



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0618713-7 B1

(22) Data do Depósito: 17/11/2006

(45) Data de Concessão: 02/01/2018



* B R P I 0 6 1 8 7 1 3 B 1 *

(54) Título: CARDIOLIPINA MODIFICADA E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: G01N 33/571; G01N 33/92

(30) Prioridade Unionista: 18/11/2005 US 60/737,901

(73) Titular(es): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATE OF AMERICA REPRESENTADO POR THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

(72) Inventor(es): ARNOLD R. CASTRO; HUIYING WANG

RELATÓRIO DESCRITIVO

Pedido de Patente de Invenção para “CARDIOLIPINA MODIFICADA E SEUS USOS”

Referência a Pedidos de Patente Relacionados

5 Este pedido de patente reivindica o benefício da prioridade do Pedido de Patente Provisório US 60/737901, depositado em 18 de novembro de 2005, o qual é aqui incorporado em sua totalidade como referência.

Reconhecimento de Suporte Governamental

10 Esta invenção foi feita pelo *National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Division of AIDS, STD, and TB Laboratory Research, Laboratory Reference and Research Branch, Centers for Disease Control and Prevention*, uma agência do governo dos Estados Unidos.

Campo

15 Esta divulgação se refere a composições de cardiolipina modificada e seus usos; em particular, a métodos de imobilização de cardiolipina modificada em um suporte sólido, e a imunoensaios relacionados (tal como o ELISA) e dispositivos de imunoensaios (tais como fitas de teste, dispositivos de passagem de fluxo, ou dispositivos de fluxo lateral), sendo esses ensaios e dispositivos úteis, por exemplo, para a detecção de anticorpos anti-lipídicos e/ou para o
20 diagnóstico de doenças (tais como a sífilis).

Fundamentos

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível (DST) causada pela bactéria espiroqueta *Treponema pallidum*. Mais de 100.000 casos de sífilis em adultos são relatados em todo o mundo a cada ano. Além disso, a doença é
25 transmitida de forma congênita e afeta 3.000 ou mais crianças anualmente. O decurso da infecção da sífilis leva muitos anos e pode levar a uma variedade de quadros clínicos, os quais são caracterizados por quatro estágios.

O estágio primário da infecção de sífilis ocorre 10-100 dias após a infecção bacteriana, e é caracterizado pela aparência de um ou mais cancos
30 (úlceras vermelhas, não-sangrentas e indolores tipicamente com menos de 1 cm de diâmetro). Os cancos podem aparecer na genitália ou em algum outro lugar

do corpo. O cancro dura por 3 a 6 semanas e cura sem tratamento, deixando uma pequena cicatriz. As pessoas infectadas são contagiosas durante esse estágio.

O estágio secundário da infecção de sífilis é caracterizado por lesões semelhantes a erupções na pele que podem cobrir partes ou todo o corpo.

- 5 As lesões na pele são geralmente indolores e aparecem 1 a 6 meses depois do surgimento do(s) cancro(s) inicial(is). As lesões na pele podem ser parecidas com verrugas, pústulas ou úlceras. Se deixadas sem tratamento, elas curam em 2 a 12 semanas sem deixar cicatrizes. Febre, dor de garganta, fraqueza, perda de peso, inchaço dos nódulos linfáticos, e perda das pestanas e/ou de parte das
- 10 sobranceiras podem também ocorrer durante esse estágio da infecção. Além disso, os sintomas podem progredir para a sífilis meningovascular, que é caracterizada pela inflamação da cobertura do cérebro e da espinha dorsal e/ou por mudanças na vasculatura do cérebro. As pessoas infectadas também são contagiosas durante a fase secundária.

- 15 A sífilis terciária ou avançada é o estágio final da infecção sem tratamento. Esse estágio pode ocorrer desde um ano após a infecção ou em qualquer momento posterior, com 10 a 20 anos sendo o mais comum. A sífilis benigna, caracterizada por lesões chamadas granulomas, pode ocorrer nos ossos, na pele e órgãos internos. A morte é rara, mas desordens severas e dores podem
- 20 ocorrer. A sífilis cardiovascular é caracterizada por aneurismas aórticos assim como outros problemas cardiovasculares e frequentemente resulta em morte. O envolvimento neurológico pode ocorrer nos primeiros estágios assim como pode se manifestar como sintomas do estágio avançado. Na doença em estágio avançado, a neurosífilis pode ser assintomática ou o paciente pode ter problemas
- 25 neurológicos graves, tais como possivelmente a demência, insanidade, limitação da mobilidade, cegueira, surdez, ou até mesmo a morte.

- A reação imunológica na sífilis envolve a produção de (i) anticorpos contra a treponema, que são específicos para os antígenos da *T. Pallidum*, e (ii) anticorpos anti-lipídicos, que reconhecem materiais lipídicos
- 30 liberados a partir de células hospedeiras danificadas, material semelhante a lipoproteínas e possivelmente cardiolipina liberada dos treponemas. O principal

da detecção e do diagnóstico da sífilis é o teste sorológico para um ou para ambos esses dois tipos de anticorpos.

Os testes para anticorpos anti-lipídicos (com frequência chamados “de testes não-treponêmicos”) são tipicamente baseados em um antígeno composto de cardiolipina, colesterol e lecitina que ocorrem naturalmente. Os testes não-treponêmicos amplamente utilizados (por ex., o teste VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) e o teste RPR (*Rapid Plasma Reagin*) monitoram, seja microscopicamente (por ex., o teste VDRL), ou macroscopicamente (por ex., o teste RPR), a formação de um produto lanoso compreendido de complexos de anticorpos-antígenos. Os testes não-treponêmicos têm a vantagem de ser amplamente disponíveis, de baixo custo, e convenientes para realizar em um grande número de espécimes. Além disso, como os títulos dos anticorpos anti-lipídicos diminuem com um tratamento bem sucedido para a sífilis, eventualmente desaparecendo na maioria dos pacientes, enquanto que os títulos dos anticorpos treponêmicos permanecem altos por anos ou mesmo por toda a vida, os testes não-treponêmicos são considerados a melhor escolha para monitorar o tratamento ou para testar quando à re-infecção.

Os testes treponêmicos são baseados em antígenos derivados da *T. Pallidum* e incluem a aglutinação de partículas da *T. Pallidum* (TP-AP), o teste fluorescente de anticorpos-absorvidos treponêmicos (FTA-ABS), e imunoensaios de enzimas. Os testes treponêmicos são utilizados principalmente para verificar a reatividade em testes não-treponêmicos. O teste treponêmico pode ser também utilizado para confirmar uma impressão clínica de sífilis em que o teste não-treponêmico seja não-reativo. Os testes treponêmicos são tecnicamente mais difíceis, mais demorados, e caros para realizar, e não podem ser utilizados para monitorar o tratamento porque o teste irá permanecer reativo por anos ou por toda a vida em aproximadamente 85% das pessoas tratadas com sucesso para a sífilis.

Cada um dos testes de anticorpos descritos acima é realizado utilizando-se uma amostra de soro que é obtida em um ambiente clínico e enviada a um laboratório para análise. Portanto, os resultados dos testes tipicamente não estão disponíveis por vários dias após a amostra ter sido

coletada. Por causa da dificuldade freqüente em se detectar pacientes com DSTs, o desenvolvimento de um teste rápido, feito no local do exame, é necessário para auxiliar o médico a fazer um julgamento, preferivelmente no dia do teste.

Dispositivos de imunoensaios (tais como fitas de teste, dispositivos de fluxo, ou dispositivos de fluxo lateral), que oferecem resultados rápidos, obtidos no local, estão disponíveis para testar quantitativamente os níveis de anticorpos treponêmicos no soro (por ex., *DiaSys Corporation; ACON Laboratories, Inc.; Biokit, S.A.; Genix Technology; Standard Diagnostics; Cortez Diagnostics, Inc.; and Phoenix Bio-Tech Corp*). Contudo, testes análogos para anticorpos anti-lipídicos têm sido mais difíceis de desenvolver ao menos em parte porque os antígenos hidrofóbicos dos anticorpos anti-lipídicos (por ex., cardiolipina) resistem à ligação a suportes sólidos, o que é um elemento dos dispositivos de imunoensaio.

Segundo alguns especialistas, a detecção da sífilis seria mais auxiliada por uma combinação de um teste não-treponêmico e um teste treponêmico para propósitos de exame e diagnóstico. Esta é uma abordagem defendida pela Organização Mundial da Saúde, *Treponemal Infections, Technical Report Series 674, Geneva: WHO, 1982*. Um teste para ser utilizado no local de tratamento, rápido e de fácil utilização, capaz de detectar ao mesmo tempo tanto os anticorpos não-treponêmicos como os treponêmicos ajudariam a satisfazer essa persistente necessidade.

Síntese

Os esforços feitos para desenvolver imunoensaios sem soluções para testes não-treponêmicos (ou testes não-treponêmicos e treponêmicos combinados) se frustraram por causa da dificuldade de ligação de antígenos especificamente reconhecidos por anticorpos anti-lipídicos, tais como a cardiolipina, a um substrato sólido, tal como uma faixa de nitrocelulose. O tamanho muito pequeno da molécula de cardiolipina resultou na má localização da molécula sobre o substrato. A natureza não-polar das cadeias laterais de ácidos graxos da cardiolipina também confere um alto grau de hidrofobia à molécula, o que torna difícil ligar a cardiolipina a superfícies polares, tais como a nitrocelulose. Embora o tamanho da molécula pudesse ser aumentado

conjugando-se a cardiolipina com moléculas maiores (tais como as proteínas), tais conjugações resultaram na perda de antigenicidade da cardiolipina.

A presente divulgação oferece uma abordagem para ligar seguramente a cardiolipina (ou antígenos lipídicos que compreendam a cardiolipina modificada como descrito aqui, fosfatidilcolina (também referida como "lecitina"), e colesterol) a um substrato sólido (tal como uma membrana micro-porosa ou uma placa de múltiplos poços), enquanto é mantida a antigenicidade e a especificidade do antígeno para anticorpos anti-lipídicos. Utilizando os métodos descritos aqui, é agora possível criar complexos de moléculas de ligação de cardiolipina, que podem ser ligados a uma variedade de suportes. A habilidade de ligar o complexo de cardiolipina imunogênico desta maneira permite que ele seja utilizado em imunoensaios não baseados em solução, tais como os ELISAs e dispositivos de imunoensaio para um teste rápido, feito no local, de anticorpos não-treponêmicos. Em certas modalidades, os dispositivos de imunoensaio também incorporam antígenos treponêmicos que são reconhecidos pela *T. Pallidum*, de modo que o dispositivo convenientemente detecte ao mesmo tempo anticorpos treponêmicos e não-treponêmicos.

Em um exemplo particular, cadeias laterais de ácidos graxos de cardiolipina são oxidadas para fornecer ao menos um grupo carboxila terminal, que é então reticulado em um polipeptídio (tal como a ASB), o qual é prontamente passível de ligação (ou já está ligado) a um suporte sólido (tal como o substrato permeável de uma fita de fluxo lateral ou de uma placa com múltiplos poços).

Estes e outros recursos e vantagens ficarão mais aparentes a partir da seguinte descrição detalhada de diversas modalidades, a qual procede em referência aos desenhos anexos.

Breve Descrição dos Desenhos

A Fig. 1 mostra imagens digitais de etapas da oxidação de cardiolipina. (A) Cardiolipina não-modificada em t-butanol; (B) mistura reativa de cardiolipina após a adição de m-periodato de sódio e permanganato de potássio; (C) mistura reativa de cardiolipina após a adição de bissulfito de sódio; e (D) solução de duas fases obtidas após centrifugação da mistura (C) onde

diversas formas oxidadas de cardiolipina são encontradas predominantemente na fase de t-butanol superior.

A **Fig. 2** mostra imagens digitais de cromatográficos de camada fina de preparações de cardiolipina. (A) Cardiolipina não-modificada em t-butanol (ver Fig.1A); (B) uma preparação de cardiolipina oxidada; (D1) a fase de t-butanol, superior, em seguida a uma reação de oxidação de cardiolipina (ver Fig. 1D); e (D2) a fase aquosa, inferior, em seguida a uma reação de oxidação de cardiolipina (ver Fig. 1D). A direção de migração de cada amostra é mostrada por uma seta.

A **Fig. 3** mostra uma reação de oxidação esquemática de uma molécula de cardiolipina exemplificativa que contém quatro cadeias de ácidos graxos di-insaturados com 18 carbonos. Os produtos da reação de cardiolipina ilustrados têm uma ou quatro cadeias laterais de ácidos graxos oxidadas. Na prática, os produtos da reação de oxidação também incluiriam espécies de cardiolipina oxidadas em que quaisquer duas ou três dentre as cadeias de ácidos graxos foram oxidadas em grupos carboxila.

A **Fig. 4** mostra uma reação esquemática útil para ligar covalentemente cardiolipina oxidada a moléculas de ligação contendo amina, tais como proteínas. No exemplo ilustrado, a molécula de ligação é a ASB.

A **Fig. 5** mostra uma imagem digital de um ensaio *dot blot* utilizado para determinar a antigenicidade de um conjugado de cardiolipina-ASB ("Preparação 5" na Tabela 2).

A **Fig. 6** mostra uma imagem digital de cinco modalidades físicas diferentes de dispositivos de fluxo lateral que poderiam ser utilizados com os métodos revelados. As modalidades de dispositivo mostradas em (A), (B) e (E) são configuradas de modo que cada um possa ser imerso, ou parcialmente submerso, na amostra ou em uma solução contendo a amostra. As modalidades de dispositivo mostradas em (C) e (D) são configuradas para que recebam um volume da amostra (ou de uma solução contendo a amostra) em gotas em uma porta de introdução de amostras.

A **Fig. 7** é uma vista em perspectiva de uma modalidade física de um dispositivo de fluxo lateral, com uma porção do envoltório quebrada para

mostrar os componentes básicos do dispositivo e suas relações uns com os outros.

A **Fig. 8** mostra uma imagem digital de um cromatográfico de camada fina de uma mistura de cardiolipina-lecitina oxidada. (A) Uma mistura de cardiolipina não-modificada e lecitina não-modificada em t-butanol; (B) uma
5 mistura de cardiolipina/lecitina oxidada; (C) a fase de t-butanol, superior, seguida pela oxidação de uma mistura de cardiolipina-lecitina; e (D) a fase aquosa, inferior, seguida pela oxidação de uma mistura de cardiolipina-lecitina. A direção de migração de cada amostra é indicada por uma seta.

10 A **Fig. 9** mostra as estruturas químicas de quatro moléculas representativas de fosfatidilcolina (lecitina) de ocorrência natural. Para a L- α -fosfatidilcolina (coração, bovino), a fórmula molecular é $C_{42}H_{80}NO_8P$, o peso molecular é de 758,07, o peso molecular (isótopo) é de 757,562157, e o percentual da composição é de 66,55% C; 10,64% H; 1,85% N; 16,88% O;
15 4,09% P. Para a L- α - fosfatidilcolina, plasmalogênio (coração, bovino), a fórmula molecular é $C_{42}H_{80}NO_7P$, o peso molecular é de 742,07, o peso molecular (isótopo) é de 741,567242, e o percentual da composição é de 67,98% C; 10,87% H; 1,89% N; 15,09% O; 4,17% P. Para a L- α - fosfatidilcolina, éter (coração, bovino), a fórmula molecular é $C_{42}H_{82}NO_7P$, o peso molecular é de 744,09, o
20 peso molecular (isótopo) é de 743,582893, e o percentual da composição é de 67,80% C; 11,11% H; 1,88% N; 15,05% O; 4,16% P.

A **Fig. 10** mostra uma imagem digital de um ensaio *dot blot* utilizado para determinar a antigenicidade de seis conjugados de cardiolipina/lecitina-ASB ou de -HFF oxidados. As quantidades dos respectivos
25 antígenos aplicados a ponto no ensaio são dadas na tabela abaixo do ensaio.

Descrição Detalhada

I. Introdução

Como mostrado na Fig. 3, a cardiolipina inclui uma função orgânica de glicerol imunogênica central com cadeias laterais de ácidos graxos.
30 Esta divulgação revela métodos para preparar cardiolipina oxidada que seja capaz de se ligar a um polipeptídeo para fixar-se a um substrato, enquanto é conservada a habilidade da função orgânica de glicerol central de ser imunorreativa com

anticorpos anti-lipídicos. Em modalidades reveladas, a cardiolipina é reagida com um sal de periodato (tal como o m-periodato de sódio) e um sal de permanganato (tal como o permanganato de sódio) para oxidar ao menos uma dentre as cadeias laterais de ácidos graxos da cardiolipina, para fornecer grupos carboxila terminais em uma ou mais dentre as cadeias laterais, e então um agente redutor (tal como um sal de bissulfito) é adicionado para extinguir a oxidação da cardiolipina e para reduzir uma β -cetona formada na função orgânica de glicerol central a um grupo β -hidroxila, de maneira a conservar a imunogenicidade da função orgânica de glicerol central. Em modalidades reveladas, a cardiolipina é reagida com o sal de periodato antes da cardiolipina ser reagida com o sal de permanganato. Em modalidades particulares, a reação de oxidação com a cardiolipina ocorre em um solvente de álcool, sob uma atmosfera de argônio. Exemplos de solventes de álcool adequados são um ou mais dentre t-butanol, etanol, propanol ou metanol. A razão molar de m-periodato de sódio para cardiolipina é de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 5:1, e a razão molar de permanganato de sódio para cardiolipina é de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 1:1. Em alguns exemplos, o sal de bissulfito é o bissulfito de sódio.

Os grupos carboxila da cardiolipina oxidada podem ser ativados para que sejam preparados para ligar covalentemente um portador de polipeptídios a pelo menos um dos grupos carboxila. A ativação dos grupos carboxila é alcançada em exemplos particulares pela reação da cardiolipina oxidada com uma carbodiimida, tal como a 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida (EDC), e uma sucinimida, tal como a N-hidroxisuccinimida (NHS). Um polipeptídio (tal como a albumina de soro bovino (ASB), hemocianina da família *Fissurellidae* (HFF), ou avidina), ou uma biotina, é ligado covalentemente a pelo menos um dos grupos carboxila ativados.

São também revelados aqui métodos para preparar cardiolipina oxidada que seja imuno-reativa com anticorpos anti-lipídicos, e capazes de se ligar a um polipeptídio para ligação a um substrato. Tais métodos incluem a reação da cardiolipina com m-periodato de sódio e permanganato de potássio em um solvente de t-butanol sob uma atmosfera de argônio para oxidar a cardiolipina

e fornecer grupos terminais carboxila em uma ou mais das cadeias laterais. Bissulfeto de sódio em solução aquosa é então adicionado à suspensão de cardiolipina para extinguir a oxidação da cardiolipina e para reduzir uma β -cetona formada na função orgânica glicerol central em um grupo β -hidroxila de modo a reter a imunogenicidade da função orgânica glicerol central. Os grupos carboxila terminal da cardiolipina oxidada são então ativados por reação da cardiolipina oxidada EDC e então com NHS, seguida pela conjugação covalente de um portador de proteínas a pelo menos um dos grupos carboxila.

As cardiolipinas oxidadas conjugadas aos portadores de polipeptídios podem então ser utilizadas, em uma aplicação, para fazer um dispositivo de cromatografia de fluxo lateral ligandp-se o conjugado de cardiolipina-polipeptídio a um substrato de fluxo lateral, tal como uma fita de nitrocelulose. A capacidade de fornecer a cardiolipina conjugada em polipeptídios permite que a cardiolipina seja ligada de forma segura a um substrato sólido. Tais substratos podem incluir também um antígeno treponêmico que reage com anticorpos à *T. pallidum*. A presença tanto de um conjugado de cardiolipina-polipeptídios e de um antígeno treponêmico sobre (ou dentro do) mesmo suporte sólido permite convenientemente um rápido teste clínico para ambos os anticorpos anti-lipídicos e anti-treponêmicos no mesmo espécime biológico.

São também revelados aqui dispositivos de imuno-ensaio (tais como dispositivos de fluxo lateral ou dispositivos de fluxo direto) para determinar a presença e/ou quantidade de um anticorpo antilipídico em uma amostra de fluido. Esses dispositivos tipicamente incluem uma área de aplicação da amostra e uma área de captura de cardiolipina separada em que um conjugado de cardiolipina-polipeptídios imobilizado é fornecido, tendo o conjugado uma afinidade de ligação específica para um anticorpo anti-lipídico de fase móvel. Qualquer líquido (tal como uma amostra biológica de fluido) aplicada na área de aplicação da amostra flui ao longo do caminho de fluxo a partir da área de aplicação da amostra até a área de captura de cardiolipina. O caminho de fluxo pode continuar até uma gaze absorvente a jusante associada ao dispositivo de imuno-ensaio, que atua, ao menos em parte, como um reservatório de líquido. A

formação de um complexo entre o anticorpo anti-lipídico e a cardiolipina oxidada imobilizada pode ser detectada para determinar a presença e/ou quantidade do anticorpo antilipídico em uma amostra de fluido.

Em algumas modalidades de um dispositivo de fluxo lateral, uma
5 gaze conjugada é posta no caminho do fluxo da área de aplicação da amostra até a área de captura de cardiolipina. A gaze conjugada inclui um reagente detector móvel ou mobilizável para um anticorpo anti-lipídico, de modo que o fluxo de líquido através da gaze movimente o reagente detector até a área de captura de cardiolipina. A formação de um complexo que inclui o reagente detector, o
10 anticorpo anti-lipídico (analito), e cardiolipina imobilizada fornece um indicador visível ou detectável de outro modo da presença do anticorpo anti-lipídico em um espécime biológico. Em modalidades alternativas (incluindo dispositivos de fluxo lateral ou de fluxo direto), o reagente detector não é suprido em uma gaze conjugada, mas é ao invés aplicado ao substrato ou à amostra, por exemplo, a
15 partir de uma garrafa de preparação.

Exemplos de reagentes detectores incluem cardiolipina oxidada marcada ou anticorpo anti-humano marcado, em que o marcador seja uma ou mais enzimas, partícula colóide de cor dourada, partícula de látex colorida, partícula de prata adsorvida com proteína, partícula de ferro adsorvida com
20 proteína, partícula de cobre adsorvida com proteína, partícula de selênio adsorvida com proteína, partícula de enxofre adsorvida com proteína, partícula de telúrio adsorvida com proteína, partícula de carbono adsorvida com proteína, ou bolsa de tinta acoplada a proteína.

Certas modalidades de dispositivo de imuno-ensaio (tais como
25 dispositivos de fluxo lateral ou de fluxo direto) também incluem uma área de captura treponêmica no caminho de fluxo a partir da área de aplicação da amostra. Tal área de captura treponêmica inclui, por exemplo, um antígeno treponêmico imobilizado que possui uma afinidade de ligação específica para um anticorpo anti-*T. pallidum* de fase móvel ou um anticorpo anti-*T. pallidum*
30 imobilizado que tenha uma afinidade de ligação específica para um organismo de *T. pallidum* de fase móvel ou para um antígeno da *T. pallidum*. Um dispositivo de fluxo lateral pode também possuir um reagente detector móvel ou mobilizável

para o anticorpo ou antígeno treponêmico na gaze conjugada. Um reagente detector para o anticorpo ou antígeno treponêmico pode estar na mesma gaze ou em uma gaze diferente da do reagente detector para o anticorpo anti-lipídico. Em modalidades particulares, um reagente detector específico para um anticorpo anti-*T. pallidum* compreende a Proteína A marcada (por ex., conjugado dourado), a Proteína G marcada (por ex., conjugado dourado), ou anticorpo anti-humano marcado (por ex., conjugado dourado). Em outras modalidades, o reagente detector para um antígeno treponêmico móvel pode ser um anticorpo de antígeno anti-treponêmico marcado (por ex., conjugado dourado).

Os dispositivos de imuno-ensaio revelados podem ser utilizados em métodos para diagnosticar a sífilis em um sujeito através da análise de uma amostra biológica do sujeito, aplicando-se a amostra biológica ao dispositivo e detectando-se a formação de um complexo entre o anticorpo anti-lipídico, a cardiolipina oxidada, e um reagente detector na área de captura. A detecção da formação do complexo na área de captura detecta um anticorpo anti-lipídico associado à infecção com sífilis. Nestas modalidades em que o dispositivo inclui uma gaze conjugada no caminho de fluxo da área de aplicação da amostra até a área de captura de cardiolipina, o complexo detectado inclui o reagente detector móvel ou mobilizável. Em outras modalidades em que o reagente detector é aplicado ao dispositivo a partir de uma fonte externa, o complexo detectado inclui o detector aplicado externamente.

Em modalidades particularmente vantajosas do método, o dispositivo de fluxo lateral é capaz de detectar tanto os anticorpos anti-lipídicos (que são um indicador de infecção ativa) como os anticorpos treponêmicos (que verificam a reatividade do teste não-treponêmico). Nestas modalidades do dispositivo que incluem o antígeno treponêmico, o método inclui a detecção da formação de um complexo entre o anticorpo anti-*T. pallidum*; o antígeno treponêmico imobilizado, e um reagente detector na área de captura. Assim como com o reagente detector utilizado para a cardiolipina, o reagente detector para o antígeno treponêmico pode ser fornecido no dispositivo ou aplicado a partir de uma fonte externa.

São também revelados aqui *kits* para o diagnóstico da sífilis. Esses *kits* incluem um dispositivo de imuno-ensaio revelado e instruções para a aplicação da amostra biológica à área de aplicação da amostra ou ao dispositivo. O *kit* também pode incluir instruções para interpretar os resultados do teste.

5 Os dispositivos de imuno-ensaio revelados podem ser utilizados também em métodos para diagnosticar o lúpus em um sujeito através da análise de uma amostra biológica do sujeito, aplicando-se a amostra ao dispositivo e detectando-se a formação de um complexo entre o anticorpo antilipídico, a cardiolipina oxidada, e um reagente detector na área de captura. A detecção da
10 formação do complexo na área de captura detecta um anticorpo anti-lipídico associado ao lúpus. Em alguns casos, um ou mais co-fatores (tais como o β_2 -glicoproteína I) estão presentes (tais como sendo adicionados a uma amostra) para a detecção do lúpus.

II. Abreviações e Termos

15	ASB	Albumina de soro bovino
	EDC	1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida
	ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
	HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Pressão
	HFF	Hemocianina da família <i>Fissurellidae</i>
20	DFL	Dispositivo de fluxo lateral
	MES	Ácido N-morfolinoetano sulfônico
	NHS	N-hidroxisulfocinimida
	RMN	Ressonância Magnética Nuclear
	PEG	Polietileno glicol
25	APV	Álcool polivinílico
	PVP	Polivinil pirrolidona
	SDS	Docecil sulfato de sódio
	CCD	Cromatografia em Camada Delgada

30 A não ser quando indicado contrariamente, os termos técnicos são utilizados de acordo com o uso convencional. As definições dos termos comuns da biologia molecular podem ser encontradas em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew e

outros (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-156081-569-8).

- 5 Para facilitar a revisão das várias modalidades da invenção, são fornecidas as seguintes explicações de termos específicos:

Grupos carboxila ativadores: A ativação de um grupo carboxila se refere à reação de um grupo carboxila com um agente (ou agentes), tais como uma carbodiimida (por ex., 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida), para
10 formar um derivado nucleófilo-reativo, tal como um derivado de O-uréia. O derivado nucleófilo-reativo é prontamente reativo com nucleófilos, e podem ser utilizados para formar (i) ligações éter de grupos de álcool, (ii) ligações éter com ácido e alcoóis ou fenóis, (iii) ligações peptídicas com ácido e aminas.

Um nucleófilo auxiliar catalítico, tal como 1-hidroxbenzotriazol, N-
15 hidroxisuccinimida, N-hidroxissulfosuccinimida, e N-hidroxi-5-norbeno-endo-2,3-dicarboxamida, pode ser utilizado para auxiliar a ativação mediada por carbodiimida de grupos carboxila para reduzir possíveis reações colaterais, incluindo a racemização, e para aumentar o ritmo de reação quando se usa ésteres ativos.

20 Por exemplo, um grupo carboxila terminal de uma ou mais cadeias laterais de ácidos graxos de cardiolipina oxidada pode ser ativada por reação com 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida seguida, em alguns casos, por reação com um nucleófilo auxiliar catalítico, tal como N-hidroxissuccinimida.

Analito: Um átomo, molécula, grupo de moléculas ou composto de
25 origem natural ou sintética (por ex., droga, hormônio, enzima, antígeno de fator de crescimento, anticorpo, hapteno, lectina, apoproteína, cofator) buscado para ser detectado ou mensurado, que seja capaz de ligar especificamente às modalidades de cardiolipina descritas aqui. Os analitos podem incluir, mas não se limitam a, drogas, hormônios, antígenos, haptenos, lectinas, apoproteínas ou co-
30 fatores. Em algumas modalidades, o analito inclui anticorpos, tais como os anticorpos anti-lipídicos ou anti-cardiolipina, produzidos em resposta à infecção por *T. pallidum*. Em outras modalidades, o analito inclui anticorpos anti-lipídicos

produzidos em resposta para qualquer um dentre (i) uma doença auto-imune, tal como o lúpus, (ii) vários males trombóticos venosos e arteriais, incluindo o infarto cerebral, (iii) trombose venosa profunda, (iv) trombocitopenia, (v) embolia pulmonar, ou (vi) perda de feto recorrente com infarto placentário.

- 5 **Anticorpo:** Uma proteína consistindo em um ou mais polipeptídios substancialmente codificados por genes de imunoglobulina ou por fragmentos de genes de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes das regiões constantes kappa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon e um, assim como a miríade dos genes de regiões variáveis da imunoglobulina. As
- 10 cadeias leves são classificadas como kappa ou lambda. As cadeias pesadas são classificadas como gama, um, alfa, delta ou épsilon, que por sua vez definem as classes de imunoglobulina IgG, IgM, IgD e IgE, respectivamente.

- A unidade estrutural básica da imunoglobulina (anticorpo) é geralmente um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto por dois pares idênticos de
- 15 cadeias de polipeptídios, cada par possuindo uma cadeia “leve” (aproximadamente 25 KD) e uma “pesada” (aproximadamente 50 a 70 KD). O N-terminal de cada cadeia define uma região variável de aproximadamente 100 a 110 ou mais aminoácidos responsáveis principalmente pelo reconhecimento de antígenos. As expressões “cadeia leve variável” (V_L) e “cadeia pesada variável”
- 20 (V_H) se referem, respectivamente, a estas cadeias leves e pesadas.

- Os anticorpos são produzidos naturalmente em plantas e animais em reação aos antígenos apresentados ao sistema imunológico. Anticorpos produzidos naturalmente podem ser encontrados, por exemplo, no soro de um animal. Por exemplo, uma pessoa infectada com a *T. pallidum* irá produzir
- 25 anticorpos pelo menos contra antígenos e anticorpos (isto é, anticorpos anti-lipídicos) da *T. pallidum*, contra materiais lipídicos que resultem da infecção treponêmica a partir, por exemplo, de células hospedeiras danificadas pela infecção.

- Os anticorpos podem existir como imunoglobulinas intactas ou
- 30 como um número de fragmentos bem caracterizados produzidos pela digestão de várias peptidases ou por métodos de DNA recombinante. Por exemplo, a pepsina digere um anticorpo embaixo das ligações dissulfeto na região de dobradiça

(flexível) para produzir $F(ab)'_2$, um dímero de Fab que por si mesmo é uma cadeia leve ligada a $V_H - C_H 1$ por uma ligação dissulfeto. O $F(ab)'_2$ pode ser reduzido sob condições amenas para romper as ligações dissulfeto na região de dobradiça, desse modo convertendo o dímero $F(ab)'_2$ em um monômero. O monômero Fab' é essencialmente um Fab com parte da região de dobradiça (ver *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y., 1993). Embora certos fragmentos de anticorpos sejam definidos em termos da digestão de um anticorpo intacto, será notado que os fragmentos Fab' ou outros fragmentos de anticorpos podem ser sintetizados *de novo*, quimicamente, ou pela utilização da metodologia de DNA recombinante. Portanto, o termo "anticorpo" conforme utilizado aqui também inclui fragmentos de anticorpos, produzidos pela modificação de anticorpos inteiros, ou sintetizados *de novo* utilizando-se metodologias de DNA recombinante.

Os anticorpos anti-lipídicos para uso em algumas modalidades dos métodos e dispositivos revelados aqui podem ser de qualquer derivação, porém com mais frequência serão encontrados no soro de um sujeito.

Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais. Meramente a título de exemplo, anticorpos monoclonais podem ser preparados a partir de hibridomas murinos de acordo com o método clássico de Kohler e Milstein (*Nature* 256:495-497, 1975) ou métodos derivados deste. Em breves palavras, um camundongo é repetitivamente inoculado com alguns microgramas do composto analito selecionado (ou um fragmento deste) por um período de poucas semanas. Em alguns casos, será benéfico utilizar um adjuvante ou uma molécula portadora para aumentar a imunogenicidade e/ou a estabilidade do analito no sistema animal. O camundongo é então sacrificado, e as células produtoras de anticorpos do baço são isoladas. As células do baço são fundidas por meio de polietileno glicol com células de mieloma de camundongo, e as células não-fundidas em excesso destruídas pelo crescimento do sistema em meios seletivos compreendendo aminopterina (meios HAT). As células fundidas com sucesso são diluídas, e alíquotas da diluição colocadas nos vasos de uma placa de microtitulação na qual o crescimento da cultura é continuado. Os clones produtores de anticorpos são identificados pela detecção de anticorpos no fluido

sobrenadante dos vasos por procedimentos de imuno-ensaios, tal como o ELISA, como originalmente descrito por Engvall (Meth. Enzymol. 70:419-439, 1980), e métodos derivados deste. Clones positivos selecionados podem ser expandidos e seu produto em anticorpos monoclonais colhido para uso. Procedimentos
 5 detalhados para a produção de anticorpos monoclonais são descritos em Harlow e Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, Nova York, 1988).

Antígeno: Um composto, composição, estrutura, determinante, antígeno químico ou bioquímico, ou porção destes, que possam estimular a produção de anticorpos ou uma reação de célula-T em um animal, incluindo
 10 composições que sejam injetadas ou absorvidas dentro de um animal. Um antígeno reage com os produtos da imunidade humoral ou celular específica, incluindo os induzidos por imunogênios heterólogos. O termo "antígeno" inclui todos os epitopos antigênicos relacionados.

Anticorpo Anti-lipídico: Um anticorpo (tal como a IgM ou a IgG)
 15 produzido pelo sistema imunológico de um sujeito (tal como um ser humano) em reação aos antígenos lipídicos presentes em um estado de doença, tal como uma infecção. Por exemplo, este termo prevê os anticorpos anti-lipídicos produzidos em resposta aos materiais lipídicos liberados de células hospedeiras como uma consequência da infecção de *T. pallidum*, e materiais semelhantes a lipoproteínas,
 20 e possivelmente cardiolipina liberada de treponemas. Os anticorpos anti-lipídicos podem também ser produzidos em resposta a doenças não-treponêmicas em que antígenos lipídicos também estejam presentes, incluindo, por exemplo, (i) uma doença auto-imune, tal como o lúpus (Harris e outros, *Clin. Rheum. Dis.*, 11:591-609, 1985), (ii) vários males trombóticos venosos e arteriais, incluindo o infarto cerebral (Harris e outros, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2:47-51, 1984), (iii) trombose venosa profunda (Mueh e outros, *Ann. Intern. Med.* 92:156-159, 1980), (iv) trombocitopenia (Harris e outros, *Clin. Rheum. Dis.*, 11:591-609, 1985), (v) embolia pulmonar (Anderson e Ali, *Ann. Rheum. Dis.*, 43:760-763, 1984), ou (vi) perda de feto recorrente com infarto placentário (Derue e outros, *J. Obstet.*
 25 *Gynaecol.*, 5:207-209, 1985).
 30

A cardiolipina é um conhecido colaborador de ligação específica de anticorpos anti-lipídicos que são formados em reações a estados de doenças, tal

como a infecção por *T. pallidum*. A cardiolipina de ocorrência natural tem sido utilizada tradicionalmente, muitas vezes em combinação com colesterol e lecitina, em testes de floculação para detectar anticorpos anti-lipídicos, por exemplo, no soro de pacientes infectados com *T. pallidum*.

5 **Atmosfera de Argônio:** Uma atmosfera compreendendo substancialmente o gás argônio, que seja criada com os propósitos de realizar uma reação química. Uma atmosfera de argônio pode ser criada em qualquer recipiente fechado útil para realizar reações químicas passando-se gás argônio pelo recipiente de reação para deslocar a atmosfera que então existia dentro do
10 recipiente, e depois mantendo-se um fluxo de argônio suficiente para manter uma atmosfera dentro do recipiente de reação compreendendo substancialmente gás argônio. Uma atmosfera compreende substancialmente gás argônio quando a atmosfera é de ao menos aproximadamente 25% de argônio, ao menos aproximadamente 30% de argônio, ao menos aproximadamente 40% de argônio,
15 ao menos aproximadamente 50% de argônio, ao menos aproximadamente 60% de argônio, ao menos aproximadamente 70% de argônio, ao menos aproximadamente 75% de argônio, ao menos aproximadamente 80% de argônio, ao menos aproximadamente 85% de argônio, ao menos aproximadamente 90% de argônio, ao menos aproximadamente 92% de argônio, ao menos
20 aproximadamente 95% de argônio, ao menos aproximadamente 98% de argônio, ou ao menos aproximadamente 99% de argônio.

Molécula ou proteína de ligação: Qualquer polipeptídeo ou outra molécula (por ex., átomo, molécula, grupo de moléculas, proteína, polímero, ou composto de origem natural (ou sintética) que possa ser diretamente ou
25 indiretamente ligado à cardiolipina como descrito aqui, para facilitar a ligação da cardiolipina a um suporte sólido. Em algumas modalidades, a ligação da molécula de ligação-cardiolipina é formada através de grupos carboxila em cardiolipina oxidada, e/ou opcionalmente utiliza um grupo de ligação.

 Moléculas de ligação adequadas incluem, mas não se limitam a,
30 polipeptídios, proteínas, ou peptídeos, tais como a albumina, hemocianina, tiroglobulina e derivados destes, particularmente a albumina de soro bovino (ASB), proteína sintética MAPS, IgY, streptavidina, avidina e Hemocianina da

família *Fissurellidae* (HFF). Outras substâncias derivadas de polipeptídios ou não derivadas de proteínas são conhecidas pelos técnicos no assunto. Uma molécula de ligação tipicamente possui um peso molecular de ao menos 50.000 daltons, preferivelmente maior do que 60.000 daltons. As moléculas de ligação

5 freqüentemente contêm um grupo reativo para facilitar a conjugação covalente à cardiolipina oxidada. Os grupos amina de aminoácidos são freqüentemente utilizados desta maneira. As moléculas de ligação que não têm tais grupos podem freqüentemente ser reagidas com um composto químico apropriado para produzi-

los.

10 **Afinidade de ligação:** Uma expressão que se refere à força da ligação de uma molécula a outra em um local da molécula. Se uma molécula particular irá se ligar ou associar especificamente a outra molécula particular, diz-se que essas duas moléculas exibem afinidade de ligação uma com a outra. A afinidade de ligação é relacionada à constante de associação e à constante de

15 dissociação para um par de moléculas, mas não é crucial para a invenção que essas constantes sejam medidas ou determinadas. Ao invés, as afinidades utilizadas aqui para descrever interações entre moléculas dos métodos e dispositivos descritos são afinidades geralmente aparentes (a não ser quando indicado o contrário) observadas em estudos empíricos, que podem ser utilizados

20 para comparar a força relativa com que uma molécula (por ex., um anticorpo ou outro parceiro de ligação específico) se ligará a outras duas moléculas (por ex., um analito e um conjugado analito-traçador). Os conceitos de afinidade de ligação, constante de associação e constante de dissociação são bem conhecidos.

Domínio de ligação: A estrutura molecular associada àquela

25 porção de um receptor que se liga ao ligante. Mais particularmente, o domínio de ligação pode se referir a um polipeptídio, natural ou sintético, ou ácido nucléico que codifique tal polipeptídio, cuja sequência de aminoácidos representa uma região (um domínio de ligação) de uma proteína, que, sozinha ou em combinação com outros domínios, exibe características de ligação que são as mesmas ou

30 semelhantes às de um par de ligação ligando/receptor desejado. Nem as sequências específicas e nem as fronteiras específicas de tais domínios são cruciais, desde que a atividade de ligação seja exibida. De forma semelhante,

utilizada nesse contexto, as características de ligação incluem necessariamente uma faixa de afinidades, avides e especificidades, e combinação destas, desde que a atividade de ligação seja exibida.

Amostra biológica: Qualquer amostra que possa ser obtida diretamente ou indiretamente a partir de um sujeito, incluindo sangue, plasma, soro, lágrimas, muco, saliva, urina, fluido pleural, fluido espinhal, fluido gástrico, suor, sêmen, secreção vaginal, escarro, fluidos de úlceras e/ou de outras erupções de superfície, bolhas, abscessos e/ou extratos de tecidos, células ou órgãos. A amostra biológica pode ser também uma amostra de pesquisa de laboratório tal como um sobrenadante de cultura de células. A amostra é coletada ou obtida utilizando-se métodos bem conhecidos pelos técnicos no assunto.

Carbodiimida: Um composto da estrutura $R_1-N=C=N-R_2$, em que R_1 e R_2 são independentemente o hidrogênio ou os grupos hidrocarbíl. Exemplos específicos incluem $HN=C=NH$, 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida; N,N'-diciclohexil-carbodiimida; e diisopropilcarbodiimida.

Cardiolipina: Inclui tanto a cardiolipina natural como qualquer cardiolipina modificada que tenha similaridade estrutural com a cardiolipina de ocorrência natural, e que seja capaz de se ligar especificamente a um anticorpo anti-lipídico.

Área de captura de cardiolipina: Uma área de captura em que cardiolipina seja imobilizada como o reagente de captura.

Reagente de captura: Um parceiro de ligação específico não marcado que seja específico para (i) um analito, como em um ensaio "sanduíche", ou (ii) um reagente detector ou um analito, como em um ensaio competitivo, ou para (iii) um parceiro de ligação específico auxiliar, que seja em si mesmo específico para o analito, como em um ensaio indireto. Como utilizado aqui, um "parceiro de ligação auxiliar específico" é um parceiro de ligação específico que se ligue ao parceiro de ligação específico de um analito. Por exemplo, um parceiro de ligação auxiliar específico pode incluir um anticorpo específico para um outro anticorpo como, por exemplo, anticorpo anti-humano de cabra. Uma "área de captura" é uma região de um dispositivo de fluxo lateral em que o reagente de captura é imobilizado. Um dispositivo de fluxo lateral pode

ter mais de uma área de captura, por exemplo, uma “**área de captura principal**”, uma “**área de captura secundária**”, e assim por diante. Frequentemente um reagente de captura diferente será imobilizado nas áreas de captura principal, secundária, ou em outras áreas de captura. Múltiplas áreas de

5 captura podem possuir qualquer orientação uma em relação à outra no substrato de fluxo lateral; por exemplo, uma área de captura principal pode ser distal ou proximal a uma área de captura secundária (ou outra), e vice-versa. Alternativamente, uma área de captura principal e uma área de captura secundária (ou outra) podem ser orientadas perpendicularmente uma à outra de

10 modo que as duas (ou mais) áreas de captura formem uma cruz ou um sinal de mais, ou outro símbolo.

Conjugado: Quando utilizado em forma de verbo, o termo “conjugado” significa o acoplamento covalente de uma molécula (por ex., cardiolipina oxidada) a uma outra molécula (por ex., uma proteína). Tal

15 acoplamento pode ser alcançado por meios químicos, com ou sem o uso de um grupo de ligação. Quando utilizado em forma de substantivo, o termo “conjugado” significa um complexo molecular acoplado formado por conjugação.

Detectar ou Detecção: Refere-se à determinação quantitativa ou

20 qualitativa da presença do(s) analito(s) sob investigação (por ex., anticorpos anti-lipídicos e/ou anticorpos anti-*T. pallidum*). “**Detectar a Formação de um Complexo**” se refere à detecção de um complexo que compreenda um reagente detector por qualquer método adequado para observar a marcação particular associada ao reagente detector; por exemplo, a observação visual de um

25 marcador colorido (ou visível de outra forma), a medição ou detecção visual de um marcador fluorescente, quimioluminescente ou radioativo.

Reagente detector (ou Reagente de detecção): Um parceiro de ligação específico que seja conjugado a um marcador. Os reagentes de detecção incluem, por exemplo, membros de analito específico marcados (tais como

30 complexos de moléculas oxidadas de ligação de cardiolipina conjugadas com ouro), ou membros de ligação específicos auxiliares marcados (tais como anticorpos anti-humanos de cabra conjugados com enzima).

Epitopo (ou determinante antigênico): Um local sobre a superfície de uma molécula de antígeno ao qual uma única molécula de anticorpo de ligue; geralmente, um antígeno possui diversos ou muitos determinantes diferentes, e reage com anticorpos de muitas especificidades diferentes.

- 5 **Imunogenicidade:** A propriedade de ser capaz de provocar uma reação imunológica dentro de um organismo. Por exemplo, a cardiolipina oxidada retém a imunogenicidade quando um anticorpo anti-lipídico tem a capacidade de ligar um epitopo presente na cardiolipina oxidada.

- 10 **Marcador:** Qualquer molécula ou composição ligada a um analito, análogo de analito, reagente detector, ou parceiro de ligação que seja detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, elétricos, ópticos ou químicos. Exemplos de marcadores, incluindo enzimas, partículas de ouro coloidais, e partículas de látex coloridas, foram revelados (Patentes US N^os. 4.275.149, 4.313.734, 4.373.932, e 4.954.452, cada uma delas
- 15 incorporada aqui como referência). Exemplos adicionais de marcadores úteis incluem, sem limitação, isótopos radioativos, co-fatores, ligandos, agentes quimioluminescentes ou fluorescentes, partículas de prata adsorvidas por proteína, partículas de ferro adsorvidas por proteína, partículas de cobre adsorvidas por proteína, partículas de selênio adsorvidas por proteína, partículas
- 20 de enxofre adsorvidas por proteína, partículas de telúrio adsorvidas por proteína, partículas de carbono adsorvidas por proteína e bolsas de tinta acopladas com proteína. A ligação de um composto (por ex., um reagente detector) a um marcador pode ser através ligações covalentes, processos de adsorção, ligações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas, como em quelatos e outros, ou combinações
- 25 destas ligações e interações, e/ou podem envolver um grupo de ligação.

- Dispositivo de fluxo lateral:** Um dispositivo analítico na forma de uma fita de teste utilizada em cromatografia de fluxo lateral, em que uma amostra fluida de teste, suspeita de conter um analito, flui (por exemplo, por ação capilar) através da fita (que é freqüentemente feita de materiais absorventes tais como o
- 30 papel, a nitro-celulose e a celulose). O fluido de teste e qualquer analito suspenso podem fluir ao longo da fita para uma zona de detecção em que o analito (caso

presente) interaja com um agente de detecção para indicar uma presença, ausência e/ou quantidade do analito.

5 Numerosos dispositivos analíticos de fluxo lateral foram divulgados, e incluem os mostrados nas Patentes US N^os. 4.313.734, 4.435.504, 4.775.636, 4.703.017, 4.740.468, 4.806.311, 4.806.312, 4.861.711, 4.855.240, 4.857.453, 4.943.522, 4.945.042, 4.496.654, 5.001.049, 5.075.078, 5.126.241, 5.451.504, 5.424.193, 5.712.172, 6.555.390, e 6.368.876; EP 0810436; e WO 92/12428, WO 94/01775, WO 95/16207, e WO 97/06439, cada uma das quais sendo incorporada como referência.

10 Muitos dispositivos de fluxo lateral são ensaios de fluxo lateral de uma única etapa em que um fluido biológico é posto em uma área de amostra sobre uma fita absorvente (embora materiais não-absorventes possam ser utilizados, e tornados absorventes pela aplicação de um surfactante ao material), e visto migrar ao longo da fita até que o líquido entre em contato com um
15 parceiro de ligação específico que interaja com um analito no líquido. Uma vez que o analito interage com o parceiro de ligação, um sinal (tal como uma tinta fluorescente ou visível de outra forma) indica que a interação ocorreu. Múltiplos parceiros de ligação discretos podem ser postos sobre a fita (por exemplo, em linhas paralelas) para detectar múltiplos analitos no líquido. As fitas de teste
20 podem também incorporar indicadores de controle, que fornecem um sinal de que o teste foi adequadamente realizado, mesmo se um sinal positivo que indique a presença (ou a ausência) de um analito não seja visto na fita.

Lecitina (ou fosfatidilcolina): A lecitina é o nome comum para a fosfatidilcolina. A fosfatidilcolina é um glicerofosfolípido, que é usualmente o
25 fosfolípido mais abundante em animais e vegetais. Ela é um bloco de construção crucial de bi-camadas de membrana, e é também o principal fosfolípido que circula no plasma. A fosfatidilcolina é um fosfolípido neutro ou zwitteriônico sobre uma faixa de pH de fortemente ácido até fortemente alcalino. A fosfatidilcolina contém duas cadeias laterais de ácidos graxos, que podem possuir
30 estruturas químicas variáveis em natureza e modificadas sinteticamente. As estruturas químicas de quatro moléculas representativas da fosfatidilcolina de ocorrência natural são mostradas na Fig. 9.

Conforme utilizado aqui, o termo “lecitina” inclui tanto as lecitinas de ocorrência natural como qualquer lecitina sintética modificada que tenha similaridade estrutural com a lecitina de ocorrência natural. Por exemplo, os ácidos graxos das lecitinas sintéticas podem incluir os seguintes:

Número de Carbonos	1-Acil	2-Acil
14:0-16:0	Miristoil	Palmitoil
14:0-18:0	Miristoil	Estearoil
16:0-14:0	Palmitoil	Miristoil
16:0-18:0	Palmitoil	Estearoil
16:0-18:1	Palmitoil	Oleoil
16:0-18:2	Palmitoil	Linoleoil
16:0-20:4	Palmitoil	Araquidonoil
16:0-22:6	Palmitoil	Docosaexanoil
18:0-14:0	Estearoil	Miristoil
18:0-16:0	Estearoil	Palmitoil
18:0-18:1	Estearoil	Oleoil
18:0-18:2	Estearoil	Linoleoil
18:0-20:4	Estearoil	Araquidonoil
18:0-22:6	Estearoil	Docosaexanoil
18:1-14:0	Oleoil	Miristoil
18:1-16:0	Oleoil	Palmitoil
18:1-18:0	Oleoil	Estearoil
14:1-14:1	Miristoleoil	Miristoleoil
14:1-14:1	Miristelaídoil	Miristelaídoil
16:1-16:1	Palmitoleoil	Palmitoleoil
18:1-18:1	Palmitelaídoil	Palmitelaídoil
18:1-18:1	Petroselinoil	Petroselinoil
18:1-18:1	Oleoil	Oleoil
18:1-18:1	Elaidoil	Elaidoil
18:2-18:2	Linolenoil	Linolenoil
18:3-18:3	Linolenoil	Linolenoil
20:1-20:1	Eicosenoil	Eicosenoil
20:4-20:4	Araquidonoil	Araquidonoil
22:1-22:1	Erucoil	Erucoil
22:6-22:6	DHA	DHA
24:1-24:1	Nervonoil	Nervonoil

Grupo de ligação: Um braço químico entre dois compostos. Por exemplo, um composto e um marcador (por ex., um analito e um marcador). Para se obter a estrutura química necessária, cada um dos reagentes deve conter um grupo reativo. As combinações representativas de tais grupos são amino com carboxila para formar ligações amida; carboxi com hidroxil para formar ligações ésteres; ou amino com alquil haletos para formar ligações alquilamino; tióis com tióis para formar dissulfetos; ou tióis com maleimidias ou alcaletos para formar tioéteres. Hidroxila, carboxila, amino e outras funcionalidades, quando não presentes no composto original, podem ser introduzidas por métodos conhecidos.

Da mesma forma, uma ampla variedade de grupos de ligação pode ser empregada. A estrutura da ligação deve ser uma ligação covalente estável formada para ligar dois compostos um ao outro (por ex., o marcador ao analito). Em alguns casos, o grupo de ligação pode ser designado para ser hidrofílico ou hidrofóbico para acentuar as características de ligação desejadas, por exemplo, do ligando modificado e seu receptor cognato. As ligações covalentes devem ser estáveis em relação às condições da solução a que os compostos ligados estiverem sujeitos. Exemplos de grupos de ligação terão de 1 a 20 carbonos e de 0 a 10 hetero-átomos (N, H, O, S), e podem ser de cadeias ramificadas ou retas. Sem limitar o que foi exposto anteriormente, deve parecer óbvio que somente combinações de átomos que sejam quimicamente compatíveis compreendem o grupo de ligação. Por exemplo, os grupos amida, éster, tioéter, tiol éster, ceto, hidroxila, carboxila e éter, em combinação com ligações carbono-carbono são exemplos particulares de grupos de ligação quimicamente compatíveis.

Contato operável ou contíguo: Dois componentes sólidos estão em contato operável quando eles estão em contato, seja direta ou indiretamente, de uma maneira tal que um líquido aquoso possa fluir a partir de um dos componentes até o outro substancialmente sem interrupções, por capilaridade ou de outra forma. O contato direto ou contíguo significa que os dois elementos estão em contato físico, tal como borda-com-borda ou frente-com-trás. Quando dois componentes estão em contato direto, eles podem se sobrepor com uma sobreposição de aproximadamente 0,5 até aproximadamente 3 mm. Contudo, os

componentes podem ser colocados com bordas encostadas. "Contato indireto" significa que os dois elementos não estão em contato físico, mas são ligados por um ou mais condutores. O contato operável pode ser referido também como contato de "transmissão de fluido" ou contato de "fluido contínuo".

- 5 **Cardiolipina oxidada (ou cardiolipina modificada):** Cardiolipina que foi quimicamente modificada como descrito aqui. Por exemplo, a cardiolipina oxidada é uma população misturada de moléculas quimicamente relacionadas em que ao menos uma das quatro de ácidos graxos na cardiolipina não-oxidada foram clivados de forma oxidante para produzir um grupo carboxila
- 10 terminal. Em algumas modalidades, a cardiolipina oxidada tem uma estrutura química mostrada na Fig. 3.

- Agente de redução:** Qualquer agente de redução que reduza um grupo β -cetona resultante da oxidação de cardiolipina à β -hidroxila correspondente sem causar uma degradação substancial de outros grupos
- 15 funcionais de cardiolipina oxidada, tais como os grupos éster de ácidos graxos e os ésteres de fosfato. Os técnicos no assunto podem selecionar agentes redutores adequados a partir, por exemplo, dos ensinados por Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, 2ª Edição, Nova York: John Wiley & Sons, 1999. Exemplos particulares de agentes redutores incluem o bissulfito de sódio, sulfeto
- 20 dimetilíco, cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN), boroidreto de sódio (NaBH_4), triacetoxiboroidreto ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), borano de morfolina, triisopropoxiboroidreto de potássio, borano de t-butil amina, borano de dimetilamina, borano de piridina, borano de trietilamina, borano de trimetilamina.

- 25 **Área de aplicação de amostra:** Uma área onde uma amostra de fluido é introduzida em uma fita de teste imunocromatográfico, tal como uma fita de teste imunocromatográfico presente em um dispositivo de fluxo lateral. Em um exemplo, a amostra pode ser introduzida na área de aplicação de amostra por aplicação externa, como com um conta-gotas ou outro aplicador. Em um outro
- 30 exemplo, a área de aplicação de amostra pode ser diretamente imersa na amostra, tal como quando uma fita de teste é mergulhada dentro de um recipiente

contendo uma amostra. Em ainda um outro exemplo, a amostra pode ser derramada ou expressa por sobre a área de aplicação de amostra.

Suporte (ou substrato) sólido: Qualquer material que seja insolúvel, ou que possa ser tornado insolúvel por uma reação subsequente.

- 5 Numerosos e variados suportes sólidos são conhecidos pelos técnicos no assunto, e incluem, sem limitação, a nitro-celulose, as paredes dos vasos de uma bandeja de reação, placas com múltiplos vasos, tubos de ensaio, contas de poliestireno, contas magnéticas, membranas, micro-partículas (tais como partículas de látex), e glóbulos vermelhos do sangue de ovelhas (ou de outros animais). Qualquer
- 10 material poroso adequado com porosidade suficiente para permitir o acesso de reagentes detectores e uma afinidade de superfície adequada para imobilizar reagentes de captura (por ex., cardiolipina oxidada ou complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada) é previsto por este termo. Por exemplo, a estrutura porosa da nitro-celulose possui excelentes qualidades de absorção e
- 15 adsorção para uma ampla variedade de reagentes, como, por exemplo, os reagentes de captura. O nylon possui características semelhantes e é também adequado. As estruturas micro-porosas são úteis, assim como os materiais com estrutura de gel no estado hidratado.

- Exemplos adicionais de suportes sólidos úteis incluem: carboidratos
- 20 poliméricos naturais e seus derivados reticulados ou substituídos modificados sinteticamente, tal como o ágar, a agarose, ácido algínico reticulado, gomas de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) substituídas e reticuladas, ésteres de celulose, especialmente com ácido nítrico e ácidos carboxílicos, ésteres de celulose misturados, e éteres de celulose; polímeros naturais que contenham nitrogênio,
- 25 tais como proteínas e derivados, incluindo gelatinas reticuladas ou modificadas; polímeros de hidrocarbonetos naturais, tais como o látex e a borracha; polímeros sintéticos que possam ser preparados com estruturas porosas adequadas, tais como os polímeros vinílicos, incluindo o polietileno, polipropileno, poliestireno, polivinilcloreto, polivinilacetato e seus derivados parcialmente hidrolisados,
- 30 poliacrilamidas, polimetacrilatos, co-polímeros e ter-polímeros dos poli-condensados acima, tais como poliésteres, poliamidas, e outros polímeros, tais como os poliuretanos ou os poliepóxidos; materiais inorgânicos porosos tais

como sulfatos ou carbonatos de metais alcalinos terrosos e magnésio, incluindo o sulfato de bário, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio, silicatos de alcalinos e alcalinos terrosos, alumínio e magnésio, e óxidos ou hidratos de alumínio ou de silício, tais como argilas, alumina, talco, caulim, zeólitos, sílica gel, ou vidro (esses materiais podem ser utilizados como filtros com os materiais poliméricos acima); e misturas ou co-polímeros das classes acima, tais como os co-polímeros de enxerto obtidos pela inicialização da polimerização de polímeros sintéticos em um polímero natural pré-existente.

É previsto que suportes sólidos porosos, tais como a nitrocelulose, descrita aqui acima, estejam preferivelmente na forma de lâminas ou fitas. A espessura de tais lâminas ou fitas pode variar dentro de amplos limites, por exemplo, de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, de aproximadamente 0,02 a 0,45 mm, de aproximadamente 0,05 a 0,3 mm, de aproximadamente 0,075 a 0,25 mm, de aproximadamente 0,1 a 0,2 mm, ou de aproximadamente 0,11 a 0,15 mm. O tamanho dos poros de tais lâminas ou fitas pode semelhantemente variar dentro de amplos limites, por exemplo, de aproximadamente 0,025 a 15 micrômetros, ou mais especificamente de aproximadamente 0,1 a 3 micrômetros; contudo, o tamanho dos poros não deve ser um fator limitativo na seleção do suporte sólido. A taxa de fluxo de um suporte sólido, quando aplicável, também pode variar dentro de amplos limites, por exemplo, de aproximadamente 12,5 a 90 s/cm (isto é, de 50 a 300 s/4 cm), de aproximadamente 22,5 a 62,5 s/cm (isto é, de 90 a 250 s/4 cm), de aproximadamente 25 a 62,5 s/cm (isto é, de 100 a 250 seg/4 cm), de aproximadamente 37,5 a 62,5 s/cm (isto é, de 150 a 250 s/4 cm), ou de aproximadamente 50 a 62,5 s/cm (isto é, de 200 a 250 s/4 cm). Em modalidades específicas descritas aqui, a taxa de fluxo é de aproximadamente 62,5 s/cm (isto é, de 250 s/4 cm). Em outras modalidades específicas dos dispositivos descritos aqui, a taxa de fluxo é de aproximadamente 37,5 s/cm (isto é, de 150 s/4 cm).

A superfície de um suporte sólido pode ser ativada por processos químicos que causem a ligação covalente de um agente (por ex., um reagente de captura) ao suporte. Contudo, qualquer outro método adequado pode ser utilizado para imobilizar um agente (por ex., um reagente de captura) em um suporte sólido, incluindo, sem limitação, interações iônicas, interações hidrofóbicas,

interações covalentes e outras. As forças particulares que resultam na imobilização de um agente sobre uma fase sólida não são importantes para os métodos e dispositivos descritos aqui.

Uma fase sólida pode ser escolhida por sua capacidade intrínseca de atrair e imobilizar um agente, tal como um reagente de captura. Alternativamente, a fase sólida pode possuir um fator que tenha a capacidade de atrair e imobilizar um agente, tal como um reagente de captura. O fator pode incluir uma substância carregada que opostamente carregada em relação, por exemplo, ao próprio reagente de captura ou a uma substância carregada conjugada ao agente de captura. Em uma outra modalidade, um membro de ligação específico pode ser imobilizado na fase sólida para imobilizar seu parceiro de ligação (por ex., um reagente de captura). Neste exemplo, portanto, o membro de ligação específico permite a ligação indireta do reagente de captura a um material de fase sólida.

A não ser quando fisicamente restringido de outra forma, o suporte sólido pode ser utilizado em quaisquer formas adequadas, tais como películas, lâminas, faixas ou placas, ou ele pode ser revestido por sobre ou laminado a portadores inertes apropriados, tais como papel, vidro, filmes plásticos ou tecidos.

Um “**substrato de fluxo lateral**” é qualquer suporte sólido que seja útil em um dispositivo de fluxo lateral.

Parceiro de ligação específico (ou parceiro de ligação): Um membro de um par de moléculas que interaja por meio de interações específicas, não-covalentes, que dependam das estruturas tridimensionais das moléculas envolvidas. Pares típicos de parceiros de ligação específicos incluem antígeno/anticorpo, hapteno/anticorpo, hormônio/receptor, filamento de ácido nucléico/filamento de ácido nucléico complementar, substrato/enzima, inibidor/enzima, carboidrato/lectina, biotina;(strept)avidina, e vírus/receptor celular.

A expressão “se liga especificamente a um analito” ou “especificamente imunorreativo com”, quando se referindo a um anticorpo, se refere a uma reação de ligação que é determinante da presença do analito na

presença de uma população heterogênea de moléculas, tais como proteínas e outras moléculas biológicas. Assim, sob condições de imuno-ensaio designadas, os anticorpos especificados se ligam a um analito particular e não se ligam em quantidade significativa aos outros analitos presentes na amostra. Uma variedade

5 de formatos de imuno-ensaios pode ser utilizada para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com um analito particular. Por exemplo, imuno-ensaios ELISA de fase sólida são rotineiramente utilizados para selecionar anticorpos monoclonais especificamente imunorreativos com uma proteína. Ver Harlow e Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, Nova York, (1988),

10 para uma descrição de formatos e condições de imuno-ensaios que podem ser utilizadas para determinar imunorreatividades específicas.

Sujeito: Organismos multicelulares vivos, incluindo organismos vertebrados, uma categoria que inclui tanto mamíferos humanos como não-humanos.

15 **Antígeno Treponêmico:** Um antígeno que contenha ao menos um determinante antigênico que ligue especificamente anticorpos anti-*T. pallidum*. Numerosos antígenos treponêmicos foram descritos no assunto; ver, por exemplo, as Patentes US N^os. 6.479.248; 6.248.331; 5.681.934; 5.578.456; 4.868.118; e 4.740.467, cada uma das quais é aqui incorporada como referência.

20 Por exemplo, polipeptídios com pelo menos os seguintes pesos moleculares aparentes foram descritos como antígenos da *T. pallidum*: 16 a 20 KDa, 18 KDa, 18 a 23 KDa, 25 KDa, 35 KDa, 37 KDa, 37 a 46 KDa, 38 KDa, 39 KDa, 41 KDa, 43 KDa, 44 KDa, 46 KDa, 47 KDa, 58 KDa, 150 KDa; e 180 KDa (para detalhes mais particulares, ver Patente US N^o. 4.846.118).

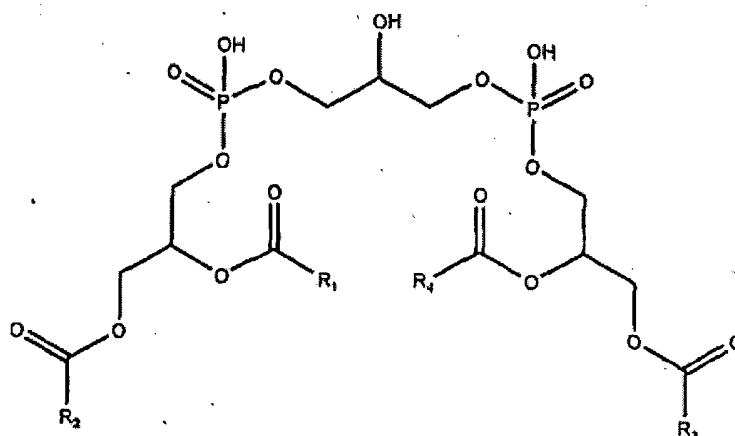
25 A não ser quando explicado contrariamente, todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm os mesmos significados entendidos comumente pelos técnicos no assunto ao qual esta invenção pertence. Os artigos singulares “um”, “uma”, “o” e “a” incluem os referentes plurais, a não ser quando for indicado claramente o contrário. De modo semelhante, a palavra “ou”

30 deve incluir “e”, a não ser quando for indicado claramente o contrário. Portanto, “compreendendo A ou B” significa a inclusão de A, ou de B, ou de A e B. Deve ser ainda entendido que todos os tamanhos de bases ou tamanhos de

aminoácidos, e todos os valores de pesos moleculares ou de massas moleculares, dados para os ácidos nucléicos ou polipeptídios são aproximados, e são fornecidos para a descrição. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos aqui possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais mais adequados são descritos aqui. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas são aqui incorporadas em suas totalidades como referências. No caso de um conflito, o presente relatório, incluindo a explicação dos termos, assumirá o controle. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos, e não devem ser limitativos.

III. Cardiolipina

A cardiolipina é um difosfatidil glicerol (especificamente, 1,3-difosfatidilglicerol), que, como mostrado abaixo, tem uma estrutura que consiste em três moléculas de glicerol unidas por duas pontes de fosfodiéster.



Cardiolipina

Os quatro grupos hidroxila das funções orgânicas glicerol externas da cardiolipina são cada um deles esterificado com uma cadeia de ácidos graxos saturados ou insaturados (tipicamente com 14 a 18 carbonos de comprimento). Como utilizado aqui, o termo "cardiolipina" prevê o 1,3-difosfatidilglicerol contendo qualquer distribuição de cadeias laterais de ácidos graxos; desde que pelo menos uma cadeia lateral de ácidos graxos de cardiolipina possam variar

independentemente em comprimento (por ex., de aproximadamente 14 até aproximadamente 25 carbonos, de aproximadamente 14 até aproximadamente 22 carbonos, de aproximadamente 14 até aproximadamente 20 carbonos, de aproximadamente 14 até aproximadamente 18 carbonos, ou de aproximadamente 14 até aproximadamente 16 carbonos) e/ou em grau de saturação (por ex., desde completamente saturado até possuindo aproximadamente 6 ligações duplas, desde completamente saturado até possuindo aproximadamente 4 ligações duplas, desde completamente saturado até possuindo aproximadamente 2 ligações duplas). Cadeias laterais de ácidos graxos de cardiolipina exemplificativas incluem miristoil (14:0); palmitoil (16:0); estearoil (18:0); oleoil (18:1); miristoleoil (14:1); palmitoleoil (16:1); petroselinoil (18:1); linoleoil (18:2); linoleoil (18:3); eicosenoil (20:1); araquidonoil (20:4); erucoil (22:1); DHA (22:6); ou nervonoil (24:1).

Em algumas modalidades, a cardiolipina é uma forma de ocorrência natural. A cardiolipina de ocorrência natural se encontra disponível comercialmente a partir de um número de fornecedores, por exemplo, Sigma Aldrich, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA), e Lee Laboratories (Grayson, GA, EUA). Ela também pode ser derivada, por exemplo, por extração por solvente de tecido do músculo do coração bovino, por um método de precipitação, ou por cromatografia em coluna de alta pressão. A composição de ácidos graxos da cardiolipina de ocorrência natural é geralmente distribuída de acordo com uma ampla variedade de ácidos graxos de ocorrência natural, tais como o palmitol (16:0); estearoil (18:0); oleoil (18:1); e linoleoil (18:2). A espécie molecular de ácidos graxos mais abundante nas formas de ocorrência natural da cardiolipina são o ácido linoléico em 90%, seguido pelo ácido oléico em 5%, e ácido palmítico em 1%.

Em outras modalidades, a cardiolipina é uma forma de ocorrência não-natural (também referida como "cardiolipina sintética"). Exemplos não-limitativos de cardiolipina sintética incluem, por exemplo, tetraoleoil cardiolipina, bis (dipalmitoil D,L- α -glicerilfosforil)-1,3 glicerol benzil éter sal dissódico, bis (dipalmitoil D,L- α -glicerilfosforil)-1,5 pentanodiol sal dissódico, bis (dipalmitoil D,L- α -glicerilfosforil)-1,3 propanodiol sal dissódico, bis

(dipalmitoil D,L- α -glicerilfosforil)-1,4 butanodiol sal dissódico, bis (dipalmitoil D,L- α -glicerilfosforil)-1,2 etanodiol sal dissódico, bis bis (dipalmitoil D,L- α -glicerilfosforil)-1,3 glicerol sal dissódico, bis benzilfosforil)-1,3 propanodiol sal dissódico, ou D,L- α -dipalmitoil ácido bis-fosfatídico.

- 5 Acredita-se que o epitopo antigênico da cardiolipina envolva os dois grupos fosfato e o grupo β -hidroxila da função orgânica glicerol central. Esse epitopo antigênico está presente tanto em cardiolipinas de ocorrência natural como sintéticas. Cada uma ou ambas as cardiolipinas de ocorrência natural e sintética podem ser oxidadas como descrito aqui, desde que anticorpos anti-
- 10 lipídicos se liguem especificamente à forma oxidada.

IV. *Oxidação da Cardiolipina*

A. Geral

- O versado no assunto irá perceber que a clivagem oxidativa das cadeias laterais de ácidos graxos da cardiolipina irá ocorrer na presença de
- 15 agentes oxidantes, tais como NaIO_4 e KMnO_4 , ou NaIO_4 e tetróxido de rutênio, ou HIO_4 e KMnO_4 (ver, por ex., March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, Segunda Edição, Nova York: McGraw Hill Company, 1977, página 1.095). Ou seja, as ligações duplas presentes nas cadeias laterais de ácidos graxos seriam eventualmente oxidadas em grupos
- 20 carboxila, desse modo liberando um alquil carboxilato, tal como o ácido malônico e/ou o ácido capróico (como mostrado na Fig. 3). Em uma molécula de cardiolipina completamente oxidada, todas as quatro cadeias laterais de ácidos graxos serão clivadas na(s) primeira(s) (mais próximas) posições de ligações duplas, para produzir cadeias de ácidos graxos, cada uma com um grupo
- 25 carboxila terminal (como mostrado na Fig. 3). Como a cardiolipina de ocorrência natural pode ser heterogênea com relação à sua composição de cadeia lateral de ácidos graxos, uma preparação de cardiolipina completamente oxidada será uma mistura de espécies oxidadas que refletem a homogeneidade das cadeias laterais de ácidos graxos na molécula não-oxidada. Uma homogeneidade adicional pode
- 30 survir se a oxidação da cardiolipina é incompleta. Nesta situação, uma mistura de espécies de cardiolipina oxidadas onde 1, 2 ou 3 das cadeias laterais de ácidos graxos são oxidados em ácido(s) carboxílico(s) será produzida (ver, por ex., Fig.

3 como um exemplo de molécula de cardiolipina oxidada com um grupo
carboxila terminal que ilustra a oxidação incompleta, e um outro exemplo de uma
cardiolipina oxidada que passou por completa oxidação). Qualquer uma ou todas
as espécies de cardiolipina oxidadas descritas neste parágrafo são previstas como
5 sendo úteis nas composições, métodos e dispositivos descritos.

B. Oxidação da Cardiolipina por NaIO_4 e KMnO_4

Um método útil para a oxidação da cardiolipina emprega periodato
(IO_4^-) e/ou permanganato (MnO_4^-) como os agentes oxidantes. Os sais desses
agentes oxidantes incluem qualquer íon compensador que forneça um composto
10 eletricamente neutro. O periodato está tipicamente na forma de um sal de
periodato, tal como NaIO_4 ou HIO_4 (ácido periódico), e o permanganato está
tipicamente na forma de um sal (tal como um sal de sódio ou de potássio), por
exemplo, KMnO_4 . Em uma modalidade específica, NaIO_4 e KMnO_4 são
utilizados como agentes oxidantes. Para pôr em prática esse método de oxidação,
15 a cardiolipina obtida a partir de qualquer fonte pode ser adicionada a qualquer
solvente em que a cardiolipina se dissolva substancialmente. Tendo em vista a
natureza hidrofóbica da cardiolipina, o uso de um solvente orgânico polar, tal
como o t-butanol, etanol, metanol, propanol, acetona, dimetilformamida, ou éster
dietílico é preferível. Outros solventes orgânicos não-polares podem ser
20 utilizados para suspender a cardiolipina, tais como o clorofórmio; contudo, esses
solventes orgânicos não-polares são menos úteis porque os outros componentes
da reação de oxidação (como descrito abaixo) são menos solúveis nesses
solventes do que, por exemplo, em um solvente orgânico polar ou em um
solvente aquoso.

25 A concentração da solução de cardiolipina pode ser qualquer
concentração útil que, em sua faixa mais elevada, ainda permita que a
cardiolipina se dissolva no solvente escolhido. Um técnico no assunto pode
determinar facilmente o ponto de saturação para a cardiolipina em qualquer
particular solvente. Em exemplos onde t-butanol é o solvente escolhido, as
30 concentrações de cardiolipina podem ficar na faixa de aproximadamente 10
mg/ml até aproximadamente 250 mg/ml, tal como aproximadamente 10 mg/ml,
aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75

mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml e aproximadamente 250 mg/ml. Se pequenas partículas estiverem presentes após a dissolução da cardiolipina no solvente escolhido, a solução pode, opcionalmente, ser clareada por qualquer técnica conhecida no assunto, tal como a centrifugação ou a filtração.

Em algumas modalidades, a oxidação da cardiolipina pode ocorrer na ausência de oxigênio, como, por exemplo, em uma atmosfera de argônio, hélio ou nitrogênio. Uma reação de oxidação de cardiolipina irá ocorrer em uma atmosfera contendo oxigênio, tal como o ar, ou em outra atmosfera; contudo, as moléculas oxidantes contidas aí, tais como carbonatos, podem diminuir a eficiência da reação. Ainda assim, todas as atmosferas em que a reação de oxidação de cardiolipina irá ocorrer, independentemente da eficiência da reação, são previstas nesta divulgação.

Quantidades de agentes oxidantes, tais como NaIO_4 e KMnO_4 , suficientes para clivar de forma oxidantes ao menos uma cadeia lateral de ácidos graxos de cardiolipina são então adicionadas à cardiolipina suspensa sob constante agitação. Em alguns exemplos, o periodato e o permanganato (tais como NaIO_4 e KMnO_4) são usados em combinação para oxidar a cardiolipina. Em certos desses exemplos, o periodato (tal como NaIO_4) é adicionado à solução de cardiolipina antes da adição do permanganato (tal como KMnO_4). Os agentes oxidantes podem ser dissolvidos em qualquer solvente no qual eles forem solúveis e que irá se misturar com a solução de cardiolipina. Por exemplo, NaIO_4 e KMnO_4 podem ser dissolvidos em água.

Quando NaIO_4 é utilizado em um método para oxidar cardiolipina, a quantidade de NaIO_4 utilizada na reação não é importante. Minimamente, a quantidade é tal que a reação ocorra dentro de um tempo razoável sob as circunstâncias particulares. No outro lado do espectro, um excesso molar considerável de NaIO_4 pode ser utilizado na reação de oxidação. Por exemplo, a razão molar de periodato (tal como NaIO_4) para cardiolipina pode ser de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 100:1, de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, de

aproximadamente 2:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 2,5:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 7,5:1, ou de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 5:1. Em modalidades específicas, a razão molar de m-píodato de sódio para cardiolipina é de aproximadamente 4:1 a 5:1, ou mais especificamente de aproximadamente 4,2:1.

Quando um percentual (tal como de KMnO_4) é utilizado em um método para oxidar cardiolipina, a quantidade de permanganato utilizada na reação não é crucial. Minimamente, a quantidade é tal que a reação ocorra em um tempo razoável sob as circunstâncias particulares. De outro lado, um excesso molar considerável de permanganato deve ser utilizado na reação de oxidação. Por exemplo, a razão molar de permanganato (tal como o KMnO_4) para cardiolipina pode ser de aproximadamente 0,01:1 até aproximadamente 100:1, de aproximadamente 0,02:1 até aproximadamente 50:1, de aproximadamente 0,1:1 até aproximadamente 25:1, de aproximadamente 0,25:1 até aproximadamente 15:1, de aproximadamente 0,3:1 até aproximadamente 10:1, de aproximadamente 0,4:1 até aproximadamente 7,5:1, de aproximadamente 0,5:1 até aproximadamente 5:1, de aproximadamente 0,6:1 até aproximadamente 2:1, ou de aproximadamente 0,7:1 até aproximadamente 1:1, ou mais especificamente de aproximadamente 0,75:1.

A mistura da reação de oxidação pode ocorrer em temperaturas que não impeçam que a reação ocorra. De forma semelhante, a reação pode continuar por qualquer período de tempo que seja suficiente para causar a clivagem oxidativa de ao menos uma cadeia lateral de ácidos graxos de cardiolipina. Como os técnicos no assunto irão perceber, o tempo de reação dependerá de diversas variáveis, incluindo a temperatura da reação, o tipo de solvente, as concentrações dos reagentes e do produto; cada uma destas variáveis pode ser facilmente ajustada por experimentações rotineiras. Em um exemplo, a reação de oxidação ocorre na temperatura ambiente e continua por ao menos 24 a 48 horas.

A reação de oxidação de cardiolipina pode ser interrompida com qualquer agente redutor capaz de neutralizar o(s) agente(s) oxidante(s) presentes na reação, e capaz de reduzir qualquer cetona formada no carbono- β da função orgânica glicerol central no grupo β -hidroxila correspondente. Um agente

reductor, tal como um sal de bissulfito (tal como, por ex., o bissulfito de sódio), o sulfeto dimetílico, cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN), boroidreto de sódio (NaBH_4), triacetoxiboroidreto de potássio ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), borano de morfolina, triisopropoxiboroidreto de potássio, borano de t-butil amina, borano de dimetilamina, borano de piridina, borano de trietilamina, ou borano de trimetilamina, é útil para este propósito. Em alguns exemplos específicos, o agente reductor é um sal de bissulfito, e em exemplos mais particulares, o agente reductor é o bissulfito de sódio.

A quantidade de agente reductor adicionada à reação não é crucial desde que os agentes oxidantes sejam abafados. Se a imunogenicidade da cardiolipina oxidada for afetada prejudicialmente por oxidação em uma cetona dos grupos β -hidroxila das funções orgânicas glicerol central da cardiolipina, então a quantidade de agente reductor será também uma quantidade que irá restaurar os grupos β -hidroxila para uma imunogenicidade suficiente da cardiolipina oxidada. Por exemplo, uma quantidade de bissulfito de sódio pode ser adicionada a uma reação de oxidação de cardiolipina contendo agentes oxidantes de NaIO_4 e KMnO_4 suficientes para fazer com que a mistura da reação se torne substancialmente incolor.

Caso presentes, as fases aquosas e orgânicas em uma reação de oxidação de cardiolipina podem ser separadas por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por centrifugação. Em uma modalidade, uma fase de t-butanol contendo principalmente cardiolipina oxidada e uma fase aquosa contendo principalmente carboxilatos alquílicos podem ser separadas por centrifugação. A cardiolipina oxidada é suficientemente hidrofóbica para que se espere que ela se separe em uma fase orgânica. Contudo, caso necessário, um técnico no assunto pode determinar qual dentre as fases aquosa ou orgânica (ou ambas) contém cardiolipina oxidada por métodos conhecidos na técnica, tal como CCD, HPLC, RMN ou cromatografia com gás.

Opcionalmente, a cardiolipina oxidada na solução pode ser dialisada em um tampão útil, tal como um tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, e liofilizada até secar utilizando-se métodos bem conhecidos na técnica.

C – Antigenicidade da Cardiolipina Oxidada

Foi demonstrado que a oxidação altera as propriedades antigênicas, de alguns fosfolipídios (ver, por ex., US 6.177.282). Acredita-se que os anticorpos anti-lipídicos de pacientes sífilíticos ligam os dois grupos fosfato e o grupo β -hidroxila da função orgânica glicerol central (ver, por ex., Castro e outros, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(4):658-661, 2000). Portanto, é benéfico manter a configuração da função orgânica glicerol central para conservar a antigenicidade da cardiolipina, por exemplo, para detectar anticorpos anti-lipídicos em soros sífilíticos. A antigenicidade da cardiolipina oxidada pode ser testada por qualquer uma dentre um número de técnicas amplamente utilizadas (incluindo, por ex., ELISA, *dot blot*, imuno-ensaio enzimático, imuno-ensaio de fluorescência) e/ou como descrito aqui (ver, por ex., o Exemplo 4). Como mostrado no Exemplo 4 (abaixo), os métodos de oxidação de cardiolipina descritos aqui mantêm a antigenicidade da cardiolipina.

D – Misturas de Cardiolipina/Lecitina

As misturas de cardiolipina e lecitina podem ser oxidadas pelos mesmos métodos descritos acima somente para a cardiolipina; a única diferença sendo em que o material inicial é uma mistura de cardiolipina e lecitina. Na reação de oxidação inicial, a cardiolipina e a lecitina são misturadas juntas em uma razão de peso (cardiolipina:lecitina) entre aproximadamente 20:1 e aproximadamente 1:1, ou entre aproximadamente 1:1 e aproximadamente 1:10, ou entre aproximadamente 10:1 e aproximadamente 1:10, ou entre aproximadamente 5:1 e aproximadamente 1:5, ou entre aproximadamente 1:1 e aproximadamente 1:5. Em exemplos particulares, a razão de peso de cardiolipina:lecitina inclui aproximadamente 20:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:5, ou aproximadamente 1:10.

V – Complexo de Moléculas de Ligação de Cardiolipina Oxidada

A cardiolipina oxidada é uma molécula relativamente pequena. Portanto, é benéfico ligar a cardiolipina oxidada a uma molécula maior (tal como um polipeptídeo) para facilitar a ligação da cardiolipina a uma superfície sólida.

para uso nos métodos e dispositivos descritos aqui. Em certos exemplos, a molécula maior é mais prontamente ligada a um substrato, tal como um substrato absorvente do tipo que é utilizado na tecnologia de fluxo direto ou de fluxo lateral. A cardiolipina oxidada derivada é mais prontamente adsorvida e localizada em um suporte poroso (tal como um substrato poroso de nitro-celulose) do que a própria molécula muito pequena da cardiolipina ou da cardiolipina oxidada. A derivação da cardiolipina oxidada por ligação a uma função orgânica de polipeptídios a ela aumenta vastamente sua versatilidade e utilidade em imuno-ensaios baseados em superfícies sólidas, (tais como os ELISAs, fitas e/ou dispositivos de diagnóstico de fluxo lateral, e/ou dispositivos de fluxo direto).

Moléculas de ligação adequadas incluem proteínas, polipeptídios ou peptídeos, tais como a albumina, hemocianina, tiroglobulina e derivados destas, particularmente a albumina de soro bovino (ASB) e a Hemocianina da família *Fissurellidae* (HFF), a avidina, estreptavidina, e a biotina. Outras substâncias derivadas de polipeptídios ou não derivadas de polipeptídios são conhecidas pelos versados no assunto.

As moléculas de ligação freqüentemente contêm um grupo reativo para facilitar a conjugação covalente à cardiolipina oxidada. O grupo amina de aminoácidos pode ser utilizado desta maneira. As moléculas de ligação que não têm tais grupos podem ser freqüentemente reagidas com um composto químico apropriado para produzir grupos reativos. Compostos químicos ilustrativos que podem ser utilizados para produzir grupos reativos úteis em uma molécula de ligação incluem, sem limitação, 1-etil-3-(3-dimetilamino propil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisulfosuccinimida (NHS).

A provisão da cardiolipina oxidada aqui fornece ao menos um grupo carboxila reativo, que não está de outra forma presente nas cardiolipinas de ocorrência natural ou sintéticas. Portanto, a cardiolipina oxidada pode ser ligada através de um grupo reativo criado por oxidação a uma molécula de ligação por quaisquer meios conhecidos na técnica e/ou descritos aqui. Tal ligação pode ser com ou sem um grupo de ligação adicional. Muitos métodos diferentes podem

ser utilizados para produzir uma ligação entre a cardiolipina oxidada e uma molécula de ligação.

Um exemplo de método que pode ser utilizado para ligar cardiolipina oxidada a uma molécula de ligação contendo amina (ou seja, uma proteína, tal como a ASB, proteína sintética MAPS, IgY, estreptavidina, avidina ou HFF) é mostrado esquematicamente na Fig. 4. A reação na Fig. 4 ilustra que um grupo carboxila criado pela clivagem oxidativa de uma cadeia lateral de ácidos graxos de cardiolipina, como descrito aqui, pode ser modificado para um éster de NHS reativo com aminas utilizando-se EDC em combinação com NHS (ou Sulfo-NHS, como mostrado na Fig. 4). O éster de NHS de cardiolipina oxidada irá então reagir com os grupos amina presentes em uma molécula de ligação, tal como a ASB, como mostrado na Fig. 4, para formar uma ligação de amina entre a cardiolipina oxidada e a molécula de ligação.

Algumas dos métodos e dispositivos aqui fazem uso de cardiolipina oxidada ou de complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada imobilizados em fases sólidas. Qualquer método convencional de imobilização de uma substância em uma superfície sólida é previsto nesta divulgação.

Métodos adequados para imobilizar cardiolipina oxidada ou complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada em fases sólidas incluem as interações iônicas, hidrofóbicas, covalentes, e outras. A fase sólida (ver, por ex., a Seção II) pode ser escolhida por sua capacidade intrínseca de atrair e imobilizar cardiolipina oxidada ou complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada. Alternativamente, a fase sólida pode possuir um fator que tenha a capacidade de atrair e imobilizar a cardiolipina oxidada ou os complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada. O fator pode incluir, por exemplo, uma substância carregada que seja opostamente carregada em relação à cardiolipina oxidada ou aos complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada, ou, por exemplo, uma substância carregada que seja opostamente carregada em relação a uma substância carregada conjugada com a cardiolipina oxidada ou com os complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada. Como mais uma alternativa, o fator pode ser qualquer parceiro de ligação específico, como, por exemplo, a avidina ou a estreptavidina, que seja

imobilizado sobre a fase sólida e que tenha a capacidade de imobilizar cardiolipina oxidada ou complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada, como, por exemplo, cardiolipina oxidada biotinilada, através de uma reação de ligação específica.

5 Em algumas modalidades de métodos e dispositivos aqui, a cardiolipina oxidada ou os complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada podem servir como um reagente detector, e portanto será conjugada a um marcador. Qualquer molécula ou composição que seja detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, elétricos, ópticos
10 ou químicos pode servir como um marcador. Exemplos de marcadores, incluindo enzimas, partículas de ouro coloidais, partículas de látex coloridas, foram revelados (Patentes US N^{os}. 4.275.149, 4.313.734, 4.373.932 e 4.954.452, cada uma delas aqui incorporada como referência). Exemplos adicionais de marcadores úteis incluem, sem limitação, co-fatores, ligandos, agentes
15 quimioluminescentes ou fluorescentes, partículas de prata adsorvidas por proteína, partículas de ferro adsorvidas por proteína, partículas de cobre adsorvidas por proteína, partículas de selênio adsorvidas por proteína, partículas de enxofre adsorvidas por proteína, partículas de telúrio adsorvidas por proteína, partículas de carbono adsorvidas por proteína, e sacos de tinta acoplados com
20 proteínas.

 A ligação de um composto a um marcador pode ser através de ligações covalentes, processos de adsorção, ligações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas, como em quelatos e outros, ou combinações destas ligações e interações, e/ou podem envolver um grupo de ligação. Métodos para marcar e
25 orientações sobre a escolha dos marcadores apropriados para vários propósitos são discutidas, por exemplo, em Sambrook e outros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, Nova York, 1989 e Ausubel e outros, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. e Wiley-Intersciences, 1998.

30 Em algumas modalidades dos métodos e dispositivos, conjugados de ouro coloidais de cardiolipina oxidada ou conjugados de ouro coloidais de complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada são previstos.

VI – Dispositivos de Imuno-Ensaios

A descoberta aqui de um método para oxidar cardiolipina e preparar conjugados de moléculas de ligação de cardiolipina, que possam ser imobilizados em um suporte sólido (tal como uma membrana micro-porosa, como a nitro-celulose, o nylon ou o PVDF), permite imuno-ensaios baseados em superfícies sólidas (tais como o EIA, ELISA, dispositivos de fluxo direto, hastes de mergulho, e dispositivos de fluxo lateral) para a detecção de analitos que ligam cardiolipina (tais como anticorpos anti-lipídicos em amostras biológicas de sujeitos infectados com a *T. pallidum*). Em alguns exemplos, um imuno-ensaio revelado permite a detecção da presença (ou ausência) de anticorpos anti-lipídicos em uma amostra biológica para o diagnóstico da sífilis.

A – Formatos de Dispositivos de Imuno-Ensaio Representativos e Informações Relacionadas

Os dispositivos de imuno-ensaio permitem a realização de ensaios relativamente baratos, descartáveis, e baseados em membranas para a identificação visual da presença (ou ausência) de um analito em uma amostra líquida. Tais dispositivos são usualmente formatados como hastes de mergulho independentes (por ex., fitas de teste) ou como dispositivos que tenham algumas espécies de caixa. Tipicamente, um dispositivo de imuno-ensaios pode ser utilizado mesmo com poucos 200 µl de amostra líquida, e a detecção de um analito na amostra pode (mas não precisa) ser completada dentro de 2 a 5 minutos. Em ensaios clínicos, a amostra pode ser urina, sangue, soro, saliva, ou outros fluidos. Em testes não-clínicos, a amostra pode ser um pequeno volume de solução preparado a partir de terra, poeira, plantas, ou alimentos, e aplicada de forma semelhante diretamente à fita do teste de membrana. Na maior parte dos casos, uma instrumentação auxiliar é necessária para realizar tais testes, e tais dispositivos podem ser facilmente utilizados em clínicas, laboratórios, locais abertos, e em casa, até mesmo por pessoas sem experiência.

Os dispositivos de imuno-ensaios foram desenvolvidos para a identificação ou a monitoração rotineira de condições fisiológicas e patológicas (por ex., doenças infecciosas, gravidez, câncer, males endócrinos) utilizando-se amostras biológicas diferentes (por ex., urina, soro, plasma, sangue, saliva), e

para a análise de amostras ambientais (por ex., fluidos naturais e efluentes de fábricas industriais), por exemplo, quanto à contaminação. Muitos desses testes são baseados nas interações altamente específicas entre pares de ligação específicos. Exemplos de tais pares de ligação incluem antígeno/anticorpo, 5 hapteno/anticorpo, lectina/carboidrato, apoproteína/co-fator e biotina/(estrept)avidina. Além disso, muitos desses testes envolvem dispositivos (por ex., fase sólida, fitas de teste de fluxo lateral, testes de fluxo direto) com um ou mais dos membros de um par de ligação ligado a um material de fase sólida móvel ou imóvel, tal como contas de látex, fibras de vidro, contas de vidro, fitas 10 de celulose ou membranas de nitro-celulose (Patentes US N^os. 4.703.017, 4.743.560, 5.073.484).

Uma categoria importante de ensaio imunocromatográfico é o ensaio “sanduíche”. Geralmente, os procedimentos imunocromatográficos sanduíche requerem a mistura da amostra que possa conter a analito a ser testado, 15 como, por exemplo, anticorpos anti-lipídicos, com um antígeno reconhecido pelo analito, como, por exemplo, cardiolipina oxidada. O antígeno, isto é, o reagente detector, é móvel e tipicamente está ligado a um marcador ou a um outro reagente sinalizador, tal como látex com tinta, uma solução de metal coloidal, ou um radioisótopo. Esta mistura é então aplicada a um meio cromatográfico 20 contendo uma faixa ou zona de antígenos imobilizados reconhecidos pelo anticorpo analito de interesse. O meio cromatográfico freqüentemente está na forma de uma fita que parece uma haste de mergulho. Quando o complexo da molécula a ser examinada e o reagente detector atinge a zona dos antígenos imobilizados no meio cromatográfico, a ligação ocorre e o complexo de reagente 25 detector fica localizado na zona. Isso indica a presença da molécula a ser testada. Esta técnica pode ser utilizada para obter resultados quantitativos ou semi-quantitativos.

Alternativamente, um imuno-ensaio sanduíche pode requerer a mistura de uma amostra, que pode conter o analito de interesse como, por 30 exemplo, anticorpos anti-lipídicos, com um anticorpo que reconheça o analito, como, por exemplo, a proteína A ou um anticorpo secundário anti-humano de cabra. O segundo anticorpo nessa mistura será móvel, marcado (por ex., com

uma enzima, ouro colóide, ou outros), e servirá como um reagente detector. Como descrito no exemplo anterior de um imuno-ensaio sanduíche, o analito testado (caso presente) pode ser detectado quando essa mistura for aplicada a um meio cromatográfico contendo uma faixa ou zona de antígenos imobilizados reconhecidos pelo testado.

Exemplos de imuno-ensaios sanduíche realizados em fitas de teste são descritos nas Patentes US N^os. 4.168.146 e 4.366.241, cada uma das quais sendo aqui incorporada como referência.

Os dispositivos de imuno-ensaios de fase sólida oferecem uma sensível detecção de analitos em amostras de fluidos biológicos. Os dispositivos de imuno-ensaios de fase sólida incorporam um suporte sólido ao qual um membro de par ligando-receptor, usualmente um anticorpo, antígeno, ou hapteno, se liga. As primeiras formas comuns de suportes sólidos eram placas, tubos, ou contas de poliestireno, que eram conhecidas a partir do campo dos radio-imuno-ensaios e dos imuno-ensaios de enzima. Mais recentemente, um número de materiais porosos, tais como o nylon, a nitro-celulose, acetato de celulose, fibras de vidro, e outros polímeros porosos foi empregado como suportes sólidos. Em outras formas comuns de imuno-ensaios baseados em membrana, como tipificado por alguns kits de detecção de gravidez e ovulação, uma fita de teste (ou uma haste de mergulho) é "mergulhada" dentro de uma amostra suspeita de conter o analito em questão. Adiciona-se então reagente detector marcado com enzima, simultaneamente ou após um período de incubação. O dispositivo em seguida é lavado e então inserido dentro de uma segunda solução contendo um substrato para a enzima. O marcador de enzima, caso presente, interage com o substrato, causando a formação de produtos coloridos, os quais, ou se depositam como um precipitado por sobre a fase sólida, ou produzem uma mudança de cor visível na solução de substrato. EP-A 0 125 118 descreve tal imuno-ensaio de haste de mergulho do tipo sanduíche. EP-A 0 282 192 descreve um dispositivo de haste de mergulho para uso em ensaios do tipo competição.

Os dispositivos de imuno-ensaios do tipo fluxo direto foram projetados, em parte, para obviar a necessidade das etapas de incubação e lavagem com ensaios de hastes de mergulho. Os dispositivos de imuno-ensaios

de fluxo direto envolvem um reagente de captura (tal como um complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada) ligado a uma membrana ou filtro poroso ao qual uma amostra líquida é adicionada.

À medida que o líquido flui através da membrana, o analito visado (tal como um anticorpo anti-lipídico) se liga ao reagente de captura. A adição de amostra é seguida por (ou feita simultaneamente com) a adição de reagente detector (tal como cardiolipina conjugada com ouro, Proteína A marcada (por ex., conjugada com ouro) ou IgG anti-humana marcada (por ex., conjugada com ouro)). Alternativamente, o reagente detector pode ser colocado sobre a membrana de uma maneira que permita que o detector se misture com a amostra e assim marque o analito. A detecção visual de reagente detector fornece uma indicação da presença do analito visado na amostra. Dispositivos de imuno-ensaios de fluxo direto representativos são descritos nas Patentes US N^{os}. 4.246.339, 4.277.560, 4.632.901, 4.812.293, 4.920.046, e 5.279.935; e os pedidos de patente US N^{os}. 20030049857 e 200240241876.

Os dispositivos de ensaios de migração usualmente incorporam dentro deles reagentes que possam ser ligados a marcadores coloridos, desta forma permitindo a detecção visual dos resultados do ensaio sem a adição de mais substâncias. Ver, por exemplo, a Patente US N^o. 4.770.853; a Publicação do PCT N^o. WO 88/08534 e a Patente Européia No. EP-A 0 299 428.

Existe um número de testes do tipo fluxo lateral disponíveis comercialmente e de patentes que revelam métodos para a detecção de analitos grandes (PM maior do que 1.000 Daltons). A Patente US N^o. 5.229.073 descreve um método de fluxo lateral de imuno-ensaio competitivo semi-quantitativo para medir níveis de lipoproteínas no plasma. Esse método utiliza uma pluralidade de zonas de captura ou linhas contendo anticorpos imobilizados para ligar tanto a lipoproteína marcada como a livre para dar um resultado semi-quantitativo.

A Patente US N^o. 5.591.645 fornece uma fita de teste cromatográfica com ao menos duas porções. A primeira porção inclui um traçador móvel e a segunda porção inclui um ligante imobilizado capaz de se ligar ao analito. Exemplos adicionais de testes de fluxo lateral para analitos grandes são divulgados nos seguintes documentos de patente: Patentes US N^{os}.

4.168.146, 4.366.241, 4.855.240, 4.861.711, e 5.120.643; Patente Européia N°. 0296724; WO 97/06439, e WO 98/36278.

Existem também testes do tipo fluxo lateral para a detecção de analitos pequenos (PM de 100 a 1.000 Daltons). Geralmente, esses testes de analitos pequenos envolvem uma inibição competitiva “típica” para produzir resultados negativos ou indiretos (isto é, redução de sinal com o aumento da concentração de analito), conforme exemplificado pela Patente US N°. 4.703.017. Contudo, diversas abordagens foram desenvolvidas para detectar pequenos analitos utilizando testes de fluxo lateral que produzem resultados positivos ou diretos (isto é, aumento no sinal com o aumento da concentração do analito). Estas incluem, por exemplo, as Patentes US N°. 5.451.504, 5.451.507, 5.798.273 e 6.001.658.

A Patente US N°. 5.451.504 fornece um método com três zonas específicas (mobilização, aprisionamento e detecção), cada uma contendo um conjugado de látex diferente para dar um sinal positivo. A zona de mobilização contém anticorpo marcado para ligar o analito na amostra. Na zona de aprisionamento, o anticorpo não-ligado e marcado é então aprisionado por análogos de analito imobilizados. A zona de detecção captura o complexo de analito-anticorpos marcado.

A Patente US N°. 5.451.507 descreve um método de imuno-ensaio desconectado, com duas zonas. A primeira zona possui reagente ligado de forma não-difusa que se liga com um componente, por exemplo, um análogo de analito ligado a, ou capaz de se tornar ligado a, um membro de um sistema de produção de sinais. A segunda zona se liga ao componente somente quando o analito a ser testado estiver presente. A distância que o componente migra para dentro da segunda zona está diretamente relacionada à concentração de analito.

A Patente US N°. 5.798.273 revela um dispositivo de fluxo lateral que inclui uma zona de captura com análogos de analito imobilizados e uma ou mais zonas de leitura para ligar análogos de analito marcados.

A Patente US N°. 6.001.658 divulga um dispositivo de fita de teste, com um parceiro de ligação passível de difusão marcado que se liga ao analito,

um analito imobilizado, e uma área de detecção contendo um anticorpo imobilizado.

Os dispositivos descritos aqui geralmente incluem uma fita de material absorvente (tal como uma membrana micro-porosa), que, em muitos casos, pode ser feita de diferentes substâncias, sendo cada uma delas junta à outra em zonas, que podem estar encostadas e/ou sobrepostas. Em alguns exemplos, a fita absorvente pode ser fixada sobre um material não-interativo de suporte (tal como poliéster não-trançado) para, por exemplo, conferir uma rigidez aumentada à fita. As zonas dentro de cada fita podem conter diferencialmente o(s) parceiro(s) de ligação específico(s) e/ou outros reagentes necessários para a detecção e/ou a quantificação do analito particular sendo testado, por exemplo, quanto a um anticorpo anti-lipídico. Assim, essas zonas podem ser vistas como setores funcionais ou regiões funcionais dentro do dispositivo de teste.

Em geral, uma amostra fluida (ou uma amostra suspensa em um fluido) é introduzida à fita na extremidade proximal da fita, por exemplo, por imersão ou marcação. Uma amostra é coletada ou obtida utilizando-se métodos bem conhecidos pelos técnicos no assunto. A amostra contendo os anticorpos anti-lipídicos a ser detectada pode ser obtida a partir de qualquer fonte biológica. Exemplos de fontes biológicas incluem o soro sanguíneo, plasma sanguíneo, urina, fluido espinhal, saliva, fluido de fermentação, fluido linfático, fluido de cultura de tecidos, e fluido de ascites de um ser humano ou de um animal. A amostra pode ser diluída, purificada, concentrada, filtrada, dissolvida, suspensa ou manipulada de outras formas antes do imuno-ensaio para aperfeiçoar os resultados do imuno-ensaio. O fluido migra distalmente através de todas as regiões funcionais da fita. A distribuição final do fluido nas regiões funcionais individuais depende da capacidade de absorção e das dimensões do material utilizado.

Em algumas modalidades, os suportes sólidos porosos, tais como a nitro-celulose, descritos aqui acima, estão preferivelmente na forma de lâminas ou de fitas. A espessura de tais lâminas ou fitas pode variar dentro de amplos limites, por exemplo, desde aproximadamente 0,01 até 0,5 mm; desde aproximadamente 0,02 até 0,45 mm; desde aproximadamente 0,05 até 0,3 mm;

desde aproximadamente 0,075 até 0,25 mm; desde aproximadamente 0,1 até 0,2 mm; ou desde aproximadamente 0,11 até 0,15 mm. O tamanho dos poros de tais lâminas ou fitas pode de forma semelhante variar dentro de amplos limites, por exemplo, de aproximadamente 0,025 até aproximadamente 15 microns, ou mais especificamente de aproximadamente 0,1 até 3 microns; contudo, o tamanho dos poros não deve ser um fator limitativo na seleção do suporte sólido. A taxa de fluxo de um suporte sólido, quando cabível, também pode variar dentro de amplos limites, por exemplo, de aproximadamente 12,5 até 90 seg/cm (isto é, de aproximadamente 50 até 300 seg / 4 cm), de aproximadamente 22,5 até 62,5 seg/cm (isto é, de aproximadamente 90 até 250 seg / 4 cm), de aproximadamente 25 até 62,5 seg/cm (isto é, de aproximadamente 100 até 250 seg / 4 cm), de aproximadamente 37,5 até 62,5 seg/cm (isto é, de aproximadamente 150 até 250 seg / 4 cm), ou de aproximadamente 50 até 62,5 seg/cm (isto é, de aproximadamente 200 até 250 seg / 4 cm). Em modalidades específicas de dispositivos descritas aqui, a taxa de fluxo é de aproximadamente 62,5 seg/cm (isto é, 250 seg / 4 cm). Em outras modalidades específicas de dispositivos descritas aqui, a taxa de fluxo é de aproximadamente 37,5 seg/cm (isto é, 150 seg / 4 cm).

Um outro aspecto comum a ser considerado no uso de dispositivos de imuno-ensaios é um meio para detectar a formação de um complexo entre um analito (tal como um anticorpo anti-lipídico) e um reagente de captura (tal como complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada). Um detector (também referido como reagente detector) cumpre este propósito. Um detector pode ser integrado dentro de um dispositivo de imuno-ensaios (por exemplo, incluído em uma camada de conjugado, como descrito abaixo), ou pode ser aplicado ao dispositivo a partir de uma fonte externa.

Um detector pode ser um único reagente ou uma série de reagentes que servem coletivamente para o propósito de detecção. Em alguns casos, um reagente detector é um parceiro de ligação marcado específico para o analito (tal como Proteína A conjugada com ouro para um analito de anticorpos, ou Ab(Fc) anti-humano marcado com ouro para um analito de um anticorpo humano, ou cardiolipina oxidada marcada com ouro para um analito de anticorpos anti-

- lipídico). Em outros casos, um reagente detector inclui coletivamente um primeiro parceiro de ligação não-marcado específico para o analito e um segundo parceiro de ligação marcado específico para o primeiro parceiro de ligação, e assim por diante. Em cada caso, um reagente detector detecta especificamente o analito ligado de um complexo de reagente de captura de analito e, conseqüentemente, um reagente detector preferivelmente não se liga substancialmente ou reage com o reagente de captura ou com outros componentes localizados na área de captura de analito. Tal ligação ou reação não-específica de um detector pode fornecer um resultado positivo falso.
- 5 Opcionalmente, um reagente detector pode especificamente reconhecer uma molécula de controle positivo (tal como uma IgG humana não-específica para um detector de Proteína A marcado, ou um detector de Proteína G marcado, ou um Ab(Fc)) anti-humano que esteja presente na área de captura secundária.

B – Construção e Projeto de Dispositivo de Fluxo Direto

- 15 Um dispositivo de fluxo direto envolve um reagente de captura (tal como um complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada) imobilizado sobre um suporte sólido, tipicamente, uma placa de micro-titulação ou uma membrana (tal como de nitrocelulose, nylon, PVDF). As características das membranas úteis já foram descritas anteriormente; contudo, é útil notar que
- 20 em um ensaio de fluxo direto, a ascensão capilar não é um aspecto particularmente importante de uma membrana na medida em que a amostra se movimenta verticalmente através da membrana ao invés de através dela como em um ensaio de fluxo lateral. Em um formato representativo simples, a membrana de um dispositivo de fluxo direto é colocada em contato funcional ou físico com
- 25 uma camada absorvente (ver, por ex., a descrição de “camada absorvente” abaixo), que atua como um reservatório para conduzir uma amostra líquida através da membrana. Opcionalmente, em seguida à imobilização de um reagente de captura, quaisquer locais de ligação de proteínas restantes na membrana podem ser bloqueados (seja anterior ou simultaneamente à administração da
- 30 amostra) para minimizar as interações não-específicas.

Na operação de um dispositivo de fluxo direto, uma amostra fluida (tal como uma amostra de fluido corporal) é colocada em contato com a

membrana. Tipicamente, um dispositivo de fluxo direto também inclui uma área de aplicação de amostra (ou reservatório) para receber e temporariamente reter uma amostra fluida de um volume desejado. A amostra passa através da matriz de membrana. Nesse processo, um analito na amostra (tal como um anticorpo anti-lipídico) pode se ligar especificamente ao reagente de captura imobilizado (tal como um complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada). Quando a detecção de um complexo de reagente de captura/analito for desejada, um reagente detector (tal como a Proteína A marcada, a Proteína G marcada, a IgG anti-humana marcada, ou cardiolipina marcada) pode ser adicionado com a amostra, ou uma solução contendo um reagente detector pode ser adicionada subsequentemente à aplicação da amostra. Se um analito for especificamente ligado pelo reagente de captura, uma representação visual atribuível ao reagente detector particular pode ser observada sobre a superfície da membrana. Etapas de lavagem opcionais podem ser adicionadas a qualquer momento durante o processo, por exemplo, em seguida à aplicação da amostra, e/ou em seguida à aplicação de um reagente detector.

C – Construção e Projeto de Dispositivo de Fluxo Lateral

Dispositivos de fluxo lateral são comumente conhecidos na técnica. Em breve síntese, um dispositivo de fluxo lateral é um dispositivo analítico que têm como sua essência uma fita de teste, através da qual flui um fluido de amostra teste que se suspeita conter um analito de interesse. O fluido teste e qualquer analito suspenso pode fluir ao longo da fita para uma zona de detecção na qual o analito (caso presente) interage com um agente de captura e um agente de detecção para indicar a presença, ausência e/ou quantidade do analito.

Numerosos dispositivos analíticos de fluxo lateral foram divulgados, e incluem aqueles mostrados nas Patentes US N^{os}. 4.313.734, 4.435.504, 4.775.636, 4.703.017, 4.740.468, 4.806.311, 4.806.312, 4.861.711, 4.855.240, 4.857.453, 4.943.522, 4.945.042, 4.496.654, 5.001.049, 5.075.078, 5.126.241, 5.451.504, 5.424.193, 5.712.172, 6.555.390, e 6.368.876; EP 0810436; e WO 94/01775, WO 95/16207, e WO 97/06439, cada uma das quais sendo incorporada como referência.

Muitos dispositivos de fluxo lateral são ensaios de fluxo lateral de uma única etapa em que um fluido biológico é colocado em uma área de amostra sobre uma fita absorvente (embora materiais não absorventes possam ser utilizados e tornados absorventes, por ex., através da aplicação de um surfactante ao material), e deixado a migrar ao longo da fita até que o líquido entre em contato com um parceiro de ligação específico que interaja com um analito no líquido. Uma vez que o analito interaje com o parceiro de ligação, um sinal (tal como uma tinta fluorescente ou visível de alguma outra forma) indica que a interação ocorreu. Múltiplos parceiros de ligação discretos podem ser colocados sobre a fita (por exemplo, em linhas paralelas) para detectar múltiplos analitos no líquido. As fitas de teste podem também incorporar indicadores de controle, que fornecem um sinal de que o teste foi adequadamente realizado, mesmo se um sinal positivo indicando a presença (ou a ausência) de um analito não seja visto na fita.

A construção e concepção de dispositivos de fluxo lateral são muito bem conhecidas na técnica, conforme descrito, por exemplo, em Milipore Corporation, *A Short Guide Developing Immunochromatographic Test Strips*, 2ª Edição, pgs. 1 a 40, 1999, disponível para encomenda através de (800) 645-5476; e Schleicher & Schuell, *Easy to Work with Bioscience, Products and Protocols* 2003, pgs. 73 a 98, 2003, disponível para encomenda pela Schleicher & Schuell Bioscience, Inc., 10 Optical Avenue, Keene, NH 03431, EUA, (603) 352-3810; ambos os quais sendo aqui incorporados como referências.

Os dispositivos de fluxo lateral têm uma ampla variedade de formatos físicos que são igualmente bem conhecidos na técnica. Qualquer formato físico que suporte e/ou envolva os componentes básicos de um dispositivo de fluxo lateral na relação de funcionamento apropriada está previsto por esta divulgação. A Fig. 6 mostra diversos exemplos de dispositivos de fluxo lateral. Esses exemplos demonstram algumas das modalidades físicas que podem ser úteis na construção de um dispositivo de fluxo lateral.

Os componentes básicos de uma modalidade particular de um dispositivo de fluxo lateral são ilustrados na Fig. 7, que mostra uma modalidade particular na qual um envoltório alongado 10 contém uma fita de fluxo lateral

absorvente 12 que se estende substancialmente por todo o comprimento do envoltório 10. A fita de fluxo lateral 12 é dividida em uma camada de aplicação de amostra 14 posicionada abaixo de uma entrada de introdução de amostra 15, uma membrana de resultado de teste intermediário 16, e uma camada absorvente distal 18. A fita de fluxo 12 é interrompida por uma camada de conjugado 20 que contém conjugados marcados (tal como Proteína A conjugada com ouro, Proteína G conjugada com ouro, Ab anti-humano conjugado com ouro). Um caminho de fluxo ao longo da fita 12 passa da camada proximal 14, através da camada de conjugado 20, para dentro da membrana de resultado de teste 16, para a eventual coleta na camada absorvente 18. Agentes de ligação seletivos (tal como um complexo âncora de antígeno de anticorpos anti-lipídicos) são posicionados em uma linha de teste proximal 22 na membrana de resultado de teste 16. Uma linha de controle 24 é fornecida na membrana de resultado de teste 16 ligeiramente distal à linha de teste 22.

Na operação da modalidade particular de um dispositivo de fluxo lateral ilustrada na Fig. 7, uma amostra fluida contendo um analito de interesse, tal como um anticorpo anti-lipídico, é aplicada à camada de amostra 14 através da entrada de introdução de amostra 15. Em alguns exemplos, a amostra pode ser aplicada à entrada de introdução de amostra 15 em gotas, ou, preferivelmente, mergulhando-se a extremidade do dispositivo que contém a entrada de introdução de amostra 15 dentro da amostra. Em outros exemplos nos quais a amostra é sangue integral, um fluido desenvolvedor opcional é adicionado à amostra de sangue para causar a hemólise dos glóbulos vermelhos do sangue, e, em alguns casos, para se obter uma diluição apropriada da amostra de sangue integral. A partir da camada de amostra 14, a amostra passa, por exemplo, por ação capilar, para a camada de conjugado 20. Na amostra de conjugado 20, o analito de interesse pode se ligar (ou ser ligado a) um reagente detector móvel ou mobilizável. Por exemplo, um analito de anticorpos anti-lipídicos pode ser ligado a um reagente detector de cardiolipina conjugado com ouro ou Proteína A marcada (por ex., conjugada com ouro) contido na camada de conjugado. O analito complexado com o reagente detector pode subsequentemente fluir para a membrana de resultado de teste 16, onde o complexo pode interagir

adicionalmente com um parceiro de ligação de analito específico (tal como um complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada), o qual é imobilizado na linha de teste proximal 22. Em alguns exemplos, um anticorpo anti-lipídico complexado com um reagente detector (tal como cardiolipina conjugada com ouro, Proteína A marcada (por ex., conjugada com ouro), Proteína G marcada (por ex., conjugada com ouro), Ab anti-humana marcada (por ex., conjugada com ouro)) pode se ligar ainda a complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada na linha de teste proximal 22. A formação do imuno-complexo entre os anticorpos anti-lipídicos, o reagente detector marcado (por ex., conjugada com ouro), e o complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada pode ser detectada pelo surgimento de uma linha visível na linha de teste proximal 22, que resulta do acúmulo do marcador (por ex., o ouro) na região localizada na linha de teste proximal 22. A linha de controle 24 pode conter um parceiro de ligação de detector-reagente-específico imobilizado, que pode se ligar ao reagente detector na presença ou na ausência do analito. Tal ligação na linha de controle 24 indica o desempenho apropriado do teste, mesmo na ausência do analito de interesse.

Em uma outra modalidade de um dispositivo de fluxo lateral, pode haver uma segunda linha de teste localizada paralela ou perpendicularmente (ou em qualquer outra relação espacial) à linha de teste 22 na membrana de resultado de teste 16. A operação desta modalidade particular é semelhante à descrita no parágrafo imediatamente anterior com as considerações adicionais de que (i) um segundo reagente detector específico para um segundo analito, tal como um anticorpo anti-*T. pallidum*, ou um organismo ou antígeno da *T. pallidum*, pode também estar contido na camada de conjugado, e (ii) a segunda linha de teste irá conter um segundo parceiro de ligação específico que, tenha afinidade com um segundo analito na amostra. Por exemplo, a segunda linha de teste pode conter antígenos treponêmicos imobilizados que irão se ligar especificamente aos anticorpos anti-*T. pallidum* presentes na amostra, ou conter anticorpos anti-*T. pallidum* imobilizados que irão se ligar especificamente aos antígenos ou organismos presentes na amostra.

Alguns dos materiais que podem ser úteis para os componentes de um dispositivo de fluxo lateral são mostrados na Tabela 1. Contudo, um técnico

no assunto saberá que os materiais particulares utilizados em um dispositivo de fluxo lateral particular dependerão de um número de variáveis, incluindo, por exemplo, a analito a ser detectado, o volume da amostra, a taxa de fluxo desejada, e outros, e pode seleccionar rotineiramente os materiais úteis de forma

5 congruente.

Tabela 1

Componente	Materiais Úteis
Camada de Amostra	Fibra de vidro Fibras trançadas Tecido Fibras não-trançadas Filtros celulósicos Papel
Camada de Conjugado	Fibra de vidro Poliéster Papel Polipropileno com superfície modificada
Membrana	Nitro-celulose (incluindo a nitro-celulose pura e nitro-celulose modificada) Nitro-celulose posta diretamente sobre suporte de poliéster Fluoreto de polivinilideno Nylon
Camada Absorvente	Filtros celulósicos Papel

1 – Camada de Amostra

A camada de amostra (tal como a camada de amostra 14 na Fig. 7)

10 é um componente opcional de um dispositivo de fluxo lateral que inicialmente recebe a amostra, e pode servir para remover pequenas partículas da amostra. Dentre os vários materiais que podem ser utilizados para construir uma camada de amostra (ver Tabela 1), uma camada de amostra de celulose pode ser benéfica caso um volume de cama grande (por ex., 250 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) seja um fator em uma

15 aplicação particular. As camadas de amostra podem ser tratadas com um ou mais agentes de liberação, tais como tampões, sais, proteínas, detergentes e surfactantes. Tais agentes de liberação podem ser úteis, por exemplo, para

promover a re-solubilização dos constituintes da camada de conjugado, e para bloquear locais de ligação não-específicos em outros componentes de um dispositivo de fluxo lateral, tal como uma membrana de nitro-celulose. Agentes de liberação representativos incluem, por exemplo, a trealose ou a glicose (1% - 5%), PVP ou APV (0,5% - 2%), *Tween 20* ou *Triton X-100* (0,1% - 1%), caseína (1% - 2%), SDS (0,02% - 5%) e PEG (0,02 - 5%).

2 – Membrana e Solução de Aplicação

Os tipos de membrana úteis em um dispositivo de fluxo lateral (tal como a nitro-celulose, o nylon e o PVDF), e considerações quanto à aplicação de um reagente de captura para tais membranas foram discutidos anteriormente.

3 – Camada de conjugado

A camada de conjugado (tal como a camada de conjugado 20 na Fig. 7) serve para, dentre outras funções, segurar um reagente detector. Em algumas modalidades, um reagente detector pode ser aplicado externamente, por exemplo, a partir de uma garrafa de preparação, em cujo caso um dispositivo de fluxo lateral não precisa conter uma camada de conjugado (ver, por exemplo, a Patente US N°. 4.740.468).

O(s) reagente(s) detector(es) contidos em uma camada de conjugado é tipicamente liberado na solução após a aplicação da amostra teste. Uma camada de conjugado pode ser tratada com várias substâncias para influenciar a liberação do reagente detector em uma solução. Por exemplo, a camada de conjugado pode ser tratada com APV ou com PVP (0,5% a 2%) e/ou com *Triton X-100* (0,5%). Outros agentes de liberação incluem, sem limitação, hidroxipropilmetil celulose, SDS, Brij e β -lactose. Uma mistura de dois ou mais agentes de liberação pode ser utilizada em qualquer dada aplicação. Na modalidade particular revelada, o reagente detector na camada conjugada 20 é cardiolipina oxidada conjugada com ouro, Proteína A marcada, Proteína G marcada, ou IgG anti-humana marcada.

4 – Camada Absorvente

O uso de uma camada absorvente 18 em um dispositivo de fluxo lateral é opcional. A camada absorvente atua aumentando o volume total da amostra que entra no dispositivo. Esse volume aumentado pode ser útil, por

exemplo, para remover analitos não-ligados da membrana. Qualquer um dentre uma variedade de materiais é útil para preparar uma camada absorvente; ver, por ex., a Tabela 1. Em algumas modalidades do dispositivo, uma camada absorvente pode ser de papel (isto é, de fibras celulósicas). Os versados no assunto podem

5 seleccionar uma camada absorvente de papel com base em, por exemplo, sua espessura, compressibilidade, viabilidade de fabricação, e uniformidade do volume de cama. A retenção de volume de um absorvente pode ser ajustada mudando-se as dimensões (geralmente o comprimento) de uma camada absorvente.

10 ***D – Placas de Micro-titulação Revestidas com Antígeno***

Outros imuno-ensaios baseados em superfícies sólidas comuns são as várias formas de ensaios imuno-absorvente, tal como o ensaio imuno-absorvente de ligação enzimática (ELISA). Esses ensaios tipicamente envolvem

15 antígenos (por ex., complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada) aplicados nos vasos de uma placa de micro-titulação. Nesse ensaio, uma amostra teste (por ex., soro ou sangue) potencialmente contendo um analito de interesse (por ex., anticorpos anti-lipídicos) é colocada nos vasos de uma placa de micro-titulação que contenha um parceiro de ligação imobilizado (por ex., um

20 complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada) específico para o analito em questão. O analito liga especificamente o antígeno imobilizado; depois, os materiais não ligados são removidos por lavagem, deixando principalmente o complexo de analito-antígeno na placa. Este complexo pode ser detectado de várias maneiras, como foi descrito em detalhes acima. Uma

25 vantagem da placa de micro-titulação é que múltiplas amostras podem ser testadas simultaneamente (juntamente com controles), cada uma um ou mais vasos diferentes na mesma placa; permitindo, portanto, uma análise de alto rendimento com numerosas amostras.

E – Combinações de Antígenos

Cada um dos imuno-ensaios e/ou dispositivos de imuno-ensaio

30 discutidos aqui (por ex., ELISA, hastes de mergulho, dispositivo de fluxo direto ou dispositivo de fluxo lateral) pode ser, em algumas modalidades, formatado para detectar múltiplos analitos através da adição de reagentes de captura

específicos para os outros analitos de interesse (por ex., antígenos treponêmicos). Por exemplo, certos vasos de uma placa de micro-titulação podem incluir reagentes de captura específicos para os outros analitos de interesse. Algumas modalidades de dispositivo de imuno-ensaios podem incluir áreas de captura
 5 secundárias, terciárias, ou ainda mais áreas de captura contendo reagentes de captura específicos para os outros analitos de interesse.

Modalidades particulares envolvem dispositivos de imuno-ensaios que detectam ao mesmo tempo anticorpos anti-lipídicos e treponemas ou anticorpos anti-treponêmicos em amostras fluidas (tal como o soro humano). Tais
 10 dispositivos de combinação incluem ainda uma área de captura treponêmica que envolve (a) um antígeno treponêmico imobilizado capaz de ser ligado especificamente por um anticorpo anti-*T. pallidum*, ou (b) um anticorpo anti-*T. pallidum* imobilizado que ligue especificamente um antígeno treponêmico móvel. Como utilizado aqui, um "antígeno treponêmico" é um antígeno que contenha ao
 15 menos um determinante antigênico que ligue especificamente anticorpos anti-*T. pallidum*. Numerosos antígenos treponêmicos foram descritos sobre o assunto; ver, por exemplo, as Patentes US N^os. 6.479.248, 6.248.331, 5.681.934, 5.578.456, 4.868.118, e 4.740.467. Por exemplo, polipeptídeos com ao menos os seguintes pesos moleculares aparentes foram descritos como antígenos da *T.*
 20 *pallidum*: 16 a 20 KDa, 18 KDa, 18 a 23 KDa, 25 KDa, 35 KDa, 37 KDa, 37-46 KDa, 38 KDa, 39 KDa, 41 KDa, 43 KDa, 44 KDa, 46 KDa, 47 KDa, 58 KDa, 150 KDa, e 180 KDa (para detalhes mais específicos, ver a Patente US N^o. 4.846.118).

Os antígenos treponêmicos e os anticorpos anti-*T. pallidum* são
 25 polipeptídios; portanto, quando utilizados como reagentes de captura, essas moléculas podem aderir diretamente a um suporte sólido (tal como de nitrocelulose, nylon ou PVDF). Mesmo assim, é previsto que antígenos treponêmicos ou anticorpos anti-*T. pallidum* sejam imobilizados (direta ou indiretamente) sobre um suporte sólido por qualquer método disponível.

30 Um reagente detector pode ser utilizado para detectar a formação de um complexo entre um reagente de captura treponêmico e um analito de treponema específico (tal como um treponema, um antígeno treponêmico, ou um

anticorpo anti-treponêmico). Em algumas modalidades, um reagente detector (tal como uma Ab anti-humana) pode detectar especificamente um analito de treponema específico ligado (por ex., um anticorpo lipídico humano). Em outros casos, dois reagentes detectores separados para a detecção específica de um analito de treponema específico ligado (por ex., anticorpo anti-treponêmico ou antígeno treponêmico) ou de um analito de anticorpo anti-lipídico ligado são previstos.

A operação de um dispositivo de imuno-ensaio útil para realizar testes treponêmicos e não-treponêmicos concomitantes é substancialmente semelhante aos dispositivos descritos em outras partes deste relatório. Uma característica particular de um dispositivo de combinação é que uma amostra fluida aplicada em uma área de aplicação de amostra é capaz de entrar em contato (por ex., de fluir lateral ou fluir diretamente) cada uma dentre as áreas de captura de anticorpos anti-lipídicos e de captura treponêmica.

Outras modalidades de imuno-ensaios ou de dispositivos de imuno-ensaios envolvem combinações de antígenos contendo cardiolipina oxidada (por ex., complexo de molécula de ligação de cardiolipina oxidada) e outros antígenos específicos para anticorpos anti-lipídicos; por exemplo, antígenos lipídicos imobilizados compreendendo cardiolipina, lecitina e colesterol. A imobilização de antígenos lipídicos é descrita em detalhes em PCT/US2006/024117, que é incorporado aqui em sua totalidade como referência. Em um exemplo, um antígeno lipídico compreendendo cardiolipina (por ex., cardiolipina de ocorrência natural ou sintética), lecitina e colesterol, entra em contato com uma população de fragmentos Fab específicos para o antígeno lipídico para dar um complexo de antígenos-Fab lipídicos, sendo que este complexo é prontamente passível de ligação a um suporte sólido em combinação com os antígenos contendo cardiolipina oxidada.

VII – Kits

São aqui revelados kits para uso na detecção de anticorpos anti-lipídicos em uma amostra (tal como uma amostra biológica). Tais kits podem ser utilizados também, por exemplo, no diagnóstico de doenças em que a presença de anticorpos anti-lipídicos seja sintomática da doença (tal como a sífilis e o lúpus).

Certas modalidades dos kits revelados são geralmente portáteis e fornecem uma forma simples, rápida e/ou barata de detectar anticorpos anti-lipídicos e/ou diagnosticar doenças (tais como a sífilis) sem a necessidade de unidades de laboratório, tal como em uma unidade de atendimento local.

5 Os kits incluem um ou mais dispositivos de imuno-ensaios (e/ou placas de micro-titulação revestidas com antígenos) como revelados aqui, e um meio portador, tal como uma caixa, uma bolsa, um saco, um pacote plástico (tal como de plástico moldado ou outro empacotamento transparente), ou outro recipiente. Em alguns exemplos, os componentes do kit estarão embalados em
10 uma única unidade de empacotamento, tal como uma caixa ou outro recipiente, sendo que a unidade de empacotamento pode possuir compartimentos nos quais um ou mais componentes do kit possam ser colocados. E, outros exemplos, um kit inclui um ou mais recipientes, por exemplo, frascos, tubos, e similares que possam reter, por exemplo, uma ou mais amostras biológicas a serem testadas,
15 amostras de controle positivo e/ou negativo ou soluções (tais como um soro de controle positivo contendo anticorpos anti-lipídicos ou treponêmicos), diluentes (tais como tampões de fosfato, ou tampões salinos), reagentes detectores (por ex., para aplicação externa a um dispositivo do kit), reagentes de substrato para a visualização de enzimas de reagentes detectores (tais como a 5-bromo-4-cloro-3-
20 indolil fosfato, tetrazólio nitroazul em dimetil formamida), e/ou soluções de lavagem (tais como tampões Tris, tampões salinos ou água destilada).

Outras modalidades do kit incluem seringas, dispositivos de picada no dedo, cotonetes, gazes quadradas, bolas de algodão, curativos, luvas de látex, bandejas de incubação com números de espaço variáveis, vedações de placa
25 adesivas, folhas de relatório de dados, que podem ser úteis para o manuseio, a coleta e/ou o processamento de uma amostra biológica. Os kits podem também opcionalmente conter implementos úteis para a introdução de amostras em uma câmara de amostra de um dispositivo de imuno-ensaios, incluindo, por exemplo, pipetas, tubos capilares, lâmpadas de borracha (por ex., para tubos capilares), e
30 outros. Outras modalidades do kit podem ainda incluir meios de eliminação para descartar um dispositivo de imuno-ensaios usado e/ou outros itens usados com o dispositivo (tal como amostras do paciente, etc.). Tais meios de eliminação

incluem, sem limitação, recipientes que sejam capazes de reter o vazamento dos materiais descartados, tais como bolsas, caixas ou recipientes impermeáveis de plástico, metal, ou outras.

Em alguns exemplos, um *kit* revelado incluirá instruções para o uso de um dispositivo de imuno-ensaio ou de uma placa revestida com antígenos. As instruções podem fornecer orientação sobre como aplicar a amostra ao dispositivo de teste ou à placa, a quantidade de tempo necessária ou aconselhável para esperar que se desenvolvam os resultados, e detalhes sobre como ler e interpretar os resultados do teste. Tais instruções podem também conter padrões, tais como tabelas padronizadas, gráficos ou figuras para a comparação dos resultados de um teste. Esses padrões podem opcionalmente incluir a informação necessária para quantificar o analito utilizando-se o dispositivo de teste, tal como uma curva padrão relacionada à intensidade do sinal ou número de linhas do sinal para uma quantidade de analito assim presente na amostra.

15

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar certas características e/ou modalidades particulares. Esses exemplos não devem ser interpretados como se limitassem a invenção às características ou modalidades particulares descritas.

20

Exemplo 1

Oxidação de Cardiolipina

Este exemplo descreve a oxidação de ligações duplas nos ácidos graxos insaturados de cardiolipina não-modificada em grupos carboxila.

Aproximadamente 100 mg de cardiolipina liofilizada (Avanti Polar Liquids, Alabaster, AL, EUA) foram dissolvidos em 2 ml de t-butanol e colocados em um frasco sob uma atmosfera de argônio. Sessenta (60) mg de m-periodato de sódio (NaIO_4) foram dissolvidos em 600 μl de água destilada e adicionados em gotas à suspensão de cardiolipina com constante agitação. Logo em seguida, 8 mg de permanganato de potássio (KMnO_4), dissolvidos em 400 μl de água destilada, foram adicionados em gotas à mistura de reação de NaIO_4 sob constante agitação. A mistura mudou de cor (Fig. 1B) e foi deixada misturando-se por 24 a 48 horas na temperatura ambiente.

O grau de oxidação de cardiolipina foi determinado qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD). Aproximadamente 10 ml de uma solução de clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (61,9 : 30,9 : 7,1 por volume) foram colocados em um béquer de 100 ml.

- 5 Um papel de filtro dobrado foi posto dentro do béquer e deixado a tornar-se saturado com o solvente.

Um (1) μl da mistura de reação de $\text{NaIO}_4/\text{KMnO}_4$ e 1 μl de uma solução (controle) de cardiolipina 20mg/ml em t-butanol foram postos em 1 cm a partir da extremidade de uma fita de sílica gel de CCD de 7,5 cm x 2,5 cm. A fita
10 foi colocada de encontro ao filtro de papel dentro do béquer, e o solvente foi deixado migrando-se para o topo da fita.

Após a fita ser removida do solvente, ela foi deixada evaporando-se até secar. Após isso, a fita foi molhada por uma breve submersão em 50 ml de etanol 5% contendo ao menos 10 ml de azul de molibdênio (Spray Reagent;
15 Altech; Parte 18213). A fita foi secada por aquecimento com o auxílio de um secador de cabelos para desenvolver a mancha.

Após o término da oxidação de cardiolipina, a mistura de reação de $\text{NaIO}_4/\text{KMnO}_4$ foi interrompida pela adição de 80 mg de bissulfito de sódio em 200 μl de água destilada sob constante agitação. A mistura colorida então ficou
20 incolor (comparar Fig. 1B e Fig. 1C). A mistura da reação interrompida foi centrifugada a 1000 xg por 5 minutos. Após a centrifugação, havia duas fases visíveis (Fig. 1D).

Opcionalmente, a fase de t-butanol sobrenadante foi colocada em um frasco redondo de evaporação e secada sob vácuo. Alternativamente, a fase
25 de t-butanol pode ser dialisada contra tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, ou com outro tampão, para substituir o solvente de álcool com uma solução que seja adequada para o próximo uso pretendido da cardiolipina oxidada contida ali, por exemplo, para o uso em ensaios imunocromatográficos, ou, por exemplo, para conjugação em uma molécula de ligação.

30 Como mostrado na Fig. 2, a cardiolipina sem modificações migra principalmente para o topo de uma fita de CCD, conforme indicado na coluna A pela mancha escura mais distante do ponto da origem. A cardiolipina

compreende naturalmente uma população heterogênea de moléculas, como descrito na Seção IV. Como o ácido linóico compõe aproximadamente 90% das cadeias laterais de ácidos graxos na cardiolipina, as moléculas de cardiolina (e as formas intimamente relacionadas à cardiolipina) contendo predominantemente ácido linóico são provavelmente representadas pela mancha escura na Fig. 2, coluna A. As formas de cardiolipina menos representadas possuem provavelmente mobilidades diferentes e podem ser responsáveis pela leve mancha observada na coluna A na direção de migração.

Como descrito anteriormente, a oxidação de cardiolipina oxidada alcenos, cliva as cadeias laterais de ácidos graxos, e introduz grupos carboxila dentro de uma ou mais das cadeias laterais de ácidos graxos. Os grupos carboxila presentes na cardiolipina oxidada interagem mais fortemente com o substrato de sílica de uma fita de CCD, o que retarda a migração das formas de cardiolipina oxidada ao longo da fita. Sendo assim, nas preparações de cardiolipina oxidada (ver Fig. 2, colunas B e D1), a mancha na direção da migração se torna mais pronunciada (compare-se a coluna A com as colunas B e D1). Além disso, a clivagem oxidativa das cadeias laterais de ácidos graxos produz carboxilatos alquílicos, que possuem pouca mobilidade sobre uma fita de CCD sob estas condições. Como mostrado na Fig. 2, colunas B e D2, concebe-se que os carboxilatos sejam representados por uma mancha branca (devido à exclusão de tinta) co-extensiva com o ponto da origem. Seguindo-se a oxidação de cardiolipina como descrito neste exemplo, as formas oxidadas da cardiolipina foram encontradas predominantemente na fase de t-butanol (mostrada na Fig. 2, coluna D1), enquanto que os carboxilatos alquílicos foram encontrados predominantemente na fase aquosa (Fig. 2, coluna D2).

Conforme julgamento por reatividade com soro sífilítico (ver, por ex., Exemplo 4), a fase de t-butanol superior ("fase de álcool") (ver Fig. 2, coluna D1) contenha espécies de cardiolipina oxidada, enquanto acredita-se que a fase aquosa inferior (ver Fig. 2, coluna D2) continha em sua maior parte uma mistura de subprodutos de ácido malônico e de ácido capróico com base em resultados de CCD.

Exemplo 2

Ativação de Cardiolipina Oxidada e Conjugação com Moléculas de Ligação

Este exemplo demonstra diversos métodos de conjugação de cardiolipina oxidada com ASB ou HFF utilizando-se EDC e NHS.

A – Método Um

5 Após a completa evaporação da fase de t-butanol descrita no Exemplo 1, a preparação de cardiolipina oxidada seca foi suspensa em 2 ml de N,N-formamida em uma concentração de aproximadamente 25 mg/ml. Dez (10) mg de EDC e 10 mg de NHS foram dissolvidos em 1 ml de água destilada. A solução de EDC/NHS foi então adicionada à solução de formamida contendo
10 cardiolipina oxidada. Como um técnico no assunto irá reconhecer, a EDC e a NHS irão converter os grupos carboxila em cardiolipina oxidada em ésteres de NHS reativos com amina.

Um excesso molar de até 40-vezes de ASB ou de HFF foi adicionado à mistura de cardiolipina oxidada/EDC/NHS, e a mistura foi mexida
15 por uma hora na temperatura ambiente. Preferivelmente, aproximadamente 1 ml de uma solução de 5 mg/ml de ASB ou de HFF foi adicionado. À medida que a quantidade de ASB ou de HFF na mistura da reação for aumentada (por ex., até 10 mg/ml ou mais), ficará mais provável que o componente de proteína se reticule, o que fará com que um precipitado apareça. Neste caso, pode ser
20 necessário separar o precipitado por centrifugação e descartá-lo.

A mistura da reação foi clarificada, conforme preciso, e então dialisada contra duas mudanças de um litro de tampão fosfato 10 mM, pH 8,0. A preparação foi concentrada por filtração de membrana (Filtro Centricom; Millipore) até aproximadamente 10 mg/ml de cardiolipina oxidada. A solução de
25 cardiolipina oxidada pode ser armazenada em 2 a 8°C ou em -20°C até que seja precisa.

B – Método Dois

Após a completa evaporação da fase de t-butanol, conforme descrito no Exemplo 1, a preparação de cardiolipina oxidada seca foi suspensa em
30 2 ml de N,N-formamida em uma concentração de aproximadamente 25 mg/ml. Esta mistura de formamida foi então dialisada contra duas mudanças de um litro de tampão fosfato 10 mM, pH 8,0 antes da adição da solução de EDC/NHS,

conforme descrito no Método 1 deste Exemplo. As etapas seguintes à adição da solução de EDC/NHS são as mesmas descritas no Método 1.

C – Método Três

Uma preparação de cardiolipina oxidada foi preparada através da diálise da fase de t-butanol descrita no Exemplo 1 contra tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, seguida pela liofilização até a secagem. Para uso em uma reação subsequentemente, a cardiolipina oxidada liofilizada foi reconstituída em água até aproximadamente 25 mg/ml. Depois, 10 mg de EDC e 10 mg de NHS dissolvidos em 1 ml de água destilada foram adicionados à solução de cardiolipina oxidada com agitação por 1 hora na temperatura ambiente. As etapas seguintes à adição da solução de EDC/NHS são as mesmas descritas no Método Um.

Exemplo 3

Biotinilação de Cardiolipina Oxidada

Este exemplo descreve a biotinilação de cardiolipina oxidada. Dez (10) mg de cardiolipina oxidada (ver Exemplo 1) foram dissolvidos em 1 ml de ácido N-morfolinoetano sulfônico (MES). Cem (100) µl de biotina-PEO-amina 20 mg/ml foram adicionados à solução de cardiolipina. Imediatamente em seguida, 25 µl de uma solução de EDC 1 mg/ml frescamente preparada foram adicionados à mistura de biotina/cardiolipina, e a solução foi misturada por 2 horas na temperatura ambiente. A mistura da reação foi então dialisada contra duas mudanças de tampão fosfato 10 mM, pH 8,0. O produto biotinilado foi concentrado por liofilização e pode ser posteriormente reconstituído com água destilada para uma concentração desejada, por exemplo, de 10 mg/ml.

Exemplo 4

Antigenicidade de Preparações de Cardiolipina

Este exemplo demonstra que a cardiolipina oxidada como preparada no Exemplo 1 retém a antigenicidade quando testada em confronto com soro sifilítico utilizando-se dois imuno-ensaios.

A – Teste de Inibição RPR (*Rapid Plasma Reagin*)

Cem (100) µl de soro sífilítico (lote de 50 l) foram misturados com 50 µl das preparações de cardiolipina-ASB ou cardiolipina-HFF (aproximadamente 2,5 a 5 mg/ml) descritas na Tabela 2. Se uma preparação de cardiolipina oxidada retém sua antigenicidade, os anticorpos anti-lipídicos presentes no soro irão se ligar especificamente à preparação de cardiolipina oxidada, que irá atuar para reduzir o número de locais de ligação de anticorpos anti-lipídicos disponíveis. Em outras palavras, o soro será “despojado” de alguns ou de todos os locais de ligação de anticorpos anti-lipídicos. O soro que foi despojado dos locais de ligação de anticorpos anti-lipídicos será menos reativo quando testado no teste RPR convencional.

Tabela 2 – Preparações de Cardiolipina Oxidada

Nº. da Preparação de Cardiolipina	Horas de Oxidação	Tipo de Conjugado	Método de Preparação (ver Exemplo 2)
1	48		Método Um
2	<i>Duplicata da Preparação 1</i>		
3	48	Cardiolipina oxidada-HFF	Método Um
4	<i>Duplicata da Preparação 3</i>		
5	24	Cardiolipina oxidada-ASB	Método Três
6	24	Cardiolipina oxidada-HFF	Método Três
7	24	Cardiolipina oxidada-ASB	Método Um
8	<i>Duplicata da Preparação 7</i>		
9	24	Cardiolipina oxidada-HFF	Método Um
10	<i>Duplicata da Preparação 9</i>		
11	24	Conjugado de cardiolipina oxidada-ASB	Método Dois
12	24	Cardiolipina oxidada-HFF	Método Dois

O soro despojado (e de controle) foi testado em um teste RPR de acordo com o Capítulo 10 do *Manual of Tests for Syphilis*, 9ª Edição, Washington, DC, EUA: American Public Health Association, 1998.

Como mostrado na Tabela 3, o soro sifilítico de controle, ao qual foram adicionados 50 µl de ASB não-conjugada 5 mg/ml, reagiu com o antígeno do teste RPR em uma diluição de soro de 1:8. A incubação do soro sifilítico com cada uma das preparações de cardiolipina de 1 a 12 (descritas na Tabela 2) inibiu a reatividade do soro com o antígeno do teste RPR em ao menos duas vezes. Este resultado indica que cada uma das preparações cardiolipina reagiu em algum grau com os anticorpos anti-lipídicos presentes no soro sifilítico teste, e portanto inibiu o soro despojado de reagir com o antígeno do teste RPR. Por exemplo, a pré-incubação do soro de teste sifilítico com as preparações de cardiolipina 2, 11 e 12 inibiu completamente a reatividade do soro no teste RPR.

Tabela 3 – Resultados do Teste de Inibição RPR

Preparação da Cardiolipina Utilizada para a Pré-incubação de Soro	Diluição de Soro (Lote de 50 ml)					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Nada (ou seja, controle)	R	R	R ₍₊₎	Rm	N	N
Preparação 1	Rm	N	N	N	N	N
Preparação 2	N	N	N	N	N	N
Preparação 3	Rm ₍₊₎	N	N	N	N	N
Preparação 4	Rm ₍₊₎	N	N	N	N	N
Preparação 5	Rm ₍₊₎	N	N	N	N	N
Preparação 6	Rm ₍₊₎	N	N	N	N	N
Preparação 7	Rm ₍₊₎	N	N	N	N	N
Preparação 8	Rm	Rm ₍₊₎	N	N	N	N
Preparação 9	Rm	Rm ₍₊₎	N	N	N	N
Preparação 10	Rm	Rm ₍₊₎	N	N	N	N
Preparação 11	N	N	N	N	N	N
Preparação 12	N	N	N	N	N	N

*Ver Tabela 2 para a descrição das preparações de cardiolipina

R = reação positiva forte

R₍₊₎ = reação positiva

Rm = reação fraca

Rm₍₊₎ = reação muito fraca

N = reação negativa

B – Teste de Imuno-blot

Ensaios de *Dot-blot* foram realizados utilizando-se o Immun-Blot® Assay Kit (BioRad) com um conjugado alcalino-fosfatase de IgG anti-humana de

cabra de acordo com as instruções do fabricante. Como mostrado na Fig. 5, a preparação 5 de cardiolipina oxidada-ASB (ver Tabela 2) reagiu com o soro sífilítico (Lote 00) ao longo de uma vasta faixa de concentrações de antígenos (7,5 a 120 µg) e anticorpos (diluição de 1:10 a 1:640).

- 5 A Fig. 5 também mostra que o soro do Lote 00 (diluição 1:640) reage com uma preparação de *T. pallidum* de célula inteira, o que confirma que o doador do soro fora infectado com a *T. pallidum*.

Exemplo 5

Preparação de Conjugado Cardiolipina Oxidada com Ouro

- 10 Este exemplo demonstra a conjugação de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF com ouro colóide, e a determinação de condições úteis para a preparação de tais conjugados com ouro. Esta preparação de ouro colóide pode ser utilizada como o conjugado em uma fita de fluxo lateral, tal como a fita de fluxo lateral descrita em relação à Fig. 7.

15 A – Determinação de um pH Útil para a Reação de Conjugação de Cardiolipina Oxidada/Ouro Colóide

- Aproximadamente 25 ml de tampão fosfato 10 mM foram colocados em um béquer de 50 ml, e ajustados para pH 5,0 com ácido fosfórico 0,2 M. Duas alíquotas de 0,5 ml do tampão em pH 5,0 foram transferidas para dois tubos de ensaio de 12 x 75 mm, um rotulado como “teste” e o outro rotulado como “controle”. Então, o pH do tampão fosfato restante no béquer foi sequencialmente ajustado para 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; e 10,0 utilizando-se carbonato de potássio 0,2 M. Em cada pH, duas alíquotas de 0,5 ml foram transferidas para um tubo de ensaio “teste” e um “controle” como descrito para a amostra de pH 5,0.

Seis (6) µl de uma preparação de cardiolipina-ASB ou de uma preparação de cardiolipina-HFF 5 mg/ml (30 µg), preparada como descrito no Exemplo 2, foram adicionados a cada um dos tubos “teste” e “controle”, e bem misturados.

- 30 Aproximadamente 25 ml de ouro colóide 40 nm (solução de 1%) (British Biocell International, Londres, Inglaterra) foram colocados em um béquer de 50 ml separado, e uma série de amostras de ouro colóide de “controle”

e de "teste" em pHs 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; e 10,0 foi produzida como descrito acima.

Um (1) ml de ouro colóide em cada pH foi adicionado às soluções de cardiolipina "teste" e "controle" com o pH correspondente. As soluções de ouro/cardiolipina foram bem misturadas, e incubadas por 20 minutos na temperatura ambiente. Então, 200 µl de NaCl 2M foram adicionados ao conjunto de tubos rotulados como "teste" e 200 µl de água destilada foram adicionados ao conjunto de tubos rotulados como "controle". Os conteúdos de ambos os conjuntos de tubos foram deixados em incubação por 30 minutos na temperatura ambiente.

A densidade óptica de 580 nm (DO_{580}) de cada amostra "teste" foi registrada em confronto com a amostra "controle" correspondente. O pH da amostra com a menor DO_{580} foi determinado como sendo um pH favorável para a formação de um conjugado de ouro da preparação de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF.

As partículas de ouro colóide têm uma superfície carregada negativamente, devido à camada de íons negativos adsorvidos por sobre a superfície da partícula de ouro durante o processo de fabricação. Proteínas, tais como a ASB ou a HFF em preparações de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF, serão atraídas às partículas de ouro negativamente carregadas através de interações iônicas, hidrofóbicas e dativas. Estas interações fundamentam a formação de conjugados de ouro coloidais-proteína. No pI de uma proteína conjugada com a uma partícula de ouro (isto é, o pH em que a proteína tem um somatório de cargas igual a zero), o conjugado terá o máximo de estabilidade.

A adição de NaCl às partículas de ouro coloidais não-conjugadas irá romper a camada de íons negativamente carregados adsorvidos na superfície do ouro. Em resultado, a partícula de ouro irá dissociar e eventualmente liberar íons de ouro (isto é, Au^+) na solução. Os íons de ouro livres podem ser medidos na DO_{580} . Ao revés, um conjugado de proteína-ouro (por ex., conjugado de cardiolipina oxidada-ASB-ouro ou conjugado de cardiolipina oxidada-HFF-ouro) é resistente ao rompimento por NaCl no pI do componente de proteína do conjugado (por ex., no pI da cardiolipina oxidada-ASB ou no pI da cardiolipina

oxidada-HFF). Assim, neste exemplo, o pH da amostra com a menor DO_{580} é selecionado.

Como a razão molar de cardiolipina para molécula de ligação em cada preparação de molécula de ligação de cardiolipina oxidada (por ex.,
5 cardiolipina oxidada-ASB ou cardiolipina oxidada-HFF) pode ser diferente, o pI de cada preparação também pode ser diferente. Portanto, é benéfico determinar o pH útil, como descrito neste exemplo, para cada preparação de molécula de ligação de cardiolipina oxidada que for feita.

B – Determinação de uma Concentração Útil de Cardiolipina- 10 ASB ou de Cardiolipina-HFF para uma Reação de Conjugação com Ouro Colóide

Cem (100) µl de água destilada foram adicionados a cada tubo em uma série de onze tubos de ensaio de 12 x 75 mm. Depois, 1 µl, 2 µl, 5 µl, 7 µl, 10 µl, 15 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl ou 100 µl de uma solução 1 mg/ml de
15 cardiolipina-ASB ou de cardiolipina-HFF foram adicionados a um tubo correspondente na série. O décimo primeiro tubo na série serviu como um controle. Cada tubo foi bem misturado, e deixado em incubação na temperatura ambiente por 5 minutos. Neste ponto, a solução em cada tubo tinha cor vermelha. Quinhentos (500) µl de uma solução de NaCl 10% foram então adicionados a
20 cada tubo de ensaio com agitação, e os tubos foram novamente incubados na temperatura ambiente por 5 minutos. A cor da solução de cada tubo foi observada de olho com alguma transformação de vermelho para azul após a adição de NaCl. A quantidade mínima de molécula de ligação de cardiolipina oxidada útil para estabilizar o conjugado com ouro foi determinada como sendo a menor
25 concentração em uma solução de cor azul após a adição de NaCl.

Concentrações mais elevadas do complexo de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada, embora sejam úteis, são menos preferidas porque o excesso de complexos de ligação de cardiolipina oxidada pode formar associações mais fracas com as partículas de ouro, por exemplo, por
30 sobreposição sobre uma camada de complexos de molécula de ligação de cardiolipina oxidada que havia previamente se associado a partículas de ouro.

De forma semelhante, concentrações mais baixas de complexos de moléculas de ligação de cardiolipina oxidada podem ser úteis, mas são menos preferidas porque as partículas de ouro não-conjugadas podem fornecer “interferências” secundárias em outras aplicações dos complexos de ligação de cardiolipina conjugada com ouro. Alternativamente, as partículas de ouro não-conjugadas podem ser separadas de complexos de moléculas de ligação de cardiolipina conjugadas com ouro utilizando-se métodos comumente conhecidos na técnica, tais como a centrifugação ou a filtração.

10 **C – Mini-preparações de Cardiolipina-ASB ou de Cardiolipina-HFF Conjugadas com Ouro**

Para uma preparação particular de cardiolipina oxidada-ASB ou –HFF, determinar um pH útil e uma concentração útil de cardiolipina oxidada-ASB ou de cardiolipina oxidada-HFF conforme descrito acima. Se o pH útil for de 8,0 ou mais elevado, adicionar então 5 ml de tampão borato 10 mM até a quantidade de complexo de molécula de ligação de cardiolipina oxidada liofilizado necessária para atingir a concentração útil; depois, ajustar o pH para o pH útil. Se o pH útil for de 8,0 ou menos, adicionar 5 ml de tampão fosfato 10 mM até a quantidade de complexo de molécula de ligação de cardiolipina oxidada liofilizado necessária para atingir a concentração útil; depois, ajustar o pH até o pH útil. Em seguida, adicionar 10 ml de ouro colóide 40 nm (solução de 1% ajustada para o pH útil), e misturar bem. Incubar a mistura por 20 minutos na temperatura ambiente. Centrifugar a mistura da reação a 6500 xg por 10 minutos, e remover o sobrenadante. Re-suspender a bolota em 0,5 ml de tampão de re-suspensão (NaCl 150 mM, base Trizma 20 mM, sacarose (sucrose) 10%, Trealose 5%, ASB 0,1%, azeto de sódio (sodium azide) 0,05%). A bolota re-suspensa contendo cardiolipina oxidada-ASB ou –HFF conjugada com ouro pode ser utilizada para uma variedade de propósitos, incluindo, sem limitação, o uso como um reagente detector para anticorpos anti-lipídicos em um dispositivo de fluxo lateral.

30 **Exemplo 6**

Ligação de Complexos de Moléculas de Ligação de Cardiolipina à Nitro-Celulose

Este exemplo descreve um método representativo para ligar complexos de cardiolipina-proteína a uma superfície sólida, neste caso, a nitro-celulose.

Para uma preparação de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF particular, determinar um pH útil como descrito anteriormente. Re-suspender o complexo de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF liofilizado em tampão acetato de sódio 10 mM (para valores de pH úteis entre 4,0 e 5,6), ou em tampão fosfato 10 mM (para valores de pH úteis entre 7,0 e 9,0). Ajustar a solução até o pH útil, com ácido acético 2 M para valores de pH entre 7,0 e 9,0. Etanol (0,5%) pode ser opcionalmente adicionado à solução de cardiolipina oxidada para melhorar a aplicação de reagentes diminuindo-se a viscosidade da solução. Depois, aplicar a solução de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF à nitro-celulose utilizando-se o módulo de distribuição de reagente *Matrix 1600* (Kinematic Automation, Twain Harte, CA, EUA) de acordo com as orientações do fabricante.

Após a aplicação da preparação de cardiolipina oxidada-ASB ou -HFF à nitro-celulose, a membrana deve ser secada por 30 minutos a 37°C seguida por 2 horas em um vácuo dissecador antes do uso, por exemplo, em um dispositivo de fluxo lateral.

Exemplo 7

Detecção de Anticorpos Anti-Lipídicos em Soro Humano com um Reagente de Captura de Conjugado de Cardiolipina Oxidada-Proteína

Este exemplo demonstra que anticorpos anti-lipídicos em soro sífilítico podem ser detectados utilizando-se um reagente de captura de conjugado de cardiolipina oxidada-proteína-ouro.

Um (1) µl das preparações 1 a 17 (como descritas na Tabela 2) foram cada uma delas aplicadas a membranas de nitro-celulose separadas como descrito no Exemplo 6, e deixadas de lado. Um conjugado de ouro coloidal foi preparado como descrito no Exemplo 5 utilizando-se a preparação de cardiolipina oxidada 6 (ver Tabela 2).

Soro sífilítico (Lote 00) ou soro não-reativo (normal, humano) foi diluído 1:10 e colocado em um número apropriado de vasos separados de uma placa de micro-titulação de 40 vasos. Três (3) µl da preparação 6 conjugada com

ouro (para uso como um reagente detector) foram então adicionados a cada vaso. Fitas de nitro-celulose contendo cada uma das preparações imobilizadas de 1 até 17 (ver Tabela 2) foram então colocadas dentro dos vasos que continham as soluções de anticorpos e de reagente detector. A solução nos vasos flui para cima sobre a tira por ação capilar. Cada preparação de cardiolipina oxidada imobilizada foi testada contra ambos os soros sífilítico e não-reativo (ou seja, controle).

Como mostrado na Tabela 4, muitas das preparações de cardiolipina oxidada dentro ou sobre nitro-celulose mostraram uma reação positiva, o que é indicativo de um complexo "sanduíche" entre o reagente de captura de cardiolipina oxidada imobilizada, ao menos um anticorpo anti-lipídico, e o reagente detector de conjugado de ouro e cardiolipina oxidada. A reatividade foi medida em uma escala de 0 (Neg) a 4+, com 4+ indicando o sinal mais forte observado sobre a fita de nitro-celulose.

Tabela 4

Preparação de Cardiolipina	Soro Reativo Lote 00	Soro não-Reativo
1	2+	Neg
2	+/-	+/-
3	1+	Neg
4	1+	Neg
5	4+	Neg
6	2+	Neg
7	1+	+/-
8	1+	Neg
9	+/-	+/-
10	+/-	+/-
11	2+	Neg
12	1+	Neg

Exemplo 8

Oxidação de Misturas de Cardiolipina e Lecitina

Este exemplo descreve a oxidação de misturas de cardiolipina e lecitina, e demonstra que as misturas oxidadas de cardiolipina e lecitina têm um

desempenho ao menos tão bom quanto a cardiolipina oxidada sozinha nos ensaios descritos nos Exemplos 4 a 7.

A cardiolipina e a lecitina foram misturadas juntas em razões de cardiolipina para lecitina de 1:1, 1:3 e 1:5 por peso. As misturas foram então
 5 oxidadas como descrito no Exemplo 1. Como mostrado na Fig. 8, coluna A, uma mistura de cardiolipina não-modificada e de lecitina não-modificada resulta em duas manchas sobre uma fita de CCD. A cardiolipina não-modificada migra para o topo da fita de CCD, como indicado pela mancha escura mais afastada do ponto de origem (ver também a Fig. 2, coluna A). A lecitina não-modificada
 10 migra um tanto mais lentamente sobre o local da CCD e é mostrada como a mancha escura aproximadamente na metade do caminho entre a cardiolipina e o ponto de origem.

Como descrito anteriormente, a oxidação sob as condições do Exemplo 1 oxida alcenos, cliva as cadeias laterais de ácidos graxos, e introduz
 15 grupos carboxila em uma ou mais das cadeias laterais de ácidos graxos de cardiolipina e lecitina. Os grupos carboxila presentes nas moléculas oxidadas interage mais fortemente com o substrato de sílica de uma fita de CCD, o que retarda a migração das formas oxidadas ao longo da fita. Assim, nas misturas oxidadas de cardiolipina e lecitina, uma mancha pronunciada na direção da
 20 migração é observada (ver Fig. 8, colunas B e C). Além disso, a clivagem oxidativa das cadeias laterais de ácidos graxos produz carboxilatos alquílicos, os quais possuem pouca mobilidade em uma fita de CCD nestas condições. Como especialmente evidente a partir da Fig. 8, coluna D, acredita-se que os carboxilatos são representados por uma mancha branca (devido à exclusão de
 25 tinta), que é co-extensiva com o ponto de origem. Em seguida à oxidação das misturas de cardiolipina/lecitina como descrito neste exemplo, formas oxidadas de cardiolipina foram encontradas predominantemente na fase de t-butanol (mostrada na Fig. 8, coluna C), enquanto que os carboxilatos alquílicos foram encontrados predominantemente na fase aquosa (ver Fig. 8, coluna D).

30 **A - Conjugação com ASB e HFF de Misturas de Cardiolipina/Lecitina Oxidadas**

Misturas oxidadas de cardiolipina e lecitina foram conjugadas à ASB ou à HFF, como descrito no Método 3 do Exemplo 2. As preparações de cardiolipina/lecitina conjugadas com ASB ou HFF são descritas na Tabela 5.

5

Tabela 5 – Misturas de Cardiolipina/Lecitina

nº. da Prep. de Cardiolipina (CL) Lecitina (L)	Razão CL:L (por peso)	Molécula de Ligação	Quantidade de Molécula de Ligação por Reação
CL/L 1	1:1	ASB	5
CL/L 2	1:1	ASB	2
CL/L 3	1:1	HFF	2
CL/L 4	1:1	HFF	1
CL/L 5	1:3	ASB	5
CL/L 6	1:3	ASB	2
CL/L 7	1:3	HFF	2
CL/L 8	1:3	HFF	1
CL/L 9	1:5	ASB	5
CL/L 10	1:5	ASB	2
CL/L 11	1:5	HFF	2
CL/L 12	1:5	HFF	1

B – Teste de Inibição de Misturas de Cardiolipina/Lecitina Oxidadas

As antigenicidades das preparações de cardiolipina/lecitina descritas na Tabela 5 foram testadas no Teste de Inibição RPR, como descrito no Exemplo 3. Como mostrado na Tabela 6, cada uma das preparações de cardiolipina/lecitina inibiu completamente a reatividade do soro sífilítico no teste RPR tradicional.

15.

Tabela 6 – Resultados do Teste RPR para Misturas de Cardiolipina/Lecitina

Prep. de Cardiolipina/Lecitina Utilizada para a Pré-Incubação de Soro	Diluição de Soro (Lote 50 I)					
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Nada (isto é, controle)	R	R	R ₍₊₎	R _m	N	N
CL/L 1	N	N	N	N	N	N

CL/L 2	N	N	N	N	N	N
CL/L 3	N	N	N	N	N	N
CL/L 4	N	N	N	N	N	N
CL/L 5	N	N	N	N	N	N
CL/L 6	N	N	N	N	N	N
CL/L 7	N	N	N	N	N	N
CL/L 8	N	N	N	N	N	N
CL/L 9	N	N	N	N	N	N
CL/L 10	N	N	N	N	N	N
CL/L 11	N	N	N	N	N	N
CL/L 12	N	N	N	N	N	N

R = reação positiva forte

R₍₊₎ = reação positiva

R_m = reação fraca

R_{m(-)} = reação muito fraca

N = reação negativa

5

Este resultado demonstra que as misturas de cardiolipina/leticina despojam (removem) muito eficientemente os anticorpos anti-lipídicos do soro sífilítico, de modo que tal soro seja não-reativo no teste RPR tradicional.

10

C – Teste *Imuno-Dot* de Misturas de Cardiolipina/Lecitina Oxidadas

Ensaio *dot-blot* foram realizados utilizando-se o Immun-Blot® *Assay Kit* (BioRad) com um conjugado alcalino-fosfatase de IgG anti-humana de cabra de acordo com as instruções do fabricante. Como mostrado na Fig. 10, misturas de cardiolipina/lecitina oxidadas na faixa de 375 ng a 21 µg por ponto (*dot*) reagiram com o soro sífilítico (Lote 94265; diluição 1:50). Em comparação, nenhuma das quantidades testadas das preparações de cardiolipina/lecitina oxidadas mostrou qualquer reação significativa com soro humano normal (isto é, soro não-sífilítico).

15

As preparações em que a cardiolipina e a lecitina foram oxidadas em uma razão de 1:1 (por peso) e então conjugadas à ASB ou à HFF (ou seja, ASB 1:1 e HFF 1:1) foram mais reativas com o soro sífilítico. Até mesmo somente 375 ng da preparação com ASB 1:1 e 656 ng da preparação com HFF 1:1 ligaram-se aos anticorpos humanos presentes no soro sífilítico neste ensaio.

20

Exemplo 9

Deteção de Anticorpos Anti-Lipídicos em Soro Humano com Reagente de Captura de Proteína-A ou de Anticorpo Anti-Humano

Este exemplo demonstra que os anticorpos anti-lipídicos presentes em soro humano podem ser detectados utilizando-se um reagente de captura de
5 proteína-A ou de anticorpos anti-humanos, o qual é imobilizado em uma membrana de nitro-celulose, em cooperação com um reagente detector conjugado de cardiolipina oxidada-proteína-ouro móvel.

Sangue integral será coletado de um sujeito humano que acredita-se estar em risco para uma condição que faz aumentar os níveis no soro de anticorpos
10 anti-lipídicos. Tais condições incluem, por exemplo, infecção por *T. pallidum* (isto é, com sífilis), ou lúpus. O soro será separado do sangue integral por métodos bem conhecidos na técnica. O soro pode ser diluído, por exemplo, com solução salina normal ou com outras soluções que não irão descaracterizar ou afetar de outra forma a ligação específica dos anticorpos anti-lipídicos presentes
15 no soro, ou interferir de outra forma com o método descrito.

A amostra de soro será aplicada a uma fita de nitro-celulose contendo um reagente detector conjugado de cardiolipina oxidada-proteína marcado, móvel ou mobilizável. Tal conjugado pode ser, por exemplo, cardiolipina oxidada-ASB marcado com ouro, ou um conjugado de cardiolipina
20 oxidada-HFF marcado com ouro, ou uma mistura conjugada com ASB, marcada com ouro, de cardiolipina oxidada e lecitina oxidada.

Os anticorpos anti-lipídicos presentes na amostra de soro irão se ligar à cardiolipina do reagente detector e fluir (tal como por ação capilar, ou por forças de fluxo lateral) para uma porção da fita de nitro-celulose onde um agente
25 de captura de proteína A ou de anticorpo anti-humano estiver imobilizado. O anticorpo anti-lipídico complexado com o reagente detector de cardiolipina será capturado pelo reagente de captura de proteína A ou de anticorpo anti-humano. O acúmulo de complexos de reagentes detectores desta maneira irá resultar em um sinal detectável (por exemplo, um sinal visível) na nitro-celulose na área onde o
30 reagente de captura estiver imobilizado.

O surgimento de um sinal detectável conforme descrito irá indicar que anticorpos anti-lipídicos estão presentes na amostra de soro, e pode ser útil no diagnóstico de certas condições, tais como a sífilis ou o lúpus.

Exemplo 10

5 Detecção de Anticorpos Anti-lipídicos em Soro Humano com Imuno-ensaio Ligado a Enzima

Este exemplo demonstra que os anticorpos anti-lipídicos presentes em soro humano podem ser detectados utilizando-se cardiolipina oxidada conjugada à ASB ou à HFF como um reagente de captura, que é imobilizado em
 10 uma placa de micro-titulação para o desempenho de um imuno-ensaio ligado a enzima. As alternativas à ASB ou à HFF incluem a proteína sintética MAPS, IgY, streptavidina, e a avidina. Os vasos de uma placa de micro-titulação com 96 vasos foram revestidos com 100 µl (10 µg/ml) de uma solução contendo 10 µg/ml de complexo de cardiolipina oxidada-ASB ou de cardiolipina conjugada-
 15 HFF. A solução foi deixada secando até o dia seguinte a 37°C. Os vasos foram então bloqueados por 2 horas na temperatura ambiente com ao menos 200 µl de caseína 1% em solução salina tamponada com Tris fosfato (TPBS) com pH 7,2. Os vasos foram lavados uma vez com 200 µl de TPBS. Depois, 100 µl de soro humano (tanto de controle como de indivíduos infectados com a *T. pallidum*),
 20 diluídos em 1:20, 1:40, 1:80 ou 1:160 em TPBS de caseína 1% foram adicionados a cada vaso. A placa de micro-titulação foi incubada na temperatura ambiente por 60 minutos; seguida por três lavagens com 200 µl de TBST. Cem (100) µl de anticorpo anti-humano de cabra conjugado com peroxidase de raiz-forte (PRF) diluída 1:3000 em TPBS com caseína 1% foram adicionados a cada
 25 vaso na temperatura ambiente por 45 minutos. A placa de micro-titulação foi lavada três vezes com TPBS antes da adição de 100 µl por vaso de substrato de TMB. Na presença de HRP, o substrato de TMB mudou de cor. A reação da enzima HRP-substrato foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 M. A solução em cada vaso foi registrada espectrofotometricamente em 450 nm.

30 Como mostrado nas Tabelas 7 e 8, os anticorpos anti-lipídicos presentes em soros sífilíticos humanos ("Reativo") ligaram-se aos complexos de cardiolipina oxidada-ASB e -HFF imobilizados nos vasos da placa de micro-

titulação. No entanto, não houve ligações significativas no soro de controle (“Não-reativo”) para o mesmo antígeno imobilizado.

Tabela 7 – Imuno-ensaio Ligado a Enzima com Antígeno de Cardiolipina Oxidada-ASB

Diluição de soro	Reativo	Reativo	Não-reativo	Não-reativo
1:20	1,938	1,712	0,103	0,066
1:40	0,569	0,769	0,004	0,005
1:80	0,348	0,495	0,018	0,020
Sem soro	0,032	0,031	0,029	0,033

Testes duplicados (resultados mostrados) foram realizados para cada ponto de dados. O soro sífilítico utilizado para esse conjunto de dados possui um título de 1:64 como determinado pelo teste RPR.

5 **Tabela 8 – Imuno-ensaio Ligado a Enzima com Antígeno de Cardiolipina Oxidada-ASB**

Diluição de soro	Reativo	Reativo	Não-reativo	Não-reativo
1:20	1,970	1,700	0,071	0,062
1:40	0,825	0,842	0,045	0,039
1:80	0,552	0,479	0,031	0,027
1:160	0,281	0,245	0,022	0,022
Sem soro	0,046	0,034	0,021	0,019

Testes duplicados (resultados mostrados) foram realizados para cada ponto de dados. O soro sífilítico utilizado para esse conjunto de dados possui um título de 1:128 como determinado pelo teste RPR.

Embora esta divulgação tenha sido descrita com ênfase em modalidades particulares, será óbvio para um técnico no assunto que variações das modalidades particulares podem ser utilizadas e é pretendido que a divulgação seja praticada de outras formas que não as descritas aqui. Os recursos, características, compostos, funções orgânicas químicas, ou exemplos descritos em conexão com um aspecto, modalidade, ou exemplo particular da invenção devem ser entendidos como aplicáveis a qualquer outro aspecto, modalidade ou exemplo da invenção. Desta forma, esta divulgação inclui todas as modificações abrangidas pelo espírito e escopo da divulgação como definida nas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir cardiolipina oxidada que seja imunorreativa com anticorpos anti-lipídicos, e capaz de se ligar a uma proteína para a fixação a um substrato, **caracterizado pela** cardiolipina compreender uma função orgânica glicerol central e cadeias laterais de ácidos graxos, o método compreendendo:

- a reação da cardiolipina com um m-periodato de sódio e um permanganato de potássio em um solvente de t-butanol sob uma atmosfera de argônio para oxidar as cadeias laterais de ácidos graxos da cardiolipina, para fornecer grupos carboxila terminais em uma ou mais das cadeias laterais, gerando assim uma suspensão de cardiolipina, onde a razão molar de m-periodato de sódio a cardiolipina é 0,1:1 a 100:1, e a razão molar de permanganato de potássio a cardiolipina é 0,1:1 a 100:1;

- a adição de bisulfito de sódio à suspensão de cardiolipina, após reação da cardiolipina com o m-periodato de sódio e o permanganato de potássio, para extinguir a oxidação da cardiolipina e para reduzir uma β -cetona formada na função orgânica de glicerol central para um grupo β -hidroxila, de maneira a reter a imunogenicidade da função orgânica glicerol central; e

- a ativação dos grupos carboxila da cardiolipina oxidada com uma carbodiimida para ligar por covalência um portador de proteína a pelo menos um dos grupos carboxila.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** razão molar de m-periodato de sódio a cardiolipina ser 4:1 a 5:1, e a razão molar de permanganato de potássio a cardiolipina ser 0,5:1 a 1:1.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pela** razão molar de m-periodato de sódio a cardiolipina ser 4,2:1, e a razão molar de permanganato de potássio a cardiolipina ser 0,75:1.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, **caracterizado pela** carbodiimida ser 1-etil-3-(3-dimetilamino propil)carbodiimida (EDC).

5. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado pela** cardiolipina ser reagida com o m-periodato de sódio antes da cardiolipina ser reagida com o permanganato de potássio.

6. Método de acordo com uma das reivindicações 3 a 5, **caracterizado pela** carbodiimida ser N,E'-d ciclohexil-carbodiimida ou diisopropilcarbodiimida.

7. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado pela** ativação dos grupos carboxila ainda compreender reagir os grupos carboxila com uma succinimida após reagir os grupos carboxila com a carbodiimida.

8. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado por** compreender ainda a separação de uma fase aquosa e de uma fase de álcool após a adição do agente redutor, e a recuperação de cardiolipina oxidada da fase de álcool.

9. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado por** compreender ainda a ligação por covalência de uma proteína a pelo menos um dos grupos carboxila ativados para fornecer um conjugado de cardiolipina-proteína.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **caracterizado pela** succinimida ser N-hidroxisuccinimida (NHS) e a carbodiimida ser 1-etil-3-(3-dimetilamino propil)carbodiimida (EDC).

11. Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pela** ligação por covalência de uma proteína compreender a ativação dos grupos carboxila através da reação da cardiolipina oxidada com uma carbodiimida e então com uma succinimida para fornecer um produto, e então a conjugação do produto com a proteína.

12. Método de fabricação de um dispositivo de fluxo lateral, **caracterizado por** compreender a fixação a um substrato de fluxo lateral de uma proteína conjugada feita através do método definido na reivindicação 9 ou 11.

13. Método de acordo com a reivindicação 12 ou 13, **caracterizado por** compreender ainda a fixação ao substrato de fluxo lateral de um antígeno treponêmico que reaja com anticorpos para o *T. pallidum*.

14. Método de acordo com a reivindicação 12 ou 13, **caracterizado pelo** substrato ser um substrato de nitro-celulose.

15. Dispositivo de fluxo lateral **caracterizado por** ser fabricado através do método definido na reivindicação 12 a 14.

16. Dispositivo de fluxo lateral para determinar a presença e/ou quantidade de um anticorpo anti-lipídico em uma amostra de fluido compreendendo:

- uma área de aplicação da amostra 14; e
- uma área de captura de cardiolipina 22 compreendendo uma cardiolipina oxidada imobilizada que tem uma afinidade de ligação para um anticorpo anti-lipídico, em que a cardiolipina oxidada imobilizada tendo uma afinidade de ligação para o anticorpo anti-lipoidal é feito pela pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1-11;

caracterizado pelo líquido aplicado na área de aplicação da amostra f14 luir em uma direção de fluxo a partir da área de aplicação da amostra 14 até a área de captura de cardiolipina 22, e pela formação de um complexo entre o anticorpo anti-lipídico e a cardiolipina oxidada imobilizada ser detectável para determinar a presença e/ou quantidade do anticorpo anti-lipídico em uma amostra de fluido.

17. Dispositivo de fluxo lateral de acordo com a reivindicação 16, compreendendo ainda um bloco conjugado 20 na passagem de fluxo 12 desde a área de aplicação de amostra 14 até a área de captura de cardiolipina 22, **caracterizado pelo** bloco conjugado compreender um reagente detector móvel ou mobilizável.

18. Dispositivo de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pelo** anticorpo anti-humano marcado compreender IgG anti-humano marcado ou Fc anti-humano marcado.

19. Dispositivo de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado pela** cardiolipina oxidada marcada, anticorpo anti-humano marcado, Proteína A marcada, ou Proteína G marcada compreender uma marcação, e em que a marcação compreende um ou mais dentre uma enzima, uma partícula de ouro coloidal, uma partícula de látex colorida, uma partícula de

prata adsorvida por proteína, partícula de ferro adsorvida por proteína, partícula de cobre adsorvida por proteína, partícula de selênio adsorvida por proteína, partícula de enxofre adsorvida por proteína, partícula de telúrio adsorvida por proteína, partícula de carbono adsorvida por proteína, ou um saco de tinta acoplado em proteína.

20. Dispositivo de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado por** compreender ainda uma área de captura treponêmica na passagem de fluxo 12 da área de aplicação de amostra 14, a área de captura treponêmica compreendendo um antígeno treponêmico imobilizado possuindo uma afinidade de ligação para um anticorpo anti-*T. pallidum*.

21. Dispositivo de acordo com a reivindicação 20, compreendendo ainda um bloco conjugado na passagem de fluxo desde a área de aplicação de amostra 14 até a área de captura treponêmica, **caracterizado pelo** bloco conjugado compreender anticorpo anti-*T. pallidum*, antígeno *T. pallidum*, ou *T. pallidum*.

22. Dispositivo de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** bloco conjugado compreender ainda cardiolipina oxidada marcada, anticorpo anti-humano marcado, Proteína A marcada, ou Proteína G marcada.

23. Dispositivo para detectar ao mesmo tempo a presença e/ou a quantidade de anticorpos treponêmicos e de anticorpos anti-lipídicos em uma amostra fluida, compreendendo:

- uma área de aplicação de amostra 14;
- um bloco conjugado 20 compreendendo ao menos um de uma cardiolipina oxidada marcada, um anticorpo anti-humano marcado, Proteína A marcada, e Proteína G marcada;
- uma área de captura principal 22 compreendendo uma cardiolipina oxidada imobilizada que possua uma afinidade de ligação para um anticorpo anti-lipídico, em que a cardiolipina oxidada imobilizada tendo uma afinidade de ligação para o anticorpo anti-lipídico é feita pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11; e

- uma área de captura secundária compreendendo um segundo parceiro de ligação imobilizado que tenha uma afinidade de ligação para anticorpos treponêmicos;

caracterizado pelo líquido colocado sobre a área de aplicação de amostra 14 fluir em uma direção de fluxo a partir da área de aplicação de amostra 14 através do bloco conjugado 20 em direção às área de captura principal e secundária 22, e pela formação de um primeiro complexo entre o anticorpo anti-lipídico, a cardiolipina oxidada, e ao menos um reagente detector na área de captura principal determinar a presença e/ou a quantidade de anticorpos anti-lipídicos em uma amostra fluida, e pela formação de um segundo complexo entre o anticorpo treponêmico, o segundo parceiro de ligação imobilizado, e ao menos um reagente detector na área de captura secundária determinar a presença e/ou a quantidade de anticorpos treponêmicos em uma amostra fluida.

24. Kit de diagnóstico de sífilis **caracterizado por** compreender um dispositivo como definido na reivindicação 17, instruções para a aplicação da amostra biológica à área de aplicação de amostra e para a interpretação do resultado do teste.

Figura 1

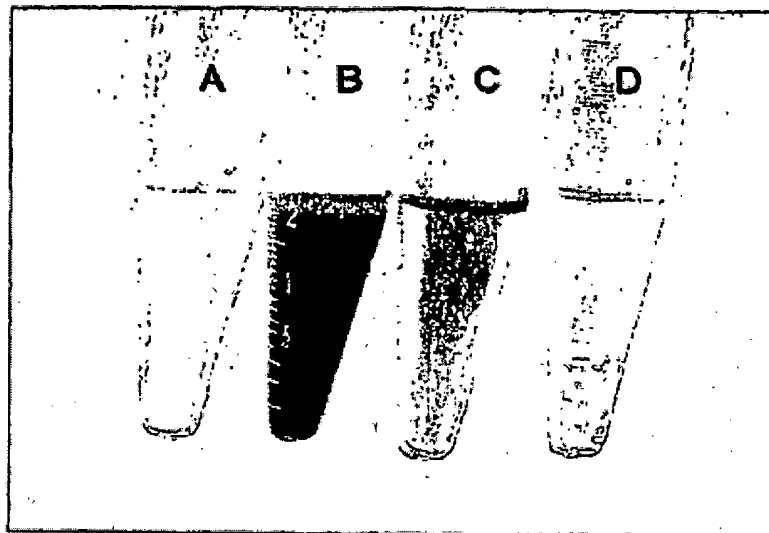
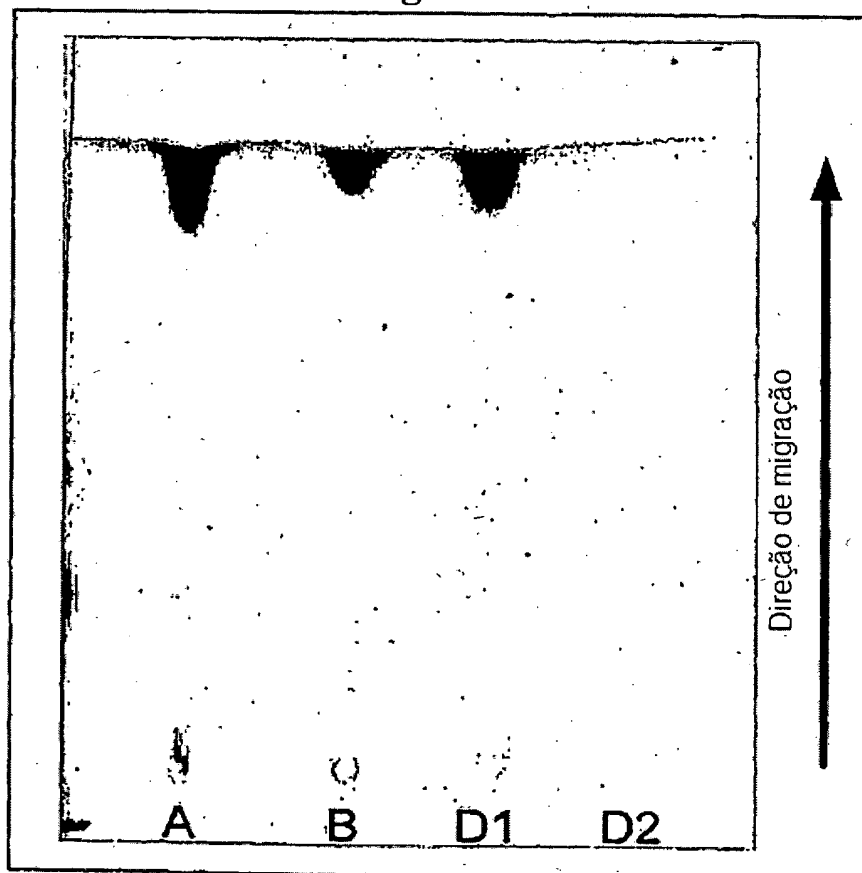


Figura 2



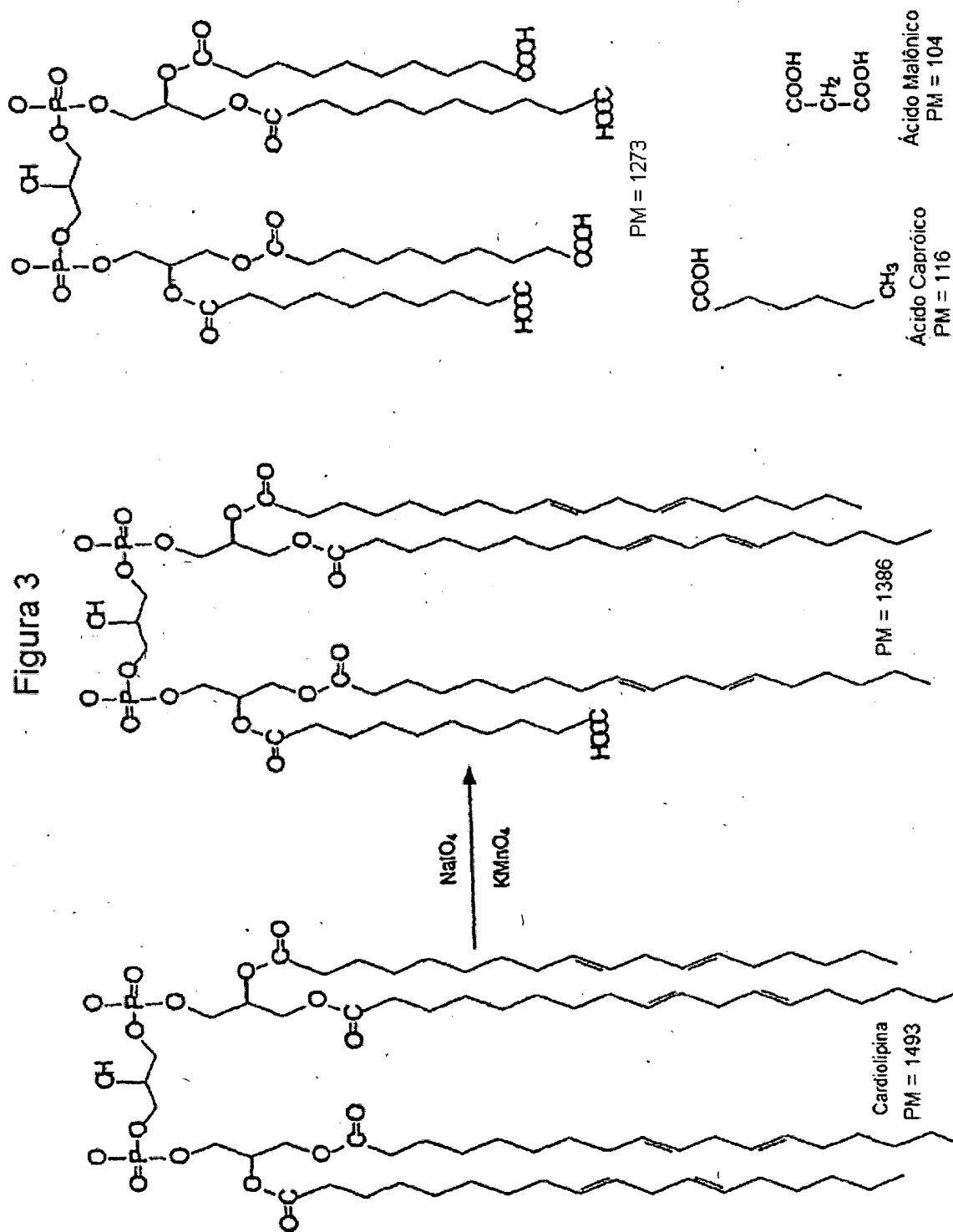


Figura 4

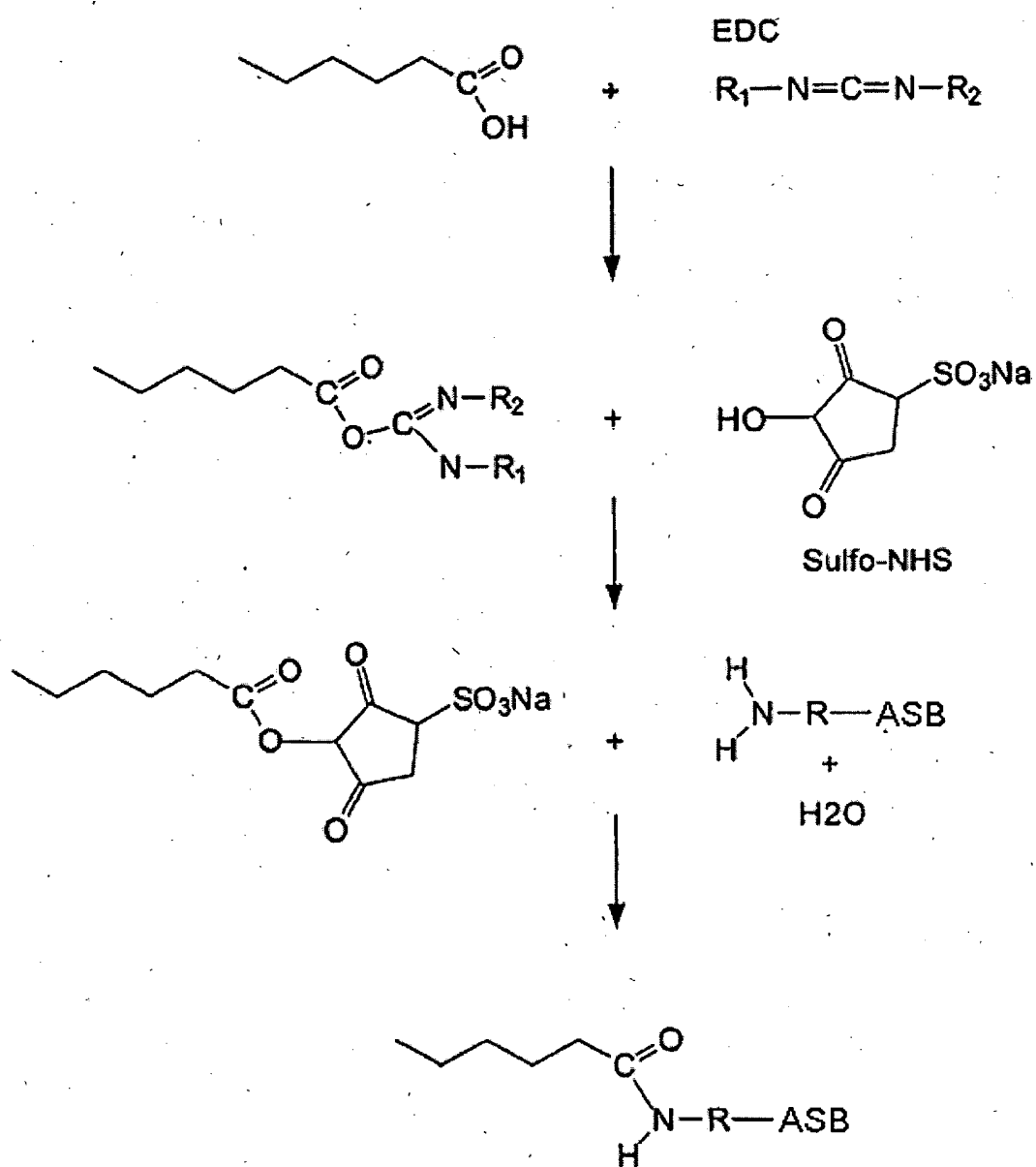


Figura 5

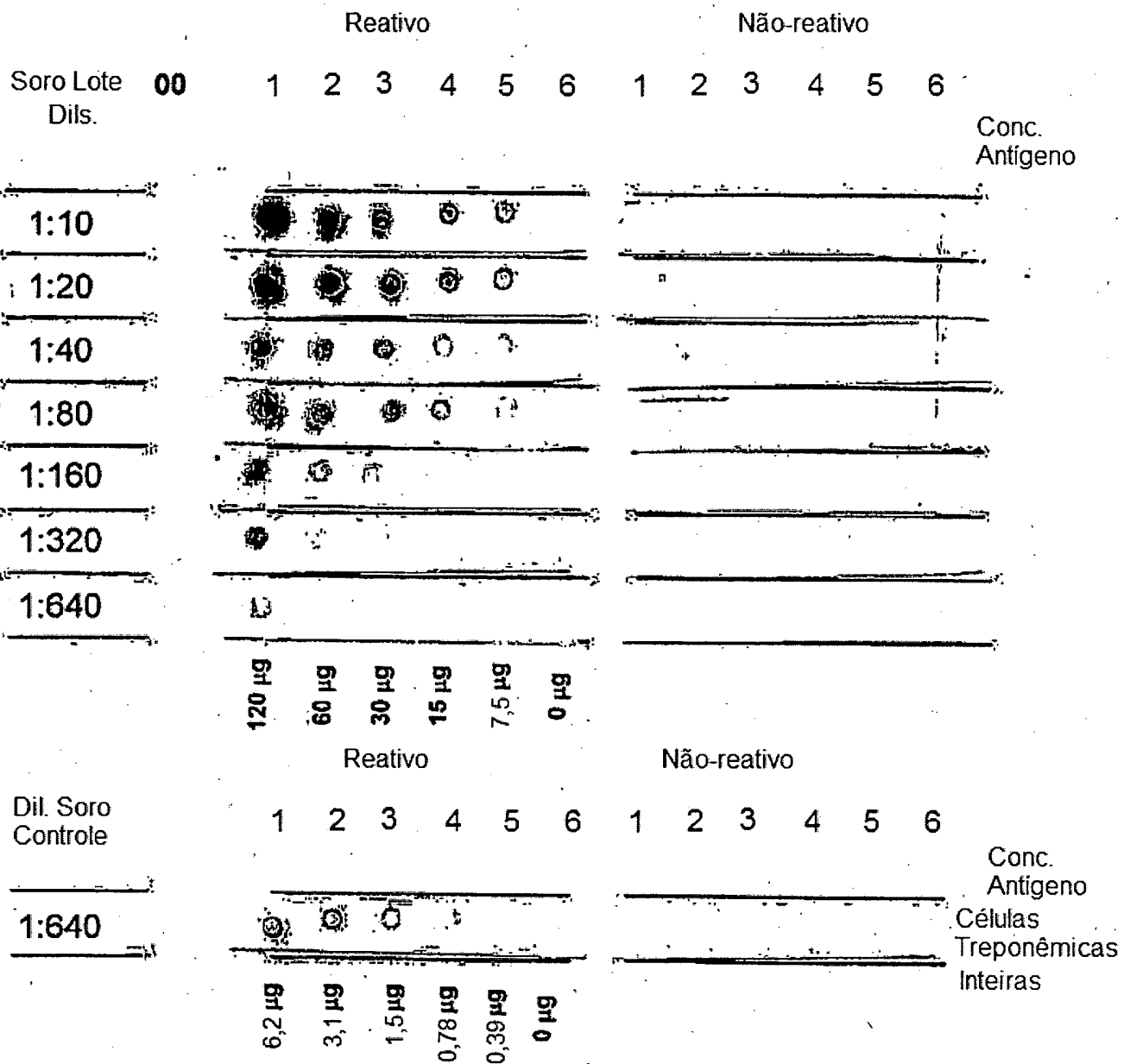


Figura 6

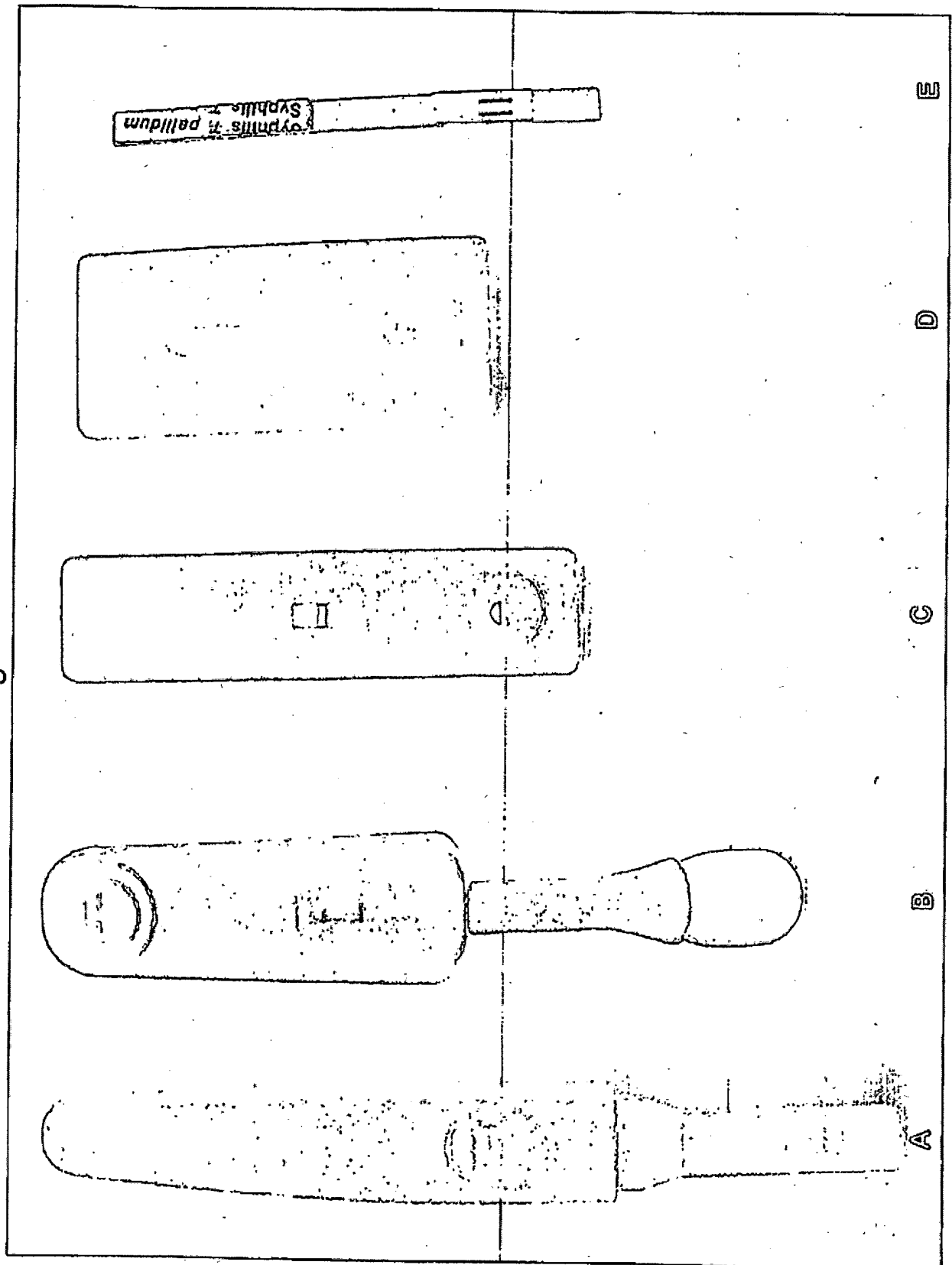
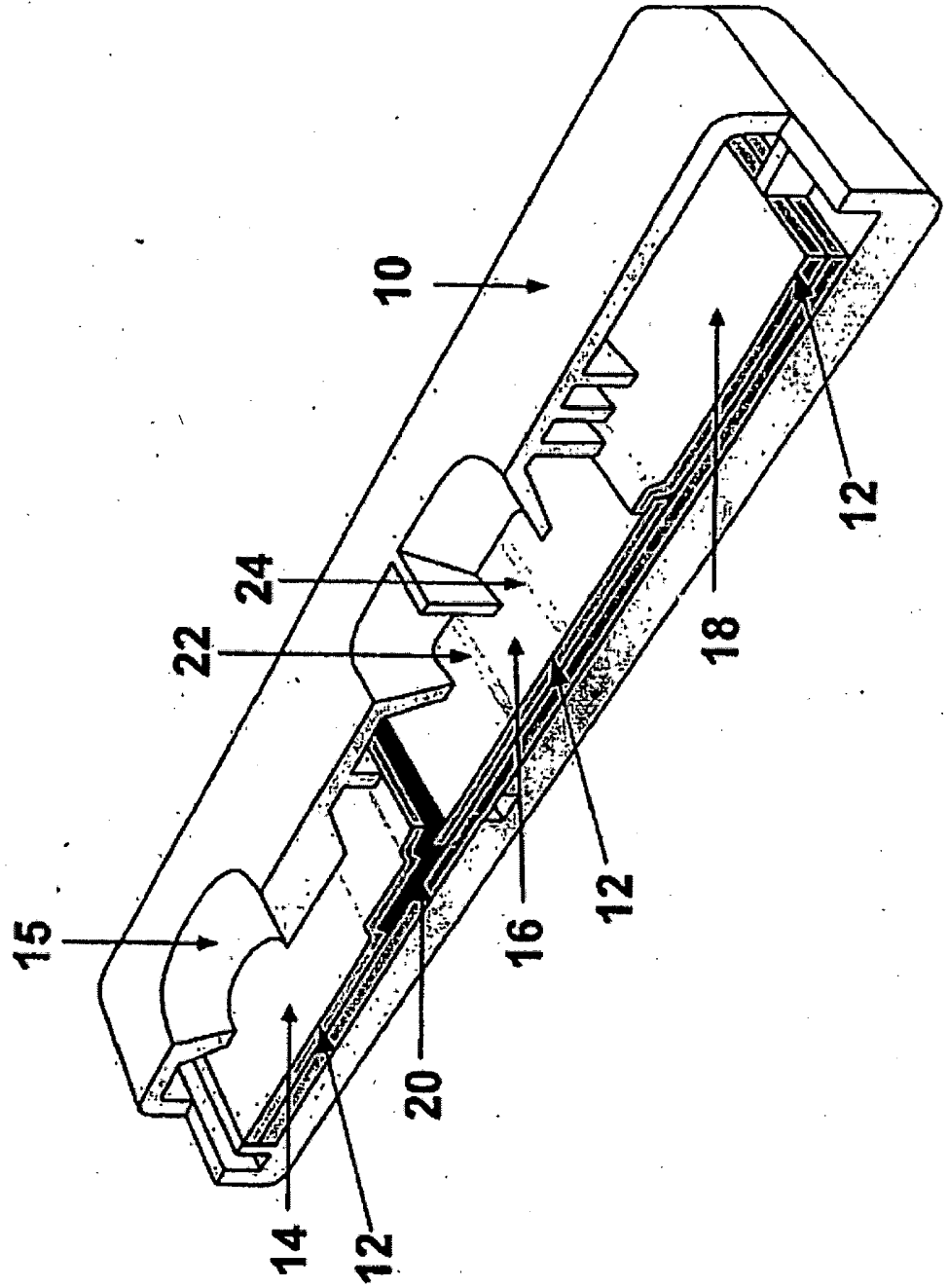


Figura 7



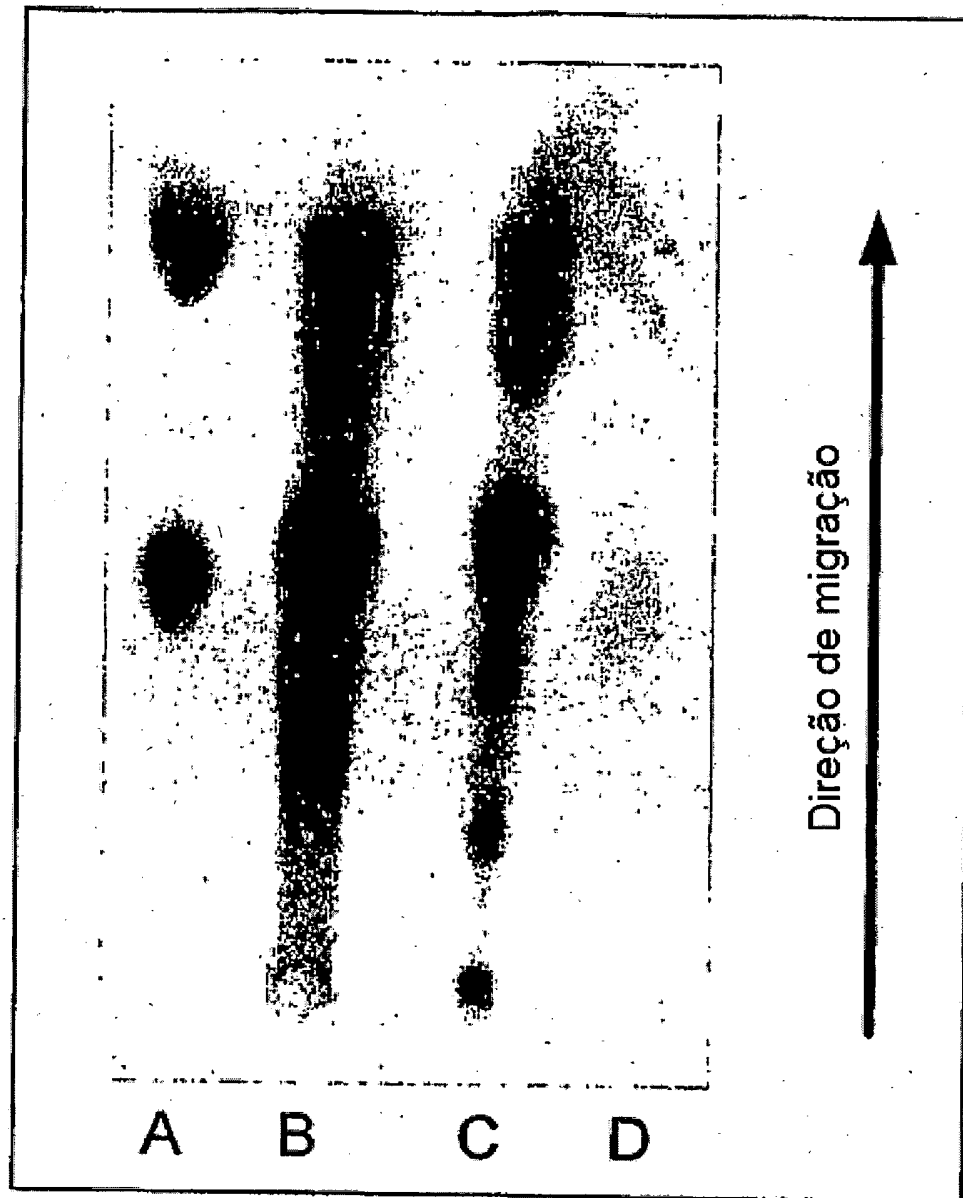


Figura 8

Figura 9

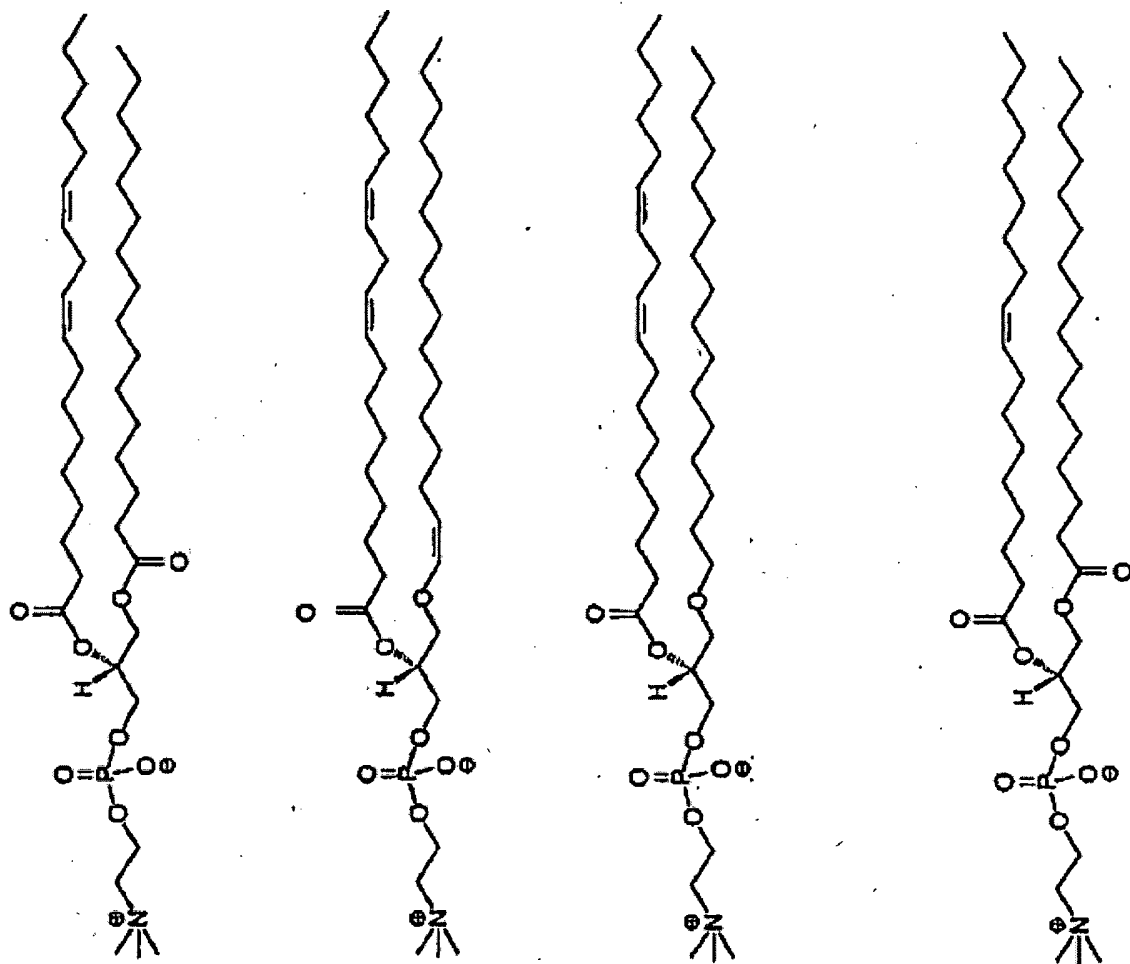
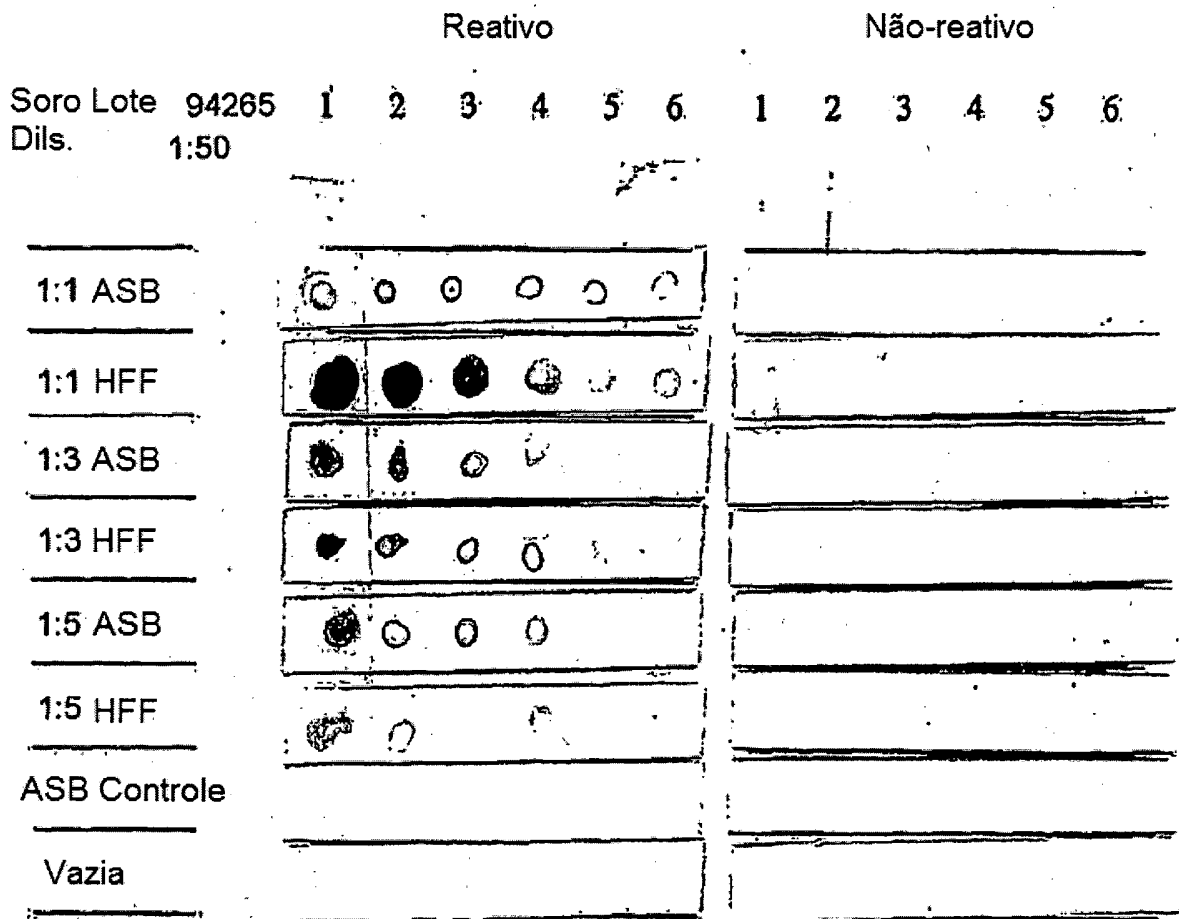


Figura 10



Preparação	Número da Coluna					
	1	2	3	4	5	6
1:1 ASB	12 µg	6 µg	3 µg	1,5 µg	750 ng	375 ng
1:1 HFF	21 µg	10,5 µg	5,2 µg	2,6 µg	1,3 µg	656 ng
1:3 ASB	10,5 µg	5,25 µg	2,6 µg	1,3 µg	656 ng	328 ng
1:3 HFF	3 µg	1,5 µg	750 ng	375 ng	187 ng	93 ng
1:5 ASB	9,9 µg	4,9 µg	2,47 µg	1,23 µg	618 ng	309 ng
1:5 HFF	3 µg	1,5 µg	750 ng	375 ng	187 ng	93 ng
ASB Controle	15 µg	7,5 µg	3,7 µg	1,87 µg	937 ng	468 ng
Vazia	0	0	0	0	0	0