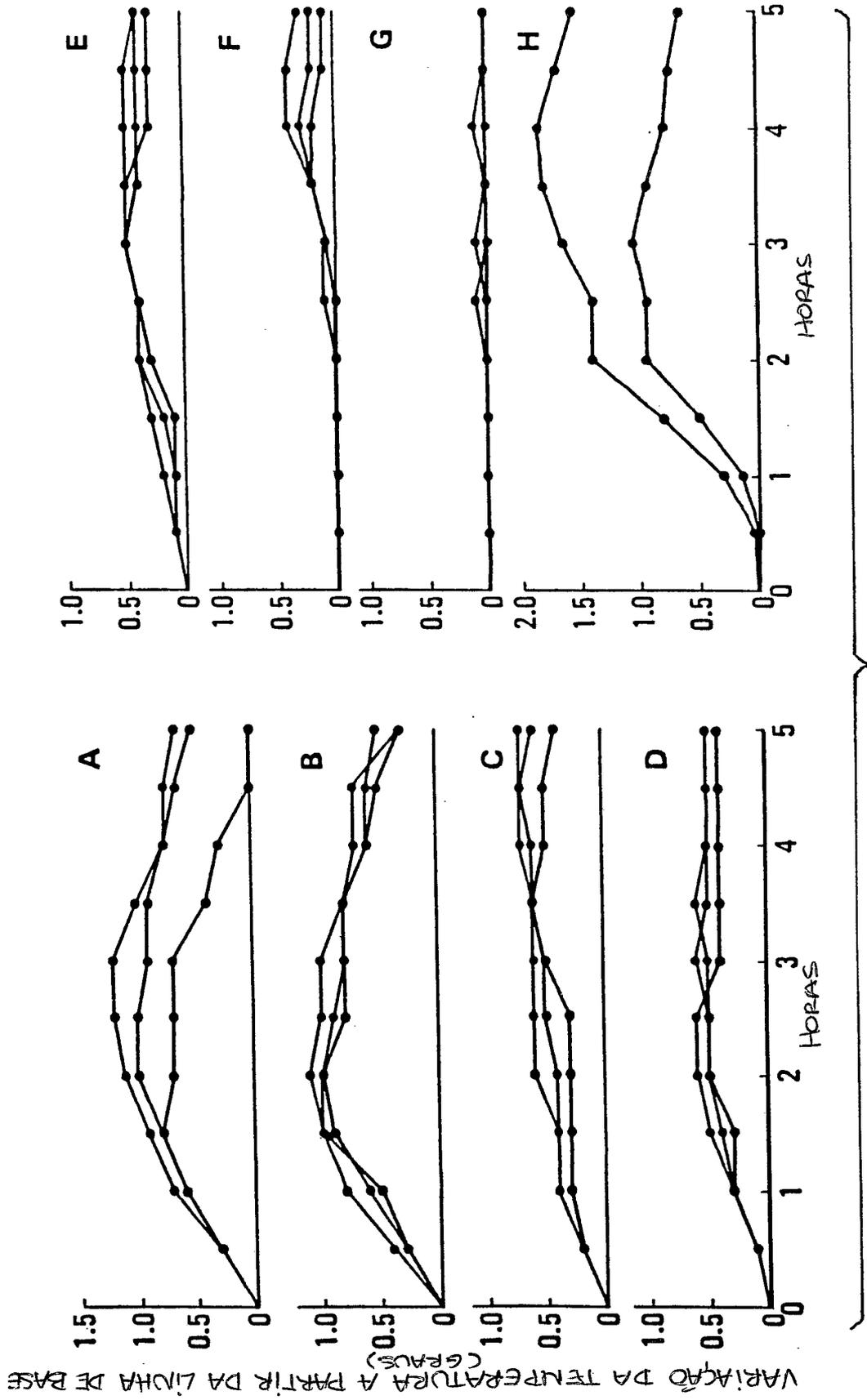
Lisboa,

13 SET 1988

Por SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION

- O AGENTE OFICIAL -





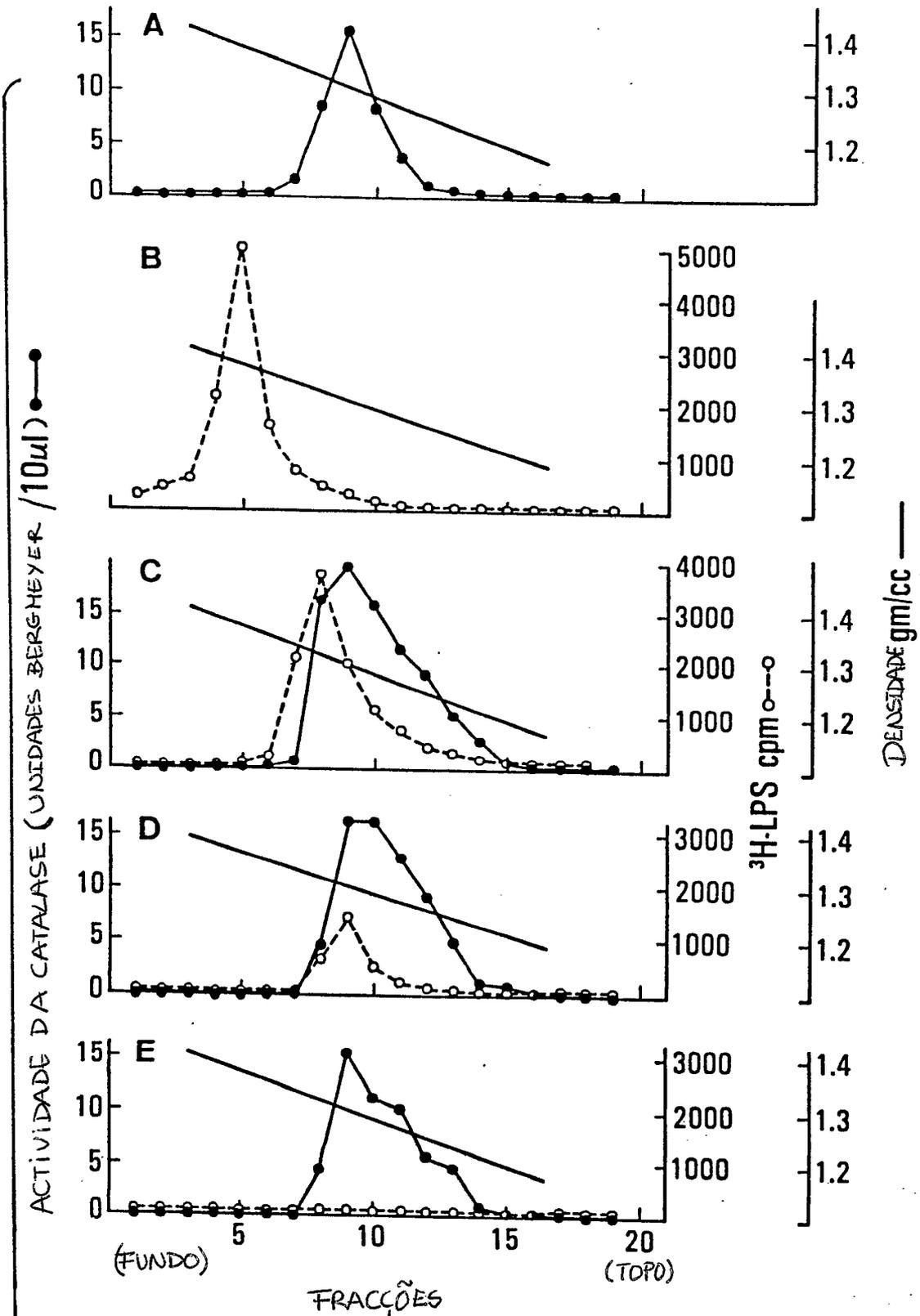


FIG. 2

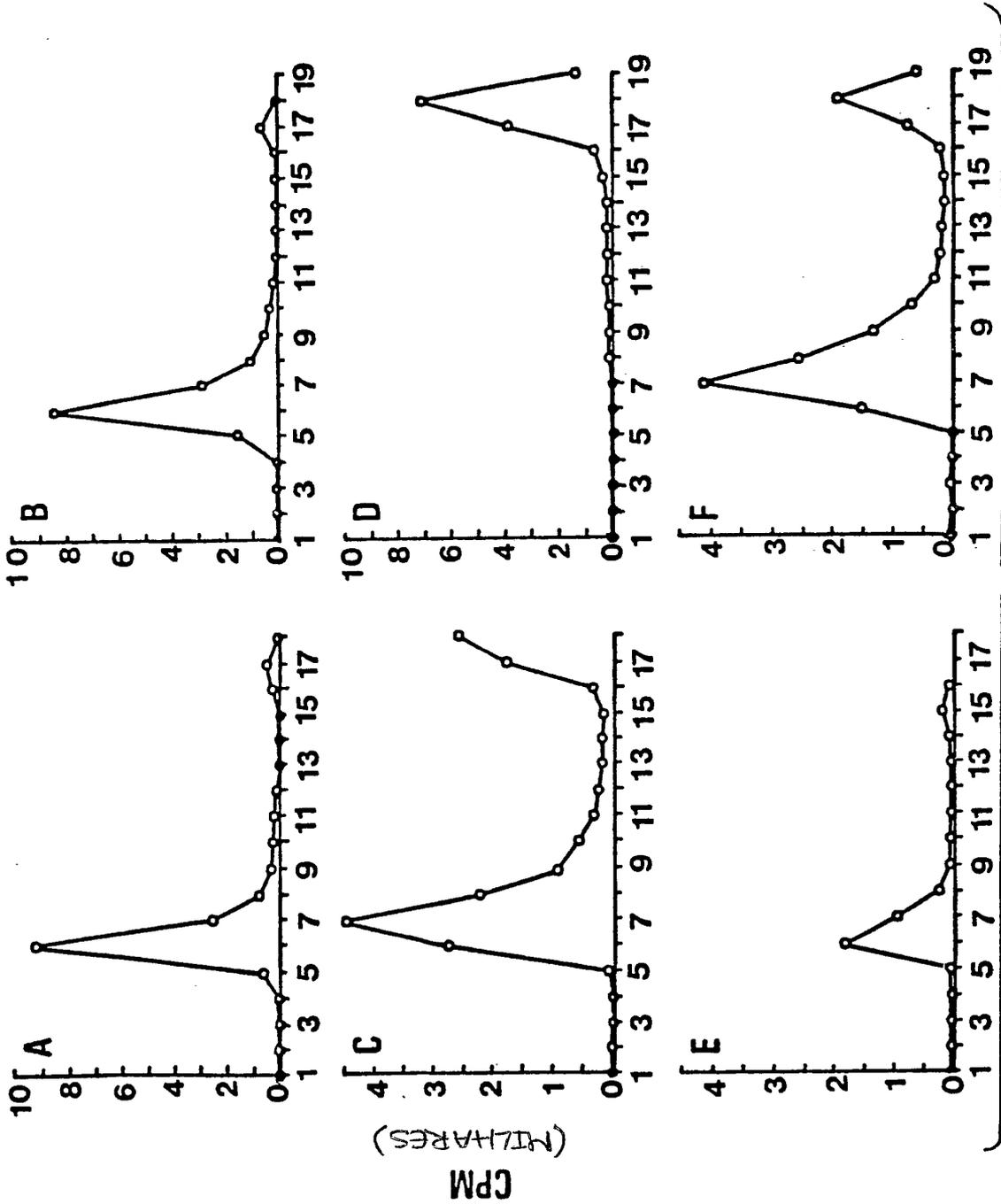
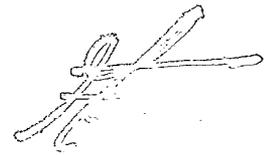


FIG. 3