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

(21) **PI0611866-6 A2**

BRPI0611866A2

(22) Data de Depósito: 20/06/2006
(43) Data da Publicação: 05/10/2010
(RPI 2074)

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

(54) Título: **DISPOSITIVO DE IMUNOENSAIO E MÉTODO PARA IMOBILIZAR CARDIOLIPINA IMUNORREATIVA**

(30) Prioridade Unionista: 21/06/2005 US 60/693,120

(73) Titular(es): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, REPRES. BY THE SECRETARY, DEPART. OF HEALTH AND HUMAN.

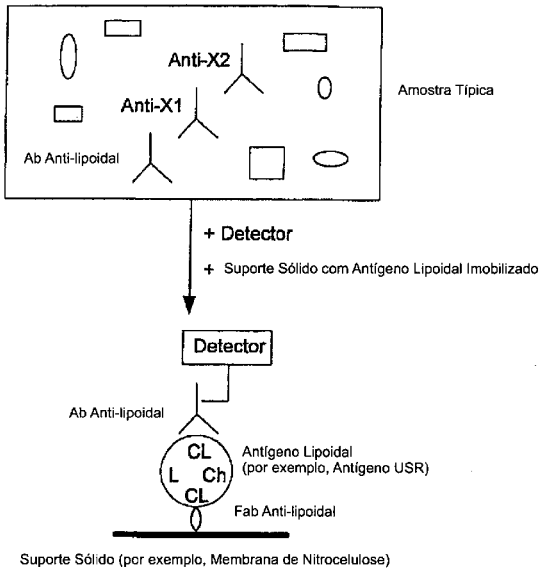
(72) Inventor(es): Arnold R. Castro, Robert W. Goerge, Victoria Pope

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006024117 de 20/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/002178de 04/01/2007

(57) Resumo: DISPOSITIVO DE IMUNOENSAIO E MÉTODO PARA IMOBILIZAR CARDIOLIPINA IMUNORREATIVA. A presente invenção refere-se a composições, métodos e dispositivos para a detecção de anticorpos antilipoidais e o diagnóstico de doença, por exemplo, sífilis que são descritos. Em particular, é descrito um método para imobilizar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina, lecitina, e colesterol, sobre um suporte sólido (tal como uma membrana de nitrocelulose). A capacidade para imobilizar um antígeno lipoidal sobre uma membrana satisfaz a necessidade há muito tempo existente de teste à base de membrana para a detecção de anticorpos antilipoidais. Também são descritos dispositivos de imunoensaio para realizar simultaneamente testes treponemais e não treponemais para sífilis.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DISPOSITIVO DE IMUNOENSAIO E MÉTODO PARA IMOBILIZAR CARDIOLIPINA IMUNORREATIVA".**

REFERÊNCIA CRUZADA COM REFERÊNCIAS RELACIONADAS

Este requerimento reivindica o benefício do Requerimento de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº 60/693.120, arquivado em 21 de junho de 2005, cuja aplicação é por este incorporada por meio de referência em sua totalidade.

RECONHECIMENTO DE SUPORTE DO GOVERNO

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

Esta descrição refere-se a métodos para imobilizar um antígeno lipoidal a um suporte sólido e imunoensaios e dispositivos de imunoensaio relacionados (tais como, tiras de teste, dispositivos de fluxo direto, ou dispositivos de fluxo lateral), cujas provas e dispositivos são úteis, por exemplo, para detecção de anticorpos antilipoidais e/ou diagnóstico de doença (tal como, sífilis).

ANTECEDENTES

A sífilis é uma doença sexualmente transmitida (DST) causada pelo espiroqueta da bactéria *Treponema pallidum*. Mais de 100.000 casos de sífilis em adultos são reportados em todo o mundo a cada ano. Além disso, a doença é transmitida congenitamente e afeta 3.000 ou mais crianças anualmente. O curso da infecção por sífilis dura muitos anos e pode levar a uma variedade de apresentações clínicas, as quais são caracterizadas por quatro estágios.

O estágio primário de infecção por sífilis ocorre 10 a 100 dias depois da infecção bacteriana, e se caracteriza pelo aparecimento de um ou mais cancros (úlceras indolores, vermelhas, exangues, tipicamente de menos de 1 cm de diâmetro). Os cancros podem aparecer sobre a genitália ou

em outra parte sobre o corpo. Um cancro dura 3 a 6 semanas e se cura sem tratamento, deixando uma pequena cicatriz. As pessoas infectadas são contagiosas durante este estágio.

O estágio secundário de infecção por sífilis se caracteriza por lesões de pele semelhantes a rash que podem cobrir parte do corpo ou todo o corpo. As lesões de pele são geralmente indolores e aparecem 1 a 6 meses depois do início do um ou mais cancros iniciais. As lesões de pele podem se assemelhar a verrugas, pústulas, ou úlceras. Caso não tratadas, elas se curam em 2 a 12 semanas sem cicatrização. Também pode ocorrer febre, dor de garganta, astenia, perda de peso, dilatação dos linfonodos, e perda dos cílios e/ou parte das sobrancelhas durante este estágio de infecção. Além disso, os sintomas podem progredir para sífilis meningovascular, a qual se caracteriza por inflamação do revestimento do cérebro e da medula espinhal e/ou alterações na vasculatura do cérebro. As pessoas infectadas também são contagiosas na fase secundária.

O estágio seguinte desta doença é sífilis latente ou o estágio ocultos. Durante este estágio, a pessoa infectada parece ter se recuperado e está assintomática. Este estágio dura toda a vida em aproximadamente dois terços das pessoas que não são tratadas para sífilis. Durante o primeiro ano de latência, podem ocorrer recaídas dos sintomas do estágio secundário. Exceto durante uma recaídas, as pessoas infectadas não são contagiosas durante este estágio latente; no entanto, as crianças nascidas de mães latentemente infectadas dentro de quatro anos do aparecimetno do cancro primário podem contrair sífilis congênita.

A sífilis tardia ou terciária é o estágio final da infecção não tratada. Este estágio pode ocorrer tão cedo quanto um ano depois de infecção ou a qualquer momento depois disso com 10 a 20 anos sendo o mais comum. A sífilis benigna, caracterizada por lesões denominadas gomas, pode ocorrer nos ossos, na pele, e nos órgãos internos. A morte é rara, mas pode ocorrer dor e desfiguramento severo. A sífilis cardiovascular se caracteriza por aneurismas aórticos bem como outros problemas cardiovasculares e freqüentemente resulta em morte. Pode ocorrer envolvimento neurológico nos está-

gios iniciais da sífilis bem como se manifestar como sintomas de estágios finais. No último estágio da doença, a neurossífilis pode ser assintomática ou o paciente pode ter graves problemas neurológicos tais como possível demência, insanidade, debilitação da mobilidade, cegueira, surdez, ou mesmo morte.

A reação imune na sífilis envolve a produção de (i) anticorpos treponemais, os quais são específicos para antígenos de *T. pallidum*, e (ii) anticorpos antilipoidais, os quais reconhecem material lipoidal liberado pelas células hospedeiras danificadas, material semelhante a lipoproteína e possivelmente cardiolipina liberada pelos treponemas. O esteio da triagem e do diagnóstico da sífilis é experimentação sorológica para um ou outro ou ambos tipos de anticorpos.

Os testes para anticorpos antilipoidais (freqüentemente denominados "testes não treponemais") são tipicamente baseados em um antígeno composto de cardiolipina, colesterol e leticina naturais. Os testes não treponemais amplamente usados (por exemplo, teste VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) e teste RPR (Rapid Plasma Reagin)) monitoram, ou microscopicamente (por exemplo, teste VDRL) ou macroscopicamente (por exemplo, teste RPR), a formação de um floculento consistindo em complexos antígeno-anticorpo. Os testes não treponemais têm a vantagem de estarem amplamente disponíveis, serem econômicos e convenientes para realizar em grandes números de amostras. Além disso, como os títulos de anticorpos antilipoidais diminuem com o tratamento para sífilis bem-sucedido, eventualmente desaparecendo na maioria dos pacientes, enquanto os títulos de anticorpos treponemais permanecem elevados por anos ou mesmo por toda a vida, os testes não treponemais são considerados a melhor escolha para monitoração do tratamento ou experimentação para reinfecção.

Os testes treponemais se baseiam em antígenos derivados de *T. pallidum* e incluem a aglutinação de partículas de *T. pallidum* (TP-PA), o teste de anticorpo treponemal fluorescente absorvido (FTA-ABS) e imunoensaios enzimáticos. Os testes treponemais são usados essencialmente para verificar a reatividade em testes não treponemais. O teste treponemal tam-

bém pode ser usado para confirmar uma impressão clínica de sífilis na qual o teste não treponemal é não reativo. Os testes treponemais são tecnicamente mais difíceis, consomem tempo, e são caros de realizar e não podem ser usados para monitorar tratamento porque o teste permanecerá reativo por anos ou por toda a vida em aproximadamente 85% das pessoas tratadas para sífilis com sucesso.

Cada um dos testes de anticorpos descritos acima é realizado usando uma amostra de soro que é obtida em uma situação clínica e enviado a um laboratório para análise. Portanto, os resultados dos testes tipicamente não estão disponíveis por vários dias depois da amostra ser coletada. Devido à freqüente dificuldade para rastrear pacientes com DSTs, o desenvolvimento de um teste rápido de ponto de atendimento é necessário para ajudar o clínico a fazer um parecer, preferencialmente no dia da prova.

Dispositivos de imunoensaio (tais como tiras de teste, dispositivos de fluxo direto, ou dispositivos de fluxo lateral), os quais oferecem resultados locais rápidos, estão disponíveis para testar qualitativametne níveis séricos de anticorpos treponemais (por exemplo, DiaSys Corporation; ACON Laboratories, Inc.; Biokit, S.A.; Genix Technology; Standard Diagnostics; Cortez Diagnostics, Inc.; e Phoenix Bio-Tech Corp). No entanto, testes análogos para anticorpos antilipoidais têm sido mais difíceis de desenvolver no mínimo em parte porque os antígenos hidrofóbicos dos anticorpos antilipoidais (por exemplo, antígenos de VDRL, USR ou RPR, ou cardiolipina) resistem a fixação a suportes sólidos, os quais são um elemento de um dispositivo de imunoensaio.

De acordo com alguns especialistas, a detecção da sífilis seria adicionalmente auxiliada por uma combinação de um teste não treponemal e um teste treponemal para fins de triagem e diagnóstico. Esta é uma abordagem defendida pela Organização Mundial de Saúde, Treponemal Infections, Technical Report Series 674, Geneva: WHO, 1982. Um teste fácila de usar, rápido de ponto de atendimento capaz de detectar simultaneamente tanto anticorpos treponemais quanto não treponemais ajudaria a tratar desta necessidade há muito tempo existente.

SUMÁRIO

Esforços para desenvolver imunoensaios não solução para teste não treponemal (ou teste combinado treponemal e não treponemal) têm sido frustrados pela dificuldade de fixar antígenos especificamente reconhecidos por anticorpos antilipoidais (referidos como "antígenos lipoidais"), tais como cardiolipina, antígeno de VDRL, antígeno de USR e semelhantes, a um substrato sólido, tal como uma tira de nitrocelulose. Por exemplo, o tamanho muito pequeno da molécula de cardiolipina resultou em localização insignificante desta molécula sobre um substrato sólido. Embora o tamanho da molécula de cardiolipina possa ser aumentado conjugando cardiolipina a moléculas maiores (tais como proteínas), as conjugações referidas resultaram na perda de antigenicidade da cardiolipina. Mais geralmente, o alto grau de hidrofobicidade dos antígenos lipoidais torna difícila ligar os antígenos referidos a muitas superfícies sólidas, tais como nitrocelulose e outras membranas microporosas.

A presente descoberta proporciona uma abordagem para fixar com segurança antígenos lipoidais (os quais são compostos de, no mínimo, cardiolipina, fosfatidilcolina (também referida como "lecitina"), e colesterol) a um sólido substrato (tal como, uma membrana microporosa) ao mesmo tempo que mantendo a antigenicidade e a especificidade do antígeno para anticorpos antilipoidais. Usando métodos descritos aqui, neste requerimento de patente, atualmente é possível fixar antígeno lipoidal a uma variedade de suportes sólidos. A capacidade para fixar o antígeno lipoidal nesta maneira possibilita que este seja usado, por exemplo, em dispositivos de imunoensaio para teste rápido local de anticorpos não treponemais. Em algumas modalidades, dispositivos de imunoensaio descritos também incorporam antígenos de *T. pallidum* que são reconhecidos por anticorpos treponemais, de tal modo que o dispositivo convenientemente e simultaneamente detecta tanto anticorpos não treponemais (isto é, antilipoidais) quanto treponemais (isto é, anti-*T. pallidum*) .

Em um exemplo em particular, um antígeno lipoidal compreendendo cardiolipina, lecitina e colesterol é contactado com uma população de

fragmentos Fab específicos para o antígeno lipoidal para proporcionar um complexo de antígeno lipoidal-Fab, cujo complexo é prontamente fixável a um suporte sólido, tal como um substrato permeável de um fluxo direto ou dispositivo de fluxo lateral.

Os precedentes e outras características e vantagens se tornarão mais evidentes a partir da seguinte descrição detalhada de várias modalidades, a qual prossegue com referência aos desenhos the anexados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIGURA 1 é um rastreamento da absorvência a 280 nm do eluente de uma coluna de Proteína A carregada com IgG purificada digerida por papaína. Foi usado um Detector de Absorvência/Fluorescência ISCO UA-5 ajustado para sensibilidade 2 e velocidade de diagrama 1.5 para coletar os dados. Tampão de elutriação de glicina foi adicionado à coluna quando a absorvência a 280 nm do eluente retornou à linha basal depois de elutriação do Pico I.

A FIGURA 2 mostra uma imagem digital de um gradiente de gel SDS. Alamedas (1) padrões de peso molecular (a partir do topo: 203, 135, 83, 41, 31, 17, e 7 kD); (2) precipitado de sulfato de amônio de soro sifilítico humano; (3) proteínas precipitadas por sulfato de amônio não retidas por Proteína A (pico I); (4) IgG purificada por Proteína A precipitado de sulfato de amônio (pico II); (5) IgG purificada por Proteína A antes de digestão por papaína; (6) IgG purificada por Proteína A depois de digestão por papaína; (7) proteínas da digestão de IgG por papaína que não foram retidas por Proteína A (pico I) (predominantemente fragmentos Fab); (8) proteínas retidas por Proteína A de digestão de IgG por papaína (incluindo fragmentos Fc); e (9) padrões de peso molecular (a partir do topo: 207, 116, 98, 55, 37, 30, 20 e 7 kD).

A FIGURA 3 mostra uma série de hastes graduadas de nitrocelulose preparadas conforme descrito no Exemplo 7. As hastes graduadas foram pintadas com IgG ou fragmentos Fab ou Fc conforme indicado, e posteriormente mergulhadas em uma solução contendo Proteína A conjugada a ouro.

A FIGURA 4 mostra uma série de hastes graduadas de nitrocelulose preparadas conforme descrito no Exemplo 8. As hastes graduadas foram pintadas com um antígeno de USR revestido com a quantidade indicada de fragmento Fab, e posteriormente mergulhadas em uma solução contendo Proteína A conjugada a ouro e soro reativo para sífilis (R) ou soro não reativo para sífilis (NR).

A FIGURA 5 é um gráfico da OD_{580} para misturas de IgG anti-humana de coelho (Fc) com ouro coloidal como uma função do pH. Conforme descrito no Exemplo 9, um pH útila no qual obter um conjugado de ouro estável para estes reagentes é o pH correspondente à menor OD_{580}.

A FIGURA 6 é um gráfico da OD_{580} para misturas de IgG anti-humana de coelho (Fc) com ouro coloidal como uma função da concentração da IgG anti-humana de coelho (Fc) . Conforme descrito no Exemplo 10, a concentração de proteína que produz a menor OD_{580} representa uma concentração útila de IgG anti-humana de coelho (Fc) para associada com partículas de ouro.

A FIGURA 7 mostra uma imagem digital de cinco diferentes modalidades físicas de dispositivos de fluxo lateral que podem ser usados com os métodos descritos. As modalidades de dispositivos mostrados em (A), (B) e (E) são configuradas de modo que cada uma pode ser mergulhada, ou parcialmente submersa, na amostra ou em uma solução contendo amostra. As modalidades de dispositivos mostrados em (C) e (D) são configuradas de modo a receber um volume da amostra (ou uma solução contendo amostra) gota a gota em uma porta de introdução de amostra.

A FIGURA 8 é uma vista em perspectiva de uma modalidade física de um dispositivo de fluxo lateral, com uma porção do estojo desprendida para mostrar os componentes básicos do dispositivo e sua relação uns com os outros.

A FIGURA 9 é uma representação esquemática de uma modalidade de um antígeno lipoidal imobilizado e a captura de um analite de anticorpo antilipoidal.

FIGURA 10 proporciona uma ilustração de um dispositivo de flu-

xo direto típico para detecção simultânea de anticorpos treponemais e não treponemais na sífilis. O dispositivo é configurado para receber um volume da amostra gota a gota em uma porta de introdução da amostra (localizada no centro do dispositivo).

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Introdução

São descritos aqui, neste requerimento de patente, dispositivos de imunoensaio para determinar a presença e/ou quantidade de um anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido, tal como soro humano. Os dispositivos referidos incluem um substrato microporoso (tal como nitrocelulose, náilon, fluoreto de polivinilideno (PVDF), polietersulfona, policarbonato, poliéster, acetato de celulose, ésteres celulósicos mistos, ou combinações dos mesmos). O substrato inclui, entre outras coisas, uma área de captura antilipoidal na qual é imobilizado um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora. O complexo referido tem um componente de anticorpo âncora, o qual é imobilizado sobre o substrato, e um componente de antígeno lipoidal, o qual é especificamente ligado por o anticorpo âncora e é deste modo ancorado ao substrato. O componente de antígeno lipoidal inclui cardiolipina, lecitina e colesterol e pode ser especificamente ligado por anticorpos antilipoidais (tais como anticorpos de reagina presentes em sujeitos infectados com *T. pallidum*).

Outras modalidades de dispositivo adicionais incluem uma área de aplicação da amostra e um caminho de fluxo da área de aplicação da amostra para a área de captura antilipoidal. A área de aplicação da amostra está em contato contínuo do fluido com a área de captura antilipoidal de tal modo que uma amostra de fluido disposta na área de aplicação da amostra pode fluir através de ou ao longo da membrana (por exemplo, por ação capilar ou fluxo cromatográfico) para a área de captura de anticorpo antilipoidal. A presença e/ou quantidade de um anticorpo antilipoidal na amostra de fluido pode ser detectada por formação de um complexo entre o anticorpo antilipoidal e o complexo de antígeno lipoidal imobilizado-anticorpo âncora. ALguns dispositivos descritos também incluem um bloco absorvente, o qual

está em contato com a membrana e serve como um reservatório para a amostra depois de entrar em contato com a uma ou mais áreas de captura. Em exemplos particulares, um dispositivo revelado é um dispositivo de fluxo lateral ou um dispositivo de fluxo direto.

Em algumas modalidades, o anticorpo âncora é um fragmento Fab específico para cardiolipina. Em outros casos, uma pluralidade de fragmentos Fab produzidos a partir de imunoglobulinas isolado de um ou mais sujeitos infectados com *T. pallidum* servem como anticorpos âncora. Algumas modalidades de dispositivo incluem um antígeno lipoidal que é um antígeno de USR, um antígeno de VDRL, ou um antígeno de VDRL sintético. Em alguns casos (por exemplo, para um dispositivo de fluxo direto), um substrato (tal como uma membrana de nitrocelulose) tem um tamanho de poro de cerca de 0,2 μm a cerca de 8 μm. Em outros casos (por exemplo, para um dispositivo de fluxo lateral), um substrato (tal como uma membrana de nitrocelulose) tem um tamanho de poro até cerca de 12 μm. Em ainda outras modalidades de dispositivo, a área de captura de anticorpo antilipoidal compreende uma ou mais linhas, as quais, em alguns exemplos, podem ter uma largura de cerca de 8 mm a cerca de 15 mm.

Em dispositivos típicos, o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora é imobilizado sobre a membrana por um método envolvendo (a) contactar o antígeno lipoidal com um ou mais anticorpos âncora específicos para no mínimo um entre cardiolipina, lecitina, ou colesterol para formar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora; e (b) aplicar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora à membrana. Em exemplos mais específicos, o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora é imobilizado sobre a membrana por um método envolvendo (i) imobilizar um anticorpo âncora específico para no mínimo um entre cardiolipina, lecitina, ou colesterol sobre a membrana; (ii) bloquear sítios de ligação não específicos sobre a membrana; (iii) contactar o anticorpo âncora imobilizado com antígeno lipoidal para formar um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora; e (iv) lavar a membrana para remover qualquer antígeno lipoidal não ligado.

Exemplos descritos do dispositivo proporcionam um anticorpo

âncora ligado a um epítope que ocorre naturalmente em um componente do antígeno lipoidal (por exemplo, cardiolipina ou colesterol) e não a um grupo derivado introduzido no antígeno para os fins de proporcionar um sítio de ligação para o anticorpo âncora. Por exemplo, o anticorpo âncora não liga a um componente do antígeno lipoidal biotinilado (tal como lecitina ou cardiolipina biotinilada).

Em algumas modalidades, um dispositivo de imunoensaio revelado inclui adicionalmente uma área de captura treponemal tendo ou (a) um antígeno treponemal imobilizado capaz de ser especificamente ligado por um anticorpo anti-*T. pallidum*, ou (b) um anticorpo anti-*T. pallidum* imobilizado que liga especificamente um antígeno treponemal móvel. Nestas modalidades, uma amostra de fluido aplicada na área de aplicação da amostra pode fluir através de ou ao longo da membrana para a área de captura de anticorpo antilipoidal e para a área de captura treponemal.

Também descritos aqui, neste requerimento de patente, são dispositivos de fluxo lateral para determinar a presença e/ou quantidade de um anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido. Estes dispositivos tipicamente incluem uma área de aplicação da amostra e uma área de captura de anticorpo antilipoidal isolada na qual é proporcionado um complexo de anticorpo âncora imobilizado-antígeno lipoidal cujo complexo tem uma afinidade de ligação específica para um anticorpo antilipoidal de fase móvel. Qualquer líquido (tais como uma amostra biológica de fluido) aplicado na área de aplicação da amostra flui ao longo de um caminho de fluxo da área de aplicação da amostra para a área de captura de anticorpo antilipoidal. O caminho de fluxo pode continuar para um bloco absorvente a jusante associado com o dispositivo de fluxo lateral, o qual age, no mínimo em parte, como um reservatório líquido. A formação de um complexo entre o anticorpo antilipoidal e o complexo de antígeno lipoidal imobilizado pode ser detectada para determinar a presença e/ou quantidade de o anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido.

Em algumas modalidades do dispositivo de fluxo lateral, um bloco de conjugado é colocado no caminho de fluxo da área de aplicação da

amostra para a área de captura de anticorpo antilipoidal. O bloco de conjugado inclui um reagente detector móvel ou mobilizável para um anticorpo antilipoidal, de tal modo que o fluxo de líquido através do bloco move o reagente detector para a área de captura de anticorpo antilipoidal. A formação de um complexo entre o reagente detector, anticorpo antilipoidal, e o complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal proporciona um indicador visível ou detectável de modo diverso da presença do anticorpo antilipoidal em uma amostra biológica. Em modalidades alternativas, o reagente detector não é suprido em um bloco de conjugado, mas ao invés é aplicado à membrana microporosa, por exemplo de um frasco de revelador.

Exemplos de um reagente detector incluem uma Proteína A marcada, Proteína G, ou anticorpo anti-humano, em que a etiqueta é uma ou mais de uma enzima, partícula de ouro coloidal, partícula de látex colorida, partícula de prata adsorvida a proteína, partícula de ferro adsorvido a proteína, partícula de cobre adsorvido a proteína, partícula de selênio adsorvido a proteína, partícula de enxofre adsorvido a proteína, partícula de telúrio adsorvido a proteína, partícula de carbono adsorvido a proteína, ou saco de corante acoplado a proteína.

Algumas modalidades do dispositivo de fluxo lateral também incluem uma área de captura treponemal no caminho de fluxo da área de aplicação da amostra. A área de captura treponemal referida pode incluir, por exemplo, um antígeno treponemal imobilizado tendo uma afinidade de ligação para um anticorpo anti-*T. pallidum* móvel ou um anticorpo anti-*T. pallidum* imobilizado tendo uma afinidade de ligação para um organismo de *T. pallidum* móvel ou antígeno de *T. pallidum*. O dispositivo de fluxo lateral também pode ter um reagente detector móvel ou mobilizável específico para o anticorpo treponemal no bloco do conjugado. O reagente detector para o anticorpo treponemal pode estar no mesmo ou em um bloco diferente do reagente detector para o anticorpo antilipoidal. Em modalidades particulares, um reagente detector específico para um anticorpo anti-*T. pallidum* compreende Proteína A conjugada a ouro, Proteína G Fc-específica conjugada a ouro, ou anticorpo anti-humano conjugado de ouro (porção Fc). Em

outras modalidades, uma área de captura treponemal pode incluir um anticorpo anti-treponemal para captura de um antígeno treponemal móvel presente em uma amostra de fluido. Em tais modalidades, um reagente detector para o antígeno treponemal móvel pode ser um anticorpo anti-antígeno treponemal marcado com ouro.

Os dispositivos de imunoensaio descritos (por exemplo, dispositivo de fluxo direto ou de fluxo lateral) podem ser usados em métodos para detectar anticorpos antilipoidais e/ou diagnosticar sífilis em um sujeito aplicando uma amostra biológica (tal como, sangue, soro, exudado de úlcera de pele, urina, saliva, ou escarro) de um sujeito a um dispositivo revelado e detectando a formação de um complexo entre o anticorpo antilipoidal, o complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal, e um reagente detector de anticorpo antilipoidal na área de captura. A detecção da formação do complexo na área de captura detecta um anticorpo antilipoidal associado com infecção por *T. pallidum* ou a doença sífilis. Nestas modalidades nas quais o dispositivo inclui um bloco de conjugado no caminho de fluxo da área de aplicação da amostra para a área de captura de cardiolipina, o complexo detectado inclui o detector móvel ou mobilizável. Em outras modalidades nas quais o reagente detector é aplicado ao dispositivo a partir de uma fonte externa, o complexo detectado inclui o detector aplicado externamente. Em algumas modalidades, um reagente detector é Proteína A marcada, Proteína G Fc-específica, ou anticorpo anti-humano.

Em modalidades particularmente vantajosas do método, o dispositivo revelado é capaz de detectar tanto os anticorpos antilipoidais (os quais, por exemplo, são um indicador de infecção ativa) quanto anticorpos anti-treponemais (os quais, por exemplo, verificam a reatividade do teste não treponemal). Nestas modalidades do dispositivo as quais incluem o antígeno treponemal, o método inclui detectar a formação de um complexo entre o anticorpo anti-*T. pallidum*, o antígeno treponemal imobilizado, e um reagente detector na área de captura. Conforme com o reagente detector usado para anticorpos antilipoidais, o reagente detector para os anticorpos treponemais podem ser proporcionados sobre o dispositivo ou aplicados a partir de uma

fonte externa.

Também são descritos aqui, neste requerimento de patente, métodos para imobilizar cardiolipina imunorreativa sobre um suporte sólido (tal como, nitrocelulose). Os métodos referidos envolvem (a) contactar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina imunorreativa, com um ou mais anticorpos específicos a no mínimo um componente do antígeno lipoidal para formar um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo; e (b) aplicar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo a um suporte sólido; em que a aplicação do complexo de antígeno lipoidal-anticorpo ao suporte sólido imobiliza a cardiolipina imunorreativa sobre o suporte sólido. Em exemplos particulares, o antígeno lipoidal é um antígeno de USR, um antígeno de VDRL, ou um antígeno de VDRL sintético. Em outros exemplos, o anticorpo é um fragmento de anticorpo que não reagirá substancialmente com Proteína A, Proteína G Fc-específica, ou anticorpo anti-humano (porção Fc) (tal como, um fragmento Fab). Em ainda outros exemplos, o anticorpo é isolado do soro de um sujeito infectado com *T. pallidum* ou inoculado com *T. pallidum*.

Outros métodos típicos para imobilizar cardiolipina imunorreativa sobre um suporte sólido, envolvem (a) imobilizar um ou mais anticorpos específicos para cardiolipina, lecitina e/ou colesterol sobre um suporte sólido; (b) bloquear sítios de ligação não específicos sobre o suporte sólido; (c) aplicar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina imunorreativa, lecitina e/ou colesterol, ao suporte sólido para formar complexos de antígeno lipoidal-anticorpo imobilizado; e (d) lavar o suporte sólido para remover qualquer antígeno lipoidal que é não ligado especificamente por um ou mais anticorpos imobilizados.

Também descritos aqui, neste requerimento de patente, são kits para o diagnóstico de sífilis. Estes kits incluem um dispositivo revelado (tal como um dispositivo de fluxo direto ou de fluxo lateral) e instruções para aplicar a amostra biológica à área de aplicação da amostra ou do dispositivo. O kit também pode incluir instruções para interpretar resultados do teste.

Os dispositivos descritos também podem ser usados em métodos para diagnosticar lúpus em um sujeito analisando uma amostra biológica

do sujeito, aplicando a amostra biológica ao dispositivo e detectando a formação de um complexo entre o anticorpo antilipoidal, o complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal, e um reagente detector na área de captura. A detecção da formação do complexo na área de captura detecta um anticorpo antilipoidal associado com lúpus. Em alguns casos, um ou mais co-fatores (tais como β_2-glicoproteína I) estão presentes (tal como, adicionados a uma amostra) para a detecção de lúpus.

II. Abreviações e Termos

Ab	anticorpo
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
LFD	Dispositivode fluxo lateral
PEG	polietileno glicol
PVA	álcool polivinílico
PVDF	fluoreto de polivinilideno
PVP	polivinila pirrolidona
SDS	dodecila sulfato de sódio
USR	recuperação de soro não aquecido

A menos que mencionado de modo diverso, os termos técnicos são usados de acordo com a utilização convencional. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado pela Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado pela Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology e Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado pela VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

De modo a facilitar a revisão das várias modalidades da invenção, são proprocionadas as seguintes explicações de termos específicos:

Analite: Um alvo, tal como um átomo, molécula, grupo de moléculas ou composto de origem natural ou sintética (por exemplo, fármaco, hormônio, enzima, antígeno de fator de crescimento, anticorpo, hapteno, lectina, apoproteína, ou cofator) que deve ser detectado ou medido que é capaz de ligar especificamente a antígenos lipoidais imobilizados descritos aqui, neste re-

querimento de patente. Analites podem incluir, mas não estão limitados a analites biológicos, anticorpos, fármacos, hormônios, antígenos, haptenos, lectinas, apoproteínas, ou cofatores. Em algumas modalidades, o analite inclui anticorpos, tais como anticorpos antilipoidais (por exemplo, anticorpos anti-cardiolipina), produzidos em resposta a infecção por *T. pallidum*. Em outras modalidades, o analite inclui anticorpos antilipoidais produzidos em resposta a qualquer de (i) uma doença autoimune, tal como lúpus, (ii) vários distúrbios trombóticos venosos e arteriais, inclusive enfarte cerebral, (iii) trombose venosa profunda, (iv) trombocitopenia

Anticorpo: Uma proteína consistindo em um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina ou fragmentos de genes de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem os genes das regiões constantes kappa, lâmbda, alfa, gama, delta, épsilon e mu, bem como a miríade de genes de regiões variáveis de imunoglobulina. Cadeias leves são classificadas como ou kappa ou lâmbda. Cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou épsilon, as quais por sua vez definem as classes de imunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

A unidade estrutural de imunoglobulina básica (anticorpo) geralmente é um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeos, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kD) e uma "pesada" (cerca de 50-70 kD). O N-término de cada cadeia define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos essencialmente responsáveis por reconhecimento antigênico. Os termos "cadeia leve variável" (V_L) e "cadeia pesada variável" (V_H) se referem, respectivamente, a estas cadeias leves e pesadas.

Anticorpos são produzidos naturalmente em plantas e animais em resposta a antígenos apresentados ao sistema imune. Anticorpos produzidos naturalmente podem ser encontrados, por exemplo, no soro de um animal. Por exemplo, uma pessoa infectada com *T. pallidum* tipicamente produzirá anticorpos no mínimo contra antígenos de *T. pallidum* e anticorpos contra material lipoidal que resulta da infecção treponemal (por exemplo,

anticorpos antilipoidais), por exemplo, de células hospedeiras danificadas pela infecção.

Anticorpos podem existir como imunoglobulinas intactas ou como uma série de fragmentos bem caracterizados produzidos por digestão com várias peptidases ou por métodos de DNA recombinante. Fragmentos de anticorpos típicos incluem, por exemplo, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, dAb, regiões determinantes de complementaridade (CDR), e anticorpos de cadeia única (scFv). Um fragmento Fab é um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; um fragmento $F(ab')_2$ é um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab encadeados por uma ponte dissulfeto na região de articulação; um fragmento Fd consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consiste dos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb consiste em um domínio VH (vide, por exemplo, Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546, 1989; *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y., 1993).

Apesar de alguns fragmentos de anticorpos serem definidos em termos da digestão de um anticorpo intacto, será reconhecido que fragmentos Fab ou outros fragmentos de anticorpos podem ser sintetizados de novo ou quimicamente ou utilizando metodologia de DNA recombinante. Portanto, o termo anticorpo conforme usado aqui, neste requerimento de patente, também inclui fragmentos de anticorpos ou produzidos pela modificação de anticorpos inteiros ou sintetizados de novo usando metodologias de DNA recombinante.

Antígeno: Um composto químico ou bioquímico, composição, estrutura, determinante, antígeno ou porção do mesmo que pode estimular a produção de anticorpos ou uma resposta de células T em um animal, incluindo composições que são injetadas ou absorvidas em um animal. Um antígeno reage com os produtos de imunidade humoral ou celular específice, incluindo as induzidas por imunogênios heterólogos. O termo "antígeno" inclui todos os epítopes antigênicos relacionados.

Soro hiperimune [Antígeno-específico] : Anti-soro policlonal tendo especificidade para um antígeno em particular (tal como, um antígeno lipoidal e/ou

cardiolipina), cujo anti-soro é produzido em um sujeito em resposta a ataque repetido (por exemplo, por injeção, infecção ou outra via) com o antígeno de interesse (ou um organismo ou outra composição contendo ou produzindo o antígeno de interesse).

Anticorpo antilipoidal: Um anticorpo (tal como IgM ou IgG) tendo especificidade para um antígeno lipoidal (vide abaixo). Em alguns casos, anticorpos antilipoidais são produzidos pelo sistema imune de um sujeito (tal como um ser humano) em resposta a um estado de doença, tal como uma infecção microbiana (por exemplo, bacteriana). Por exemplo, este termo contempla anticorpos antilipoidais produzidos em conseqüência de infecção por *T. pallidum*. Embora não limitado pela teoria, imagina-se que anticorpos antilipoidais em sujeitos infectados com *T. pallidum* são produzidos em conseqüência de lipídeos liberados de células hospedeiras e/ou material semelhante a lipoproteínas e possivelmente cardiolipina liberada por treponemas. Anticorpos antilipoidais também podem ser produzidos em resposta a doenças nãois, incluindo, por exemplo (i) uma doença autoimune, tal como lúpus (Harris *et al.*, *Clin. Rheum. Dis.*, 11:591-609, 1985), (ii) vários distúrbios trombóticos venosos e arteriais, incluindo enfarte cerebral (Harris *et al.*, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2:47-51, 1984), (iii) trombose venosa profunda (Mueh *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 92:156-159, 1980), (iv) trombocitopenia (Harris *et al.*, *Clin. Rheum. Dis.*, 11:591-609, 1985), (v) embolismo pulmonar (Anderson e Ali, *Ann. Rheum. Dis.*, 43:760-763, 1984), ou (vi) perda fetal recorrente com enfarte placentário (Derue *et al.*, *J. Obstet. Gynaecol.*, 5:207-209, 1985). Anticorpos antilipoidais encontrados em doenças não treponemais podem ligar especificamente um antígeno lipoidal na presença de um ou mais co-fatores (tais como β_2-glicoproteína I).

Anticorpos antilipoidais para uso em algumas modalidades dos métodos e composições (por exemplo, dispositivos) descritos aqui, neste requerimento de patente, pode ser de qualquer origem, mas freqüentemente serão encontrados no soro de um sujeito.

Afinidade de ligação: Um termo que se refere à força de ligação de uma molécula a outra em um sítio sobre a molécula. Se uma molécula em parti-

cular ligará a ou especificamente associará com outra molécula em particular, diz-se que estas duas moléculas apresentam afinidade de ligação uma pela outra. A afinidade de ligação está relacionada com a constante de associação e constante de dissociação por um par de moléculas, mas não é crucial para a invenção que estas constantes sejam medidas ou determinadas. Ao invés, afinidades conforme usado aqui, neste requerimento de patente, para descrever interações entre moléculas dos métodos e dispositivos descritos são geralmente afinidades aparentes (a menos que especificado de modo diverso) observadas em estudos empíricos, os quais podem ser usados para comparar a força relativa com a qual uma molécula (por exemplo, um anticorpo ou outro parceiro de ligação específico) ligará duas outras moléculas (por exemplo, um analite e um conjugado analite-traçador). Os conceitos de afinidade de ligação, constante de associação e constante de dissociação são de conhecimento geral.

Amostra Biológica: Qualquer amostra que pode ser obtida diretamente ou indiretamente de um sujeito, inclusive sangue total, plasma, soro, lágrimas, muco, saliva, urina, fluido pleural, fluido espinal, fluido gástrico, suor, sêmen, secreção vaginal, escarro, fluido de úlceras e/ou outras erupções superficiais (tais como bolhas, ou abscessos), fluido amniótico, fluido sinovial, fluido cerebroespinal, e/ou extratos de tecidos, células ou órgãos. A amostra biológica também pode ser uma amostra de pesquisa laboratorial tal como um sobrenadante da cultura celular. A amostra é coletada ou obtida usando métodos de conhecimento geral daqueles versados na técnica.

Área de Captura: Uma região de um dispositivo de imunoensaio (tal como um dispositivo de fluxo direto ou um dispositivo de fluxo lateral) onde um reagente de captura (tal como um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal) é imobilizado. Um dispositivo de imunoensaio pode ter mais de uma área de captura, por exemplo, uma "**área de captura primária**," uma "**área de captura secundária**," e assim por diante. Freqüentemente um reagente de captura diferente será imobilizado nas áreas de captura primária, secundária, ou diversa. Múltiplas áreas de captura pode ter qualquer orientação com respeito umas às outras sobre o substrato; por exemplo, uma área de

captura primária pode ser distal ou proximal a uma área de captura secundária (ou diversa) e vice-versa. Alternativamente, uma área de captura primária e uma área de captura secundária (ou diversa) podem ser orientadas perpendicularmente uma à outra de tal modo que as duas (ou mais) áreas de captura formam uma cruz ou um sinal de mais ou outro símbolo.

Área de Captura de Anticorpo Antilipoidal: Uma área de captura em que um antígeno capaz de ser especificamente ligado por um anticorpo antilipoidal (tal como um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora) é imobilizado como o reagente de captura.

Conjugado: Quando usado na forma de verbo, o termo "conjugado" significa a ligação de uma molécula (por exemplo, Proteína A, Proteína G, ou anticorpo de IgG anti-humana (Fc)) a outra molécula (por exemplo, ouro coloidal). A ligação referida pode envolver interações covalentes ou não covalentes (tais como eletrostáticas ou diversas) entre os componentes do conjugado. A ligação referida pode ser realizada por meios químicos, quer com ou sem o uso de um grupo de ligação. Quando usado na forma de substantivo, o termo "conjugado" significa um complexo molecular acoplado formado por conjugação.

Detectar ou Detecção: Refere-se a determinar quantitativamente ou quantitativamente a presença do um ou mais analites sob investigação (por exemplo, anticorpos antilipoidais e/ou anticorpos anti-*T. pallidum* ou antígenos treponemais). "**Detectar a Formação de um Complexo**" se refere a detectar um complexo compreendendo um reagente detector por qualquer método adequado para observar a etiqueta particular associada com o reagente detector; por exemplo, observação visual de uma etiqueta colorida (ou visível de modo diverso), medição ou detecção visual de uma etiqueta fluorescente, quimiluminescente ou radioativa.

Reagente Detector (ou Agente de Detecção): Um reagente (ou série de reagentes) que permite a detecção específico de um complexo entre um analite (tal como um anticorpo antilipoidal) e um reagente de captura (tal como complexos de anticorpo âncora-antígeno lipoidal). Descrição adicional de reagentes detectores e reagentes detectores típicos específicos são propor-

cionados abaixo.

Emulsão: Uma mistura de dois fluidos imiscíveis nos quais uma fase está presente como uma dispersão coloidal na outra fase, a qual é referida como a fase contínua, dispersante ou solvente. Algumas emulsões prontamente se separarão quando forem deixadas em repouso impassível. Outras emulsões podem permanecer misturadas por extensões de tempo consideráveis.

Epítope (ou determinante antigênico): Um local sobre a superfície de um molécula de antígeno à qual uma molécula de anticorpo liga; geralmente um antígeno tem vários ou muitos diferentes determinantes antigênicos e reage com anticorpos de muitras especificidades diferentes. Um "**epítope exógeno**" é um epítope que não é encontrado naturalmente em molécula de antígeno de interesse e o qual é tipicamente adicionado à molécula de antígeno para servir como um sítio de ligação para um anticorpo específico para (ou outro parceiro de ligação específico de) o epítope exógeno. Uma molécula de antígeno pode ser modificada quimicamente ou de modo diverso para incluir um epítope exógeno. Por exemplo, uma molécula de antígeno pode ser biotinilada (isto é, derivada com biotina) deste modo produzindo um epítope de biotina exógeno que pode ser ligado especificamente por um anticorpo anti-biotina ou outro parceiro de ligação biotina-específico (tal como, avidina ou estrepavidina). Em algunas casos, um epítope exógeno é uma "etiqueta de epítope." Etiquetas de epítopes incluem seqüências de peptídeos (tipicamente menos de cerca de 15 aminoácidos, mas podem ser mesmo seqüências de proteína de extensão total) às quais um anticorpo pode ligar especificamente. Etiquetas de epítopes comumente conhecidas incluem hexa-His, octa-His, FLAG, HA, e numerosas outras.

Imunogenicidade: A propriedade de ser capaz de provocar uma resposta imune dentro de um organismo. Por exemplo, cardiolipina retém imunogenicidade quando um anticorpo antilipoidal tem a capacidade de ligar um epítope presente na cardiolipina.

Etiqueta: Qualquer molécula ou composição ligada a um analite, análogo de analite, reagente detector, ou parceira de ligação que é detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, elétricos, óti-

cos ou químicos. Foram descritos exemplos de etiquetas, incluindo enzimas, partículas de ouro coloidal, partículas de látex coloridas (Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.275.149; 4.313.734; 4.373.932; e 4.954.452, cada uma incorporada por meio de referência aqui, neste requerimento de patente). Exemplos adicionais de etiquetas úteis incluem, sem limitação, isótopos radioativos, co-fatores, aglutinantes, agentes quimiluminescentes ou fluorescentes, partículas de prata adsorvidas a proteína, partículas de ferro adsorvidas a proteína, partículas de cobre adsorvidas a proteína, partículas de selênio adsorvidas a proteína, partículas de enxofre adsorvidas a proteína, partículas de telúrio adsorvidas a proteína, partículas de carbono adsorvidas a proteína, e sacos de corante acoplados a proteína. A fixação de um composto (por exemplo, um reagente detector) a uma etiqueta pode ser através de ligações covalentes, processos de adsorção, ligações hidrofóbicas e/ou eletrostáticas, como em quelatos e semelhantes, ou combinações destas ligações e interações e/ou pode envolver um grupo de ligação.

Antígeno Lipoidal: Um antígeno incluindo (mas não limitado a) cardiolipina, lecitina e colesterol que é capaz de ser especificamente ligado por anticorpos antilipoidais. A natureza da cardiolipina, da lecitina e do colesterol conforme contemplado pelo termo "antígeno lipoidal" é discutida em detalhes alhures no relatório descritivo.

Membrana microporosa: Uma película ou estrutura fina tendo poros de tamanho microscópico. Membranas microporosas no mínimo permitem que fluidos e analites solúveis passem ao longo ou através da membrana, por exemplo, por ação capilar. As membranas são feitas de uma ampla variedade de materiais ou compostos de materiais, incluindo, por exemplo, polietersulfona, náilon, policarbonato, poliéster, acetato de celulose, ésteres celulósicos mistos, fluoreto de polivinilideno, e/ou nitrocelulose. Tamanhos de poros adequados não limitantes podem ser até cerca de 0,22 mícron, de cerca de 0,22 mícron a cerca de 0,45 mícron, de cerca de 0,22 mícron a cerca de 0,65 mícron, de cerca de 0,22 micro a cerca de 0,8 mícron, de cerca de 0,22 mícron a cerca de 1,2 mícron, de cerca de 0,65 mícron a cerca de 3 micra, de cerca de 0,65 mícron a cerca de 5 mícron, de cerca de 0,65 mícron a cer-

ca de 8 micra, de cerca de 5 micra a cerca de 10 micra, ou de cerca de 5 micra a cerca de 20 micra. Em casos particulares, o tamanho de poro pode ser cerca de 0,22 mícron, cerca de 0,45 mícron, cerca de 0,65 mícron, cerca de 0,8 mícron, cerca de 1,2 mícron, cerca de 3 micra, cerca de 5 micra, cerca de 8 micra, cerca de 10 micra, ou cerca de 20 micra. Qualquer membrana conhecida por aqueles versados na técnica adequada para dispositivos de fluxo lateral ou de fluxo direto é prevista como estando dentro do escopo do termo "membrana microporosa."

Proteína A e Proteína G: Proteína A é uma proteína isolada do *Staphylococcus aureus*. Proteína G é uma proteína isolada de uma *Streptococcus species*. Ambas as proteínas têm sítios de ligação para a porção Fc da IgG de mamífero. A Proteína G nativa também contém sítios de ligação para albumina, a região Fab de Igs, e regiões de ligação de membrana, as quais podem levar a ligação não específica; no entanto, Proteína G recombinante foi produzida para eliminar a albumina, Fab, e sítios de ligação de membrana ao mesmo tempo que retendo o sítio de ligação de Fc, o que o torna específico para a porção Fc de IgG. Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, "Proteína G" se refere à forma recombinante Fc-específica de Proteína G (também referida como "Proteína G Fc-específica").

Parceiro de ligação específico (ou parceiro de ligação): Uma molécula ou composição capaz de reconhecer e ligar a um aspecto estrutural específico de outra molécula ou composição. 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, carboodrato/lectina, biotina/(estrept)avidina, e vírus/receptor celular.

A expressão "liga especificamente a" se refere à capacidade de uma primeira espécie molecular (tal como um anticorpo) para ligar preferencialmente a uma segunda espécie molecular (tal como um antígeno reconhecido pelo anticorpo) em comparação com outra espécie molecular não específica. Por conseguinte, a expressão "capaz de ser especificamente ligada por" se refere à capacidade de uma primeira espécie molecular (tal como um antígeno)

para ser preferencialmente reconhecida e ligada por uma segunda espécie molecular (tal como um anticorpo específico para o antígeno) em comparação com outra espécie molecular não específica.

Sujeito: Organismos multi-celulares vivos, incluindo organismos vertebrados, uma categoria que inclui tanto mamíferos humanos quanto não humanos.

A menos que explicado de modo diverso, todos os termos técnicos e científicos usados aqui, neste requerimento de patente, têm o mesmo significado conforme entendido comumente por uma pessoa de conhecimento regular da técnica à qual pertence esta invenção. Os termos singulares "um," "uma," e "o", "a" incluem referentes plurais a menos que o contexto indique claramente de modo diverso. Similarmente, a palavra "ou" pretende incluir "e" a menos que o contexto indique claramente de modo diverso. Portanto "compreendendo A ou B" significa "incluindo A ou B," ou "incluindo A e B." Adicionalmente deve ser entendido que todos os valores de peso molecular ou massa molecular são aproximados e são proporcionados somente para descrição. Métodos e materiais adequados usados na prática ou na experimentação do assunto em questão revelado são descritos abaixo; no entanto, os materiais e métodos referidos são somente ilustrativos e não pretendeem ser limitantes. Também podem ser usados métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui, neste requerimento de patente. Todas as publicações, requerimentos de patente, patentes, e outras referências mencionadas aqui, neste requerimento de patente, são incorporadas por meio de referência em sua totalidade na extensão permitida pelos regulamentos aplicáveis. No caso de conflito, a presente especificação, incluindo explicações de termos, controlará.

III. Antígeno Lipoidal

Um antígeno lipoidal é qualquer antígeno contendo (sem limitação) cardiolipina, lecitina e colesterol, cujo antígeno é capaz de ligar especificamente um anticorpo antilipoidal. Em alguns exemplos, um antígeno lipoidal liga especificamente um anticorpo antilipoidal (por exemplo, um anticorpo anti-cardiolipina) presente em um sujeito infectado com *T. pallidum* (tal co-

mo, um ser humano). Antígenos lipoidais compreendendo cardiolipina (CL), lecitina (L) e colesterol (Ch) forem usados por muito tempo em provas de solução para detectar anticorpos antilipoidais no soro (vide, por exemplo, a discussão anterior de "testes não treponemais" para diagnóstico de sífilis). Antígenos lipoidais contendo CL/L/Ch específicos típicos previamente usados em provas de solução incluem os antígeno de VDRL, RPR, e USRs comumente conhecidos (por exemplo, Teste de Lâmina de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), em: Larsen *et al.* (ed.), *A Manual of Tests for Syphilis*, 9th Edition, Washington D.C.:American Public Health Association, 1998, pp. 157-178; Pettit *et al.*, "Unheated serum reagin [USR] test as a quantitative test for syphilis," *J. Clin. Microbiol.*, 15(2): 238–242, 1982), e uma forma sintética do antígeno de VDRL ("VDRL sintético") descrita por Castro *et al.* (*Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 7(4):658-661, 2000). Infelizmente, a natureza lipoidal de semelhantes antígenos tornou difícila fixar de modo confiável quaisquer destes antígenos a um suporte sólido, tal como uma membrana bíbula (por exemplo, microporosa), como nitrocelulose ou outras. Por conseguinte, tem havido uma necessidade existente há muito tempo (mas previamente não satisfeita) de proporcionar provas à base de membrana (tal como, dispositivos de fluxo direto ou de fluxo lateral de imunoensaio) para detecção de anticorpos antilipoidais, por exemplo, em amostras biológicas. Os dispositivos de imunoensaio referidos revolucionariam, por exemplo, o diagnóstico de ponto de atendimento de sífilis e outras doenças caracterizadas pela presença de anticorpos antilipoidais. Esta descoberta descreve, entre outras coisas, um método para imobilizar antígenos lipoidais, tais como os antígenos de VDRL, USR, ou VDRL Sintético, a suportes membranosos; portanto, proporcionando um meio para satisfazer uma necessidade existente há muito tempo na técnica.

Conforme discutido acima, métodos e composições descritos aqui, neste requerimento de patente, contemplam um antígeno lipoidal que inclui (por exemplo, compreende ou consiste essencialmente de) cardiolipina, colesterol e lecitina. Estes componentes típicos de um antígeno lipoidal são descritos em mais detalhes abaixo.

A. Cardiolipina

Cardiolipina é difosfatidila glicerol (especificamente, 1,3-difosfatidilglicerol), na qual tem uma cadeia principal 1,3-difosfatidilglicerol), na qual tem uma cadeia principal consistindo em trÊs moléculas de glicerol unidas por duas pontes de fosfodiéster. Os quatro hidroxila das porções de gliceros cardiolipina externa são cada uma esterificada com uma cadeia de ácido graxo saturado ou insaturado (tipicamente de 14 a 18 carbonos de extensão). Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, o termo "cardiolipina" contempla 1,3-difosfatidilglicerol tendo qualquer distribuição de cadeias laterais de ácido graxo. Portanto, as quatro cadeias laterais de ácido graxo de cardiolipina pode variar independentemente da extensão (por exemplo, a partir de cerca de 14 a cerca de 25 carbonos, de cerca de 14 a cerca de 22 carbonos, de cerca de 14 a cerca de 20 carbonos, de cerca de 14 a cerca de 18 carbonos, ou de cerca de 14 a cerca de 16 carbonos) e/ou grau de saturação (por exemplo, a partir de completamente saturado até tendo cerca de 6 ligações duplas, a partir de completamente saturado até tendo cerca de 4 ligações duplas, ou a partir de completamente saturado até tendo cerca de 2 ligações duplas). Cadeias laterais de ácido graxo típicas de cardiolipina, conforme contemplado aqui, neste requerimento de patente, incluem de modo independente miristoila (14:0); palmitoila (16:0); estearoila (18:0); oleoila (18:1); miristoleoila (14:1); palmitoleoila (16:1); petroselinoila (18:1); linoleoila (18:2); linolenoila (18:3); eicosenoila (20:1); araquidonoila (20:4); erucoila (22:1); DHA (22:6); ou nervonoila (24:1).

Em algumas modalidades, cardiolipina é uma forma de cardiolipina que ocorre naturalmente. A composição de ácido graxo de cardiolipina que ocorre naturalmente é geralmente distribuída de acordo com uma ampla variedade de ácidos graxos que ocorrem naturalmente tais como palmitoila (16:0); estearoila (18:0); oleoila (18:1); e linoleoila (18:2). A espécie molecular de ácido graxo mais abundante em formas de cardiolipina que ocorrem naturalmente são ácido linoléico a 90%, seguido por ácido oléico a 5%, e ácido palmítrico a 1%. Em outras modalidades, cardiolipina é uma forma que

não ocorre naturalmente (também referida como "cardiolipina sintética"). Exemplos não limitantes de cardiolipina sintética incluem, por exemplo, tetramiristoila cardiolipina, tetraoleoila cardiolipina, ácido tetramiristoila-bis-(L-α-glicerila) fosfórico, sal dissódico de éter benzílico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-1,3 glicerol, sal dissódico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-I,5 pentanodiol, sal dissódico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-1,3 propanodiol, sal dissódico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-1,4 butanodiol, sal dissódico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-1,2 etanodiol, sal dissódico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-metanodiol, sal dissódico de bis (dipalmitoila D,L-α-glicerilfosforila)-1,3 glicerol, sal dissódico de bis (benzilfosforila)-I,3-propanodiol, ou ácido D,L-α-dipalmitoila bis-fosfatídico.

"Cardiolipina imunorreativa" é qualquer forma de cardiolipina (por exemplo, cardiolipina que ocorre naturalmente ou sintética) que reage especificamente com anticorpos antilipoidais, tais como anticorpos antilipoidais presentes em um sujeito tendo sífilis ou infectado com *T. pallidum*.

B. Leticina

Lecitina é o nome comum para fosfatidilcolina. Fosfatidilcolina [e um glicerofosfolipídeo, o qual é geralmente o fosfolipídeo mais abundante em plantas e animais. É um bloco de construção chave de bicamadas de membrana, e é também o principal fosfolipídeo circulante no plasma. Fosfatidilcolina contém duas cadeias laterais de ácido graxo. Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, o termo "lecitina" contempla fosfatidilcolina tendo qualquer distribuição de cadeias laterais de ácido graxo. Portanto, as duas cadeias laterais de ácido graxo de cardiolipina pode variar independentemente da extensão (por exemplo, a partir de cerca de 14 a cerca de 25 carbonos, de cerca de 14 a cerca de 22 carbonos, de cerca de 14 a cerca de 20 carbonos, de cerca de 14 a cerca de 18 carbonos, ou de cerca de 14 a cerca de 16 carbonos) e/ou grau de saturação (por exemplo, a partir de completamente saturado até tendo cerca de 6 ligações duplas, a partir de completamente saturado até tendo cerca de 4 ligações duplas, ou a partir de completamente saturado até tendo cerca de 2 ligações duplas). Cadeias la-

terais típicas de ácido graxo de lecitina, conforme contemplado aqui, neste requerimento de patente, incluem de modo independente miristoila (14:0); palmitoila (16:0); stearoila (18:0); oleoila (18:1); miristoleoila (14:1); palmitoleoila (16:1); petroselinoila (18:1); linoleoila (18:2); linolenoila (18:3); eicosenoila (20:1); araquidonoila (20:4); erucoila (22:1); DHA (22:6); ou nervonoila (24:1).

Em algumas modalidades, lecitina é uma forma de lecitina que ocorre naturalmente. A composição de ácido graxo de lecitina que ocorre naturalmente inclui palmitoila (16:0), palmitoleoila (16:1), linoleoila (18:2), estearoila (18:0), araquidonoila (20:4), miristoila (14:0), oleoila (18:1), e linolenoila (18:3). As percentagens relativas de ácidos graxos em lecitina que ocorre naturalmente variam dependendo da fonte da lecitina (por exemplo, Balint *et al.*, *J. Lipid Res.*, 6(1):96, 1965). Por exemplo, lecitina na bile da vesícula biliar humana é reportada como sendo cerca de 45% 16:0, 4% 16:1, 4% 18:0, 16% 18:1, 23% 18:2, 4% 20:4 com traços de 18:3 e 14:0; e lecitina no plasma humano é reportado como sendo cerca de 35% 16:0, 1% 16:1, 14% 18:0, 17% 18:1, 17% 18:2, 14% 20:4 com traços de 18:3 e 14:0. Em outras modalidades, lecitina é uma forma que não ocorre naturalmente (também referida como "lecitina sintética").

Exemplos não limitantes de lecitina incluem, por exemplo:

Número de Carbono	**1-Acila**	**2-Acila**
14:0-14:0	Miristoila	Miristoila
14:0-16:0	Miristoila	Palmitoila
14:0-18:0	Miristoila	Estearoila
16:0-14:0	Palmitoila	Miristoila
16:0-16:0	Palmitoila	Palmitoila
16:0-18:0	Palmitoila	Estearoila
16:0-18:1	Palmitoila	Oleoila
16:0-18:2	Palmitoila	Linoleoila
16:0-20:4	Palmitoila	Araquidonoila
16:0-22:6	Palmitoila	Docosahexaenoila
18:0-14:0	Estearoila	Miristoila

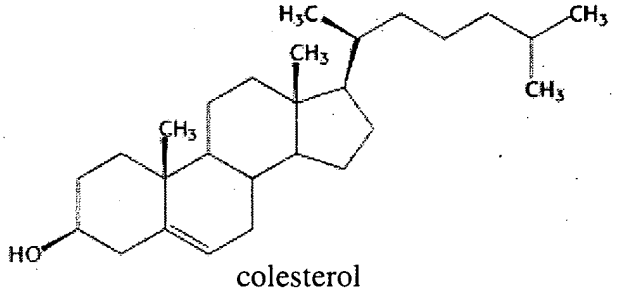
Número de Carbono	1-Acila	2-Acila
18:0-16:0	Estearoila	Palmitoila
18:0-18:0	Estearoila	Estearoila
18:0-18:1	Estearoila	Oleoila
18:0-18:2	Estearoila	Linoleoila
18:0-20:4	Estearoila	Araquidonoila
18:0-22:6	Estearoila	Docosahexaenoila
18:1-14:0	Oleoila	Miristoila
18:1-16:0	Oleoila	Palmitoila
18:1-18:0	Oleoila	Estearoila
14:1-14:1	Miristoleoila	Miristoleoila
14:1-14:1	Miristelaidoila	Miristelaidoila
16:1-16:1	Palmitoleoila	Palmitoleoila
16:1-16:1	Palmitelaidoila	Palmitelaidoila
18:1-18:1	Petroselinoila	Petroselinoila
18:1-18:1	Oleoila	Oleoila
18:1-18:1	Elaidoila	Elaidoila
18:2-18:2	Linoleoila	Linoleoila
18:3-18:3	Linolenoila	Linolenoila
20:1-20:1	Eicosenoila	Eicosenoila
20:4-20:4	Araquidonoila	Araquidonoila
22:1-22:1	Erucoila	Erucoila
22:6-22:6	DHA	DHA
24:1-24:1	Nervonoila	Nervonoila

Outros exemplos de lecitina em particular incluem, sem limitação, DL-α-dimiristoila lecitina, L-α-dimiristoila cefalina, L-α-dipalmitoila lecitina, sal de monocolina de ácido dipalmitoila L-α-glicerofosfórico, L-α-dimiristoila lecitina, D-α-dimiristoila lecitina, L-α-distearoila lecitina, estearoila glicollecitina, 1,2-dioleoila-sn-glicero-3-fosfocolina (18:1), 1,2-dilino1eoila-sn-glicero-3-fosfocolina (18:2), 1,2-dimiristoi1-sn-glicero-3-fosfocolina (14:0), 1,2-dipentadecanoila-sn-glicero-3-fosfocolina (15:0), 1,2-difitanoila-

sn-glicero-3-fosfocolina (16:0), 1,2-dipalmitoila-sn-glicero-3-fosfocolina (16:0), e 1-palmitoila-2-oleoila-*sn*-glicero-3-fosfocolina.

C. Colesterol

Colesterol é um esteróide tendo, em uma modalidade, a seguinte estrutura:



colesterol

Sabe-se que o colesterol interage com fosfolipídeos (tais como, cardiolipina e lecitina) em membranas ou estruturas semelhantes a membrana (tais como lipossomas ou micelas). Nestas circunstâncias, acredita-se que a molécula de colesterol seja orientada paralela às cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos, e o grupo oxidrila do colesterol interage com os grupos de cabeça dos fosfolipídeos.

Na formação dos antígenos lipoidais descritas aqui, neste requerimento de patente, acredita-se que o colesterol estabilize a emulsão (por exemplo, micela). Portanto, para os fins desta descoberta, o termo "colesterol" inclui qualquer forma de colesterol ou outro derivado do colesterol que tenha a capacidade de estabilizar uma emulsão a qual contenha um antígeno lipoidal. Em alguns exemplos, estabilizar uma emulsão contendo antígeno lipoidal se refere a prolongar o tempo que um antígeno lipoidal emulsificado permanece em solução. Por exemplo, a adição de colesterol a um antígeno lipoidal pode prolongar o tempo que um antígeno semelhante permanece dispersado em uma fase contínua de uma emulsão (tal como, em uma solução etanólica) por 5%, 10%, 15% ou 25% conforme comparado com um antígeno comparável contendo relativamente menos ou nenhum colesterol.

Exemplos não limitantes de derivados de colesterol incluem éter colest-5-en-3 beta-ila-6-aminohexílico (AH-Chol; Zimmer *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 47(2):175-8, 1999); éteres poli(etileno glicol) colesterílicos (PEG(n)-Chols; Baba *et al.*, *Traffic*, 2(7):501-12, 2001; Ishiwata *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1359(2):123-35, 1997); um derivado de colesterol catiô-

nico com um grupo de cabeça hidroxietila amino descrito por Nakanishi e Noguchi (*Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52(3):197-207, 2001); hemissuccinato de colesterol (Meuillet *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 377(2-3):241-52, 1999; deidroergosterol (DHE), o qual difere do colesterol por ter três ligações duplas adicionais e um grupo metila extra (Mukherjee, *Biophys. J.*, 75(4):1915-1925, 1998); derivados catiônicos de colesterol os quais contêm um grupo de cabeça amino terciário com um braço espaçador diferente (Takeuchi *et al.*, *FEBS Lett.*, 397(2-3):207-9, 1996); colesterila-3-beta-carboxiamidoetilenodimetilamina (Noguchi *et al.*, *FEBS Lett.*, 433(1-2):169-173, 1998); e N-[tris [(beta-D-galactopiranosilóxi)metila]metila]-N-alfa-[4-(5-colesten-3 beta-ilóxi)succinila]glicinamida (Kempen *et al.*, *J. Medicin. Chem.*, 27:1306-1312, 1984). Exemplos adicionais de derivados de colesterol úteis na formação de membrana e estruturas semelhantes a membrana (por exemplo, lipossômicas ou micelares) (como um antígeno lipoidal revelado) são descritos nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.888.821; 5.043.164; 4.900.549; 4.442.037; 4.157.391; e 4.544.545, e na Patente Européia No. EP0606613.

D. Preparação de Antígeno Lipoidal

Em modalidades de antígenos lipoidais CL/L/Ch, cardiolipina, lecitina e colesterol podem ser combinados em qualquer proporção que forma um antígeno capaz de ser ligado especificamente por um anticorpo anti-lipoidal (tal como, anticorpo anti-cardiolipina). Em alguns casos, o antígeno lipoidal tomará a forma de uma micela, lipossoma, monte de membrana, ou outra estrutura semelhante a membrana. Nestas estruturas, interações hidrofóbicas fazem com que os componentes não polares (tais como as cadeias de ácidos graxos) agreguem e excluam moléculas de água do "núcleo." Conforme uma pessoa versada na técnica reconhecerá, uma micela é uma estrutura não-bicamada substancialmente esférica (ou fechada de modo diverso) tendo um interior hidrofóbico composto de cadeias de ácidos graxos (e não incluindo um centro aquoso). Em comparação, um lipossoma é uma estrutura bicamada substancialmente esfericamente disposta que é maior do que uma micela e encerra um centro aquoso. O tipo de estrutura formada

por uma mistura CL/L/Ch dependerá, por exemplo, da extensão e do grau de saturação das cadeias de ácidos graxos de cardiolipina e lecitina, da temperatura, da composição iônica do meio aquoso, e do modo de dispersão dos fosfolipídeos na solução. Em modalidades particulares, um antígeno lipoidal CL/L/Ch (tal como, um antígeno de VDRL, RPR, USR, ou VDRL sintético) forma uma micela em uma solução aquosa (tal como uma solução etanólica). Em modalidades mais particulares, um antígeno lipoidal forma uma micela e não forma um lipossoma em uma solução aquosa (tais como uma solução etanólica).

Um antígeno lipoidal para uso em uma composição ou método descritos pode ser obtido comercialmente (por exemplo, Fisher (Cat. No. B40765), Fisher (Cat. No. 22-415-132), Fisher (Cat. No. 23-038010), True-Medix, IPX Overseas Corporation (Miami, FL, USA), Cenogenics Corporation (Morganville, NJ, USA), Nova Century Scientific (Niágara Falls, NY, USA) bem como outros fornecedores) ou pode ser produzido por qualquer método comumente conhecido na técnica. Em uma modalidade, um antígeno lipoidal é produzido conforme descrito no Exemplo 1.

Em algumas modalidades, uma solução não aquosa contendo cardiolipina, lecitina e colesterol (CL/L/Ch) é misturada com uma solução aquosa para formar uma emulsão. Pode ser usada qualquer solução não aquosa na qual cardiolipina, lecitina e colesterol são cada um solúveis (ou parcialmente solúveis), incluindo, por exemplo, etanol (tal como etanol absoluto, etanol a 95%, ou etanol a 70%), clorofórmio, hexano : etanol (por exemplo, a 9:1), tolueno (por exemplo, 95%), diclorometano, ou benzeno. Em um exemplo, uma CL/L/Ch é preparada em etanol absoluto.

Em algumas modalidades, uma solução CL/L/Ch útila para preparar um antígeno lipoidal pode incluir a partir de cerca de 0,001% a cerca de 0,1% cardiolipina (tais como de cerca de 0,005% a cerca de 0,07%, de cerca de 0,008% a cerca de 0,05%, de cerca de 0,01% a cerca de 0,04%, ou a partir de cerca de 0,025% a cerca de 0,035%); de cerca de 0,05% a cerca de 0,5% lecitina (tal como a partir de cerca de 0,07% a cerca de 0,4%, de cerca de 0,09% a cerca de 0,3%, de cerca de 0,1% a cerca de 0,25%, ou a

partir de cerca de 0,14% a cerca de 0,21%); e/ou a partir de cerca de 0,2% a cerca de 5% colesterol (tal como a partir de cerca de 0,4% a cerca de 3%, de cerca de 0,7% a cerca de 2%, de cerca de 0,8% a cerca de 1%). Em exemplos particulares, uma solução CL/L/Ch útila para preparar um antígeno lipoidal inclui cerca de 0,03% de cardiolipina (tal como, cardiolipina que ocorre naturalmente), cerca de 0,21% de lecitina (tal como, lecitina que ocorre naturalmente), e cerca de 0,9% de colesterol. Em outro exemplo, uma CL/L/Ch solução útila para preparar um antígeno lipoidal inclui cerca de 0,03% de tetramiristoila cardiolipina, cerca de 0,14% de 1-palmitoila-2-oleoila-*sn*-glicero-3-fosfocolina e cerca de 0,9% de colesterol.

Uma solução CL/L/Ch útila para preparar um antígeno lipoidal é misturada com uma solução aquosa para formar uma emulsão de antígeno lipoidal. A solução aquosa pode incluir qualquer solução na qual uma solução CL/L/Ch é imiscível, tal como uma solução salina (por exemplo, incluindo 0,1-1,0 M de NaCl, tal como cerca de 0,55 M de NaCl). Uma solução aquosa típica inclui 0,55 M de NaCl, 0,05% (v/v) de formaldeído, 0,26 mM, 0,35 mM a 0,66 mM de fosfato de hidrogênio dissódico (para o dodecaidrato (12-H_2O), heptaidrato (7-H_2O), ou formas anídricas, respectivamente), e 1,2 mM de potássio.

A proporção de solução CL/L/Ch para solução aquosa pode ser qualquer proporção que resultará na formação de uma emulsão de antígeno lipoidal (tal como, micelas contendo CL/L/Ch). Em alguns exemplos, a proporção de solução CL/L/Ch para proporção de solução aquosa é cerca de 1:10, cerca de 1:15, cerca de 2:33, ou cerca de 1:20. Em outros exemplos, a percentagem de solução CL/L/Ch em uma emulsão é cerca de 3% (v/v), cerca de 5% (v/v), cerca de 8% (v/v), cerca de 10% (v/v), ou cerca de 12% (v/v).

IV. Métodos de Imobilização de Antígeno Lipoidal

É sabido que anticorpos antilipoidais (por exemplo, reagina) no soro humano reagirá com antígenos lipídicos contendo cardiolipina, lecitina e colesterol (tais como, os antígenos de RPR, VDRL, USR, ou VDRL sintéticos). Conforme discutido acima, este conhecimento formou a base para testes séricos, não treponemais à base de solução. Apesar de uma necessida-

de há muito tempo existente de provas à base de membrana para testar sífilis, ninguém reconheceu previamente que um antígeno lipoidal contendo CL/L/Ch pode ser imobilizado sobre uma membrana (ou outro suporte sólido) usando, como um exemplo, os anticorpos antilipoidais o antígeno foi especificamente designado para detectar. Diferentemente de muitos outros antígenos, os quais têm somente um sítio de ligação para o anticorpo a ser detectado, o antígeno lipoidal tem muitos sítios de ligação para anticorpos antilipoidais. Portanto, conforme revelado aqui, neste requerimento de patente, uma quantidade de anticorpo antilipoidal não saturante ou outro anticorpo que pode ligar especificamente um antígeno lipoidal (ou, em particular exemplos, fragmentos de semelhantes anticorpos, tais como fragmentos Fab) pode ser usada para ancorar um antígeno lipoidal a um suporte sólido, tal como uma superfície membranosa (incluindo, nitrocelulose, náilon e outras) sem afetar de modo adverso a capacidade do antígeno lipoidal imobilizado para ligar especificamente e adicionalmente anticorpos antilipoidais presentes em uma fase móvel (tal como uma amostra biológica).

A. Anticorpo Âncora

Anticorpos úteis para imobilizar um antígeno lipoidal em um suporte sólido (tal como uma membrana microporosa) nas composições e métodos descritos incluem qualquer anticorpo que tem a capacidade de ligar especificamente um antígeno lipoidal, incluindo, por exemplo, anticorpos antilipoidais de um sujeito infectado com *T. pallidum* ou inoculado com *T. pallidum* (tal como, um ser humano ou um coelho), anticorpos anti-colesterol, anticorpos anti-cardiolipina, ou anticorpos anti-lecitina. Conforme discutido em mais detalhes abaixo, fragmentos de ligação de antígeno (tais como, fragmentos Fab) de anticorpos tendo as especificidades precedentes também podem servir como um anticorpo âncora nas composições e métodos descritos. Anticorpos âncora podem ser monoclonais ou policlonais. Em modalidades específicas, anticorpos âncora são policlonais (tais como os anticorpos isolados de soro hipermune de seres humanos ou coelhos infectados com *T. pallidum*).

Anticorpos antilipoidais policlonais de sujeitos infectados com

T. pallidum ou inoculados com *T. pallidum* podem ser obtidos, por exemplo, isolando os anticorpos referidos a partir de soro disponível comercialmente ou produzindo e isolando os anticorpos policlonais referidos usando métodos comumente conhecidos na técnica. Fornecedores comerciais de produtos sangüíneos (tais como, soro) de seres humanos infectados com *T. pallidum* incluem New York Blood Center (New York, NY, EUA); Biomedical Resources (Hatboro, PA, EUA); Life Diagnostics, uma division of Life Therapeutics (formerly Serologicals) (Clarkston, GA, EUA); e Teragenix (formerly Millennium Biotech, Inc) (Ft. Lauderdale, FL, EUA). Em outras modalidades, anti-soros policlonais contendo anticorpos antilipoidais podem ser produzidos imunizando animais hospedeiros (tais como coelhos, camundongos, cavalos, cabras e outros) com *T. pallidum* e/ou um antígeno lipoidal (tal como um antígeno de VDRL). Procedimentos detalhados para produção de anticorpos monoclonais ou policlonais são descritos em Harlow e Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988). Procedimentos não limitantes específicos para produzir anticorpos em um animal hospedeiro usando um imunogênio contendo CL/L/Ch foram descritos, por exemplo, por Inoue e Nojima (*Biochim. Biophys. Acta*, 144(2):409-414, 1967). Protocolos não limitantes específicos estão disponíveis para produzir anticorpos antilipoidais por infecção de um animal hospedeiro com *T. pallidum* (vide, por exemplo, Perine *et al.*, *Infect. Immun.*, 8(5):787-790, 1973). Além disso, serviços de produção de anticorpos customizados estão disponíveis comercialmente (vide, por exemplo, Spring Valley Laboratories (Woodbine, MD, EUA); Maine Biotechnology Services (Portland, ME, EUA); CovalAb UK (Cambridge, Reino Unido); 21st Century Biochemicals (Marlboro, MA, EUA) e numerosas outras). Os serviçoes comerciais referidos podem ser usados para produzir anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para antígenos lipoidais.

Em modalidades envolvendo anti-soro contendo anticorpos antilipoidais, uma fração de anticorpo pode ser isolada do soro usando métodos de conhecimento geral. Kits disponíveis comercialmente são adequados para uso no isolamento de anticorpos (incluindo anticorpos antilipoidais) do soro. Os kits referidos estão disponíveis, por exemplo, na Millipore (Billerica,

MA, EUA), Pierce (Rockford, IL, EUA); BioRad (Hercules, CA, EUA), e muitas outras. Um método não limitante específico para isolar anticorpos antilipoidais do soro é descrito no Exemplos 2-3.

Outros anticorpos âncora típicos que podem ser usados nas composições e métodos descritos, incluem anticorpos anti-colesterol e anticorpos anti-cardiolipina. Anticorpos anti-colesterol estão presentes em soros humanos e podem ser isolados conforme descrito acima para anticorpos antilipoidais. Anticorpos anti-colesterol específicos e/ou protocolos para produzir e/ou isolar anticorpos anti-colesterol podem ser encontrados em Kruth *et al.* (*J. Lipid Res.*, 42:1492-1500, 2001), Alving *et al.* (*Biochem. Soc. Trans.*, 17:637-639, 1989), Swartz *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1902, 1988), Stollar *et al.* (*Mol. Immunol.*, 26(1):73-79, 1989), e Publicação de Patentes Internacionais PCT Nos. WO 00/06200, WO 97/21099, e WO 02/083100. Anticorpos anti-cardiolipina purificados estão disponíveis comercialmente, por exemplo, na United States Biological (Swampscott, MA, EUA; por exemplo, Cat. No. C1375).

Um anticorpo âncora para uso nas presentes composições e métodos preferencialmente (i) não aglutinam com outros anticorpos âncora ligados a antígeno, e (ii) não ligam substancialmente a (ou reagem com) um reagente (ou série de reagentes) usados para detectar um analite de interesse (tal como, um anticorpo antilipoidal presente na amostra).

Aglutinação é um processo por meio do qual anticorpos multivalentes formam uma rede reticulada ligada por seus antígenos correspondentes, os quais devem no mínimo dois sítios de ligação para o anticorpo de interesse (referido como um "antígeno multivalente"). Sob estas circunstâncias, um único anticorpo pode ligar a dois antígenos diferentes e dois anticorpos diferentes podem ligar ao mesmo antígeno. Ocorre aglutinação em algumas concentrações de anticorpo multivalente com antígeno multivalente. Um modo exemplar para evitar aglutinação de um anticorpo âncora com antígenos lipoidais (os quais são multivalentes por natureza), é usar fragmentos de anticorpos Fab (ou outros monovalentes) para ancorar um antígeno lipoidal. Um fragmento de anticorpo monovalente não pode ligar dois antíge-

nos e, portanto, não pode servir para reticular dois antígenos diferentes. Métodos para preparar fragmentos de anticorpos monovalentes são de conhecimento geral na técnica. Um método não limitante para preparar e isolar fragmentos Fab é proporcionado no Exemplo 5.

Um método não limitante alternativo para evitar aglutinação é aplicar anticorpos âncora (independente da valência) a uma superfície sólida (tal como, uma membrana de um dispositivo de imunoensaio à base de membrana) na ausência de antígeno lipoidal; em seguida, ligar o antígeno lipoidal ao anticorpo imobilizado. Neste método alternativo, os anticorpos e antígenos são fisicamente restritos de substancial reticulação.

B. Suporte Sólido

Um suporte sólido (ou substrato) é qualquer material o qual é insolúvel, ou pode ser tornado insolúvel por uma reação subseqüente. Os métodos para imobilizar um antígeno lipoidal descritos aqui, neste requerimento de patente, podem ser usados com qualquer suporte sólido ao qual um anticorpo âncora fixará em uma maneira que resiste substancialmente a deprendimento quando lavado com uma solução aquosa, tal como quando contactado com uma amostra de fluido (tal como uma amostra biológica). Modalidades preferenciais de suporte sólido para dispositivos de imunoensaio descritos envolvem membranas microporosas, tais como nitrocelulose, náilon, fluoreto de polivinilideno (PVDF), polietersulfona, policarbonato, poliéster, acetato de celulose, ésteres celulósicos mistos, ou combinações das mesmas.

A superfície de um suporte sólido pode ser ativada por processos químicos que causam ligação covalente de um agente (por exemplo, um anticorpo âncora ou complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal) ao suporte. No entanto, qualquer outro método adequado pode ser usado para imobilizar um agente (por exemplo, um anticorpo âncora ou complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal) a um suporte sólido incluindo, sem limitação, interações iônicas, interações hidrofóbicas, interações covalentes e semelhantes. As forças particulares que resultam em imobilização de um agente sobre uma fase sólida não são determinativas para os métodos e disposi-

tivos descritos aqui, neste requerimento de patente.

Uma fase sólida pode ser escolhida por sua capacidade intrínseca para atrair e imobilizar um agente, tal como um reagente de captura. Alternativamente, a fase sólida pode possuir um fator que tem a capacidade de atrair e imobilizar um agente, tal como um anticorpo âncora ou complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal. O fator pode incluir uma substância carregada que é carregada opostamente com respeito a, por exemplo, um anticorpo âncora ou complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal ou a uma substância carregada conjugada ao anticorpo âncora ou complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal.

Numerosos e variados suportes sólidos são conhecidos daqueles na técnica e incluem, sem limitação, membranas bíbulas ou microporosas (tais como, nitrocelulose, náilon ou PVDF), as paredes das cavidades de uma bandeja de reação, tubos de teste, contas de poliestireno, contas magnéticas, e micropartículas (tais como partículas de látex). Com respeito a algumas modalidades de membranas, a estrutura porosa de nitrocelulose tem excelentes qualidades de absorção e adsorção por uma ampla variedade de reagentes, por exemplo, anticorpos âncora ou complexos de anticorpo âncora-antígeno lipoidal. Náilon possui características similares e também é adequado. Estruturas microporosas são úteis, como são materiais com estrutura de gel no estado hidratado.

Exemplos adicionais de suportes sólidos úteis incluem: carboidratos poliméricos naturais e seus derivados sinteticamente modificados, reticulados ou substituídos, tais como ágar, ágarose, ácido algínico reticulado, gomas guar substituídas e reticuladas, ésteres celulósicos, especialmente com ácido nítrico e ácidos carboxílicos, ésteres celulósicos mistos, e éteres celulósicos; polímeros naturais contendo nitrogênio, tais como proteínas e derivados, inclusive gelatinas reticuladas ou modificadas; polímeros de hidrocarbonetos naturais, tais como látex e borracha; polímeros sintéticos os quais podem ser preparados com estruturas convenientemente porosas, tais como vinila polímeros, inclusive polietileno, polipropileno, poliestireno, polivinilcloreto, polivinilacetato e seus derivados parcialmente hidrolisados, polia-

crilamidas, polimetacrilatos, copolímeros e terpolímeros dos policondensados acima, tais como poliésteres, poliamidas, e outros polímeros, tais como poliuretanos ou poliepóxidos; materiais inorgânicos porosos tais como sulfatos ou carbonatos de metais terrosos alcalinos e magnésio, inclusive sulfato de bário, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio, silicatos de metais terrosos alcalinos e de álcali, alumínio e magnésio; e óxidos ou hidratos de alumínio ou silício, tais como argilas, alumina, talco, caulim, zeólito, sílica-gel, ou vidro (estes materiais podem ser usados como filtros cpm os materiais poliméricos acima); e misturas ou copolímeros das classes acima, tais como copolímeros de enxerto obtidos inicializando a polimerização de polímeros sintéticos sobre um polímero natural preexistente.

Exceto conforme fisicamente restrito de outro modo, um suporte sólido pode ser usado em qualquer formato adequado, tal como filmes, chapas, tiras, ou placas, ou pode ser revestido sobre ou colado ou laminado a veículos inertes apropriados, tais como papel, vidro, filmes plásticos, ou tecidos.

C. Complexos de Anticorpo Âncora -Antígeno Lipoidal Imobilizantes

Em algumas modalidades, antígenos lipoidais são imobilizado sobre um suporte sólido contactando em solução o antígeno lipoidal com anticorpos âncora específicos para o antígeno lipoidal (por exemplo, anticorpos antilipoidais, anticorpos anti-colesterol, anticorpos anti-lecitina, e/ou anticorpos anti-cardiolipina, e/ou fragmentos de ligação antigênica de quaisquer dos precedentes) para formar um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora (ou complexo). Em modalidades particulares, antígeno lipoidal é contactado em solução com um fragmento Fab específico para o antígeno lipoidal (por exemplo, um fragmento Fab isolado de imunoglobulinas em soro humano sifilítico ou soro de outros sujeitos infectados ou inoculados com *T. pallidum*).

Um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora tem um componente de polipeptídeo (isto é, um anticorpo âncora) e um componente lipídico (isto é, um antígeno lipoidal). Em contraste com lipídeos, é de co-

nhecimento geral na técnica que polipeptídeos (por exemplo, proteínas) aderirão fortemente (através de interações incompletamente caracterizadas) a muitos tipos de suportes sólidos e, em particular, a suportes membranosos (como nitrocelulose, náilon ou PVDF) (vide, por exemplo, Harvey, *Optimization of Nitrocellulose Membrane Based Immunoassays*, Keene, NH: Schleicher and Schuell, 1991; Wallis *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.*, 33:413–437, 1979; Presswood, *Membrane Filtration: Applications and Problems*, New York, NY: Marcel Dekker, 1981; Farrah *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1229–1232, 1981; Batteiger *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 55:297–307, 1982; Tijssen, *Practice and Theory of Immunoassays*, 8th ed, Amsterdam:The Netherlands Elsevier, 1993). Portanto, através de sua associação com um componente de polipeptídeo (por exemplo, anticorpo âncora) também é possível agora aderir fortemente (por exemplo, imobilizar) um antígeno lipoidal a um suporte sólido (tal como, nitrocelulose, náilon, ou PVDF). Por conseguinte, os métodos descritos (e métodos para preparar as composições reveladas) contemplam contactar um suporte sólido (tal como uma membrana microporosa) com uma solução de complexo de antígeno-anticorpo em que, através de semelhante contato, o complexo de antígeno-anticorpo se torna substancialmente imobilizado sobre o suporte sólido. Em alguns exemplos, um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal é substancialmente imobilizado sobre um suporte sólido quando não mais de cerca de 1%, não mais de cerca de 2%, não mais de cerca de 5%, não mais de cerca de 10%, ou não mais de cerca de 25% do complexo de antígeno-anticorpo se torna destacado do suporte sólido quando o suporte é contactado com uma amostra de fluido por um tempo suficiente para a amostra de fluido umedecer o suporte sólido (por exemplo, por um tempo suficiente para uma amostra de fluido migrar ao longo de uma tira membranosa e contatar uma área onde um antígeno lipoidal é imobilizado).

Para imobilizar um antígeno lipoidal a uma superfície sólida, também é contemplado que uma superfície sólida (tal como, nitrocelulose, náilon ou PVDF) pode ser contactada com anticorpo âncora (por exemplo, em solução) na ausência de antígeno lipoidal. O anticorpo âncora polipeptí-

dico adere fortemente à superfície sólida, conforme discutido acima, e é imobilizado. Portanto, o anticorpo âncora imobilizado é contactado com antígeno lipoidal (por exemplo, em solução). A ligação específica do antígeno lipoidal pelo anticorpo âncora imobilizado serve também para imobilizar o antígeno. Conforme discutido acima, esta técnica de imobilização de antígeno pode ser usada para evitar aglutinação em circunstâncias onde o anticorpo âncora é multivalente e capaz de mediar a aglutinação na presença de um antígeno multivalente.

Sob circunstâncias onde é desejável detectar um analite de ligação de antígeno lipoidal (tal como, anti-antígenos lipoidais) usando um antígeno lipoidal imobilizado, é vantajoso para o antígeno imobilizado ter sítios de ligação expostos para o analite. Por conseguinte, nas situações precedentes, quantidades de anticorpo âncora que não saturarão (por exemplo, bloquearão) a maioria (ou predominantemente todos) os sítios de ligação de analite sobre um antígeno lipoidal são usadas para formar um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal. Uma quantidade de anticorpo âncora não saturante em um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal é qualquer quantidade de semelhante anticorpo que permitirá que um analite (por exemplo, anticorpos antilipoidais em uma fase móvel) ligue de modo detectável o componente de antígeno lipoidal do complexo. Em alguns exemplos, não mais de cerca de 1%, não mais de cerca de 5%, não mais de cerca de 10%, não mais de cerca de 25%, não mais de cerca de 30% dos sítios de ligação de anticorpo antilipoidal disponíveis são bloqueados pelo anticorpo âncora. Em outros exemplos, a partir de 10 ng a cerca de 1000 ng de anticorpo âncora em um volume de 1 µl são reagidos com um volume igual de antígeno lipoidal preparado, por exemplo, conforme descrito no Exemplo 1. Em exemplos particulares, a partir de 25 ng a cerca de 750 ng, a partir de 50 ng a cerca de 600 ng, de cerca de 100 ng a cerca de 500 ng, ou a partir de cerca de 150 ng a cerca de 400 ng de âncora anticorpo são usados para preparar um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal.

A FIGURA 9 ilustra uma modalidade particular de um antígeno lipoidal (por exemplo, um antígeno de USR) fixado a um suporte sólido (por

exemplo, uma membrana de nitrocelulose) através de um anticorpo âncora (por exemplo, um Fab antilipoidal). A figura ilustra adicionalmente a captura pelo antígeno lipoidal imobilizado de um anticorpo antilipoidal de uma amostra típica (tal como, uma amostra de soro) e uma relação entre um detector, o anticorpo antilipoidal capturado, o antígeno, e o anticorpo âncora.

Exemplos particulares excluem ancorar um antígeno lipoidal a um substrato usando um anticorpo âncora específico para um grupo derivado (tal como, biotina, hexa-His, FLAG, ou outra etiqueta de epítope) o qual tenha sido adicionado a um componente de antígeno lipoidal com a finalidade de servir como um epítope para um anticorpo âncora. Os exemplos referidos não excluem inclusive cardiolipina derivada, lecitina derivada e/ou colesterol derivado como componentes de um antígeno lipoidal; no entanto, em semelhantes exemplos, os grupos derivado de semelhantes componentes derivados não servem como epítopes para um anticorpo âncora.

1. *Aplicação de Complexo de Anticorpo Âncora-Antígeno Lipoidal a Membranas Microporosas*

Alguns métodos e composições descritos contemplam um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal (também referido como um "reagente de captura") a ser fixado a uma membrana microporosa (tal como nitrocelulose, náilon ou PVDF). A membrana serve para imobilizar o reagente de captura e proporcionar uma superfície sobre a qual ou através da qual uma amostra aplicada escoará ou passará. Nitrocelulose (quer pura ou modificada em qualquer maneira conhecida na técnica) é uma membrana preferencial para os dispositivos e métodos descritos. Imagina-se que nitrocelulose liga proteínas por ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, e por mecanismos eletrostáticos (vide, por exemplo, Millipore Corporation, *A Short Guide Developing Immunochromatographic Test Strips*, 2nd Edition, pp. 1-40, 1999, disponível a pedido em (800) 645-5476).

Para reagentes de captura contendo proteína, tais como um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal, acredita-se que o dipolo do éster de nitrato de nitrocelulose interaja com o dipolo forte das ligações de peptídeo da proteína. Sais em altas concentrações, detergentes, e água em

uma solução para aplicação podem enfraquecer e desestabilizar interações eletrostáticas entre uma membrana de nitrocelulose e uma proteína a ser aplicada na membrana. Portanto, é preferencial, em bora não necessário, usar um tampão de baixa molaridade, por exemplo, 2 a 10 mM de tampões de fosfato, borato ou carbonato, para solubilizar reagentes de captura contendo proteína para imobilização sobre nitrocelulose.

O pH de uma solução para aplicação pode ser ajustado, mas não precisa, para aumentar a ligação do reagente de captura a uma membrana de nitrocelulose. Por exemplo, a solubilidade de um reagente de captura contendo proteína em uma solução para aplicação está em um mínimo quando o pH da solução para aplicação está dentro de cerca de +/- 1 unidade de pH do pI do reagente de captura contendo proteína.

Opcionalmente, 1 a 5% de metanol, etanol ou isopropanol pode ser adicionado a uma solução para aplicação. Uma solução para aplicação pode ser aplicada a uma membrana manualmente ou em uma maneira automatizada. Por exemplo, um módulo de dispensação de reagente (por exemplo, Matrix 1600, Kinematic Automation, Twain Harte, CA) pode ser usado para aplicar reagente de captura a uma membrana microporosa (tal como, nitrocelulose).

Tipicamente, não é necessário bloqueio de uma membrana microporosa nos métodos e dispositivos descritos. Por exemplo, proteínas que estão presentes na amostra e outros agentes de bloqueio, os quais podem ser adicionados, por exemplo, a um bloco de amostra ou bloco de conjugado de um dispositivo de fluxo lateral, são geralmente suficientes para evitar que um analite seja adsorvido não especificamente sobre a membrana. Se for desejado bloqueio opcional de uma membrana para uma aplicação em particular, agentes de bloqueio úteis incluem, por exemplo, gelatina (0,1% - 0,5%), leite em pó sem gordura (0,5% - 2%), caseína (1% - 2%), BSA (1% - 2%), IgG (1% - 2%), PVP 8-10 kD (0,5% - 1,0%), e PVA 8-10 kD (0,5% - 1,0%).

V. Dispositivos de imunoensaio

A descoberta aqui, neste requerimento de patente, de um méto-

do para imobilizar um antígeno lipoidal (tal como, um antígeno de VDRL e/ou USR) a um suporte sólido (tal como, uma membrana microporosa, como nitrocelulose, náilon ou PVDF) possibilita a produção de dispositivos de imunoensaio para a detecção de analites de ligação de antígeno lipoidal (tais como, anticorpos antilipoidais em amostras biológicas de sujeitos infectados com *T. pallidum*). Em alguns exemplos, um dispositivo de imunoensaio revelado permite a detecção da presença (ou ausência) de anticorpos antilipoidais em uma amostra biológica para diagnóstico de sífilis.

A. Formatos de Dispositivos de imunoensaio Representativos e Informações Relacionadas

Dispositivos de imunoensaio permitem o desempenho de provas à base de membrana relativamente econômicos e descartáveis, para a identificação visual da presença (ou ausência) de um analite em uma amostra de líquido. Os dispositivos referidos geralmente são formatados como hastes graduadas livres (por exemplo, tiras de teste) ou como dispositivos tendo algum tipo de estojo. Tipicamente, um dispositivo de imunoensaio pode ser usado com tão pouco quanto cerca de 200 µl de amostra de líquido, e a detecção de um analite na amostra pode (mas não precisa) estar completa dentro de 2 a 5 minutos. Em testes clínicos, a amostra pode ser urina, sangue, soro, saliva, ou outros fluidos corporais. Em testes não clínicos, a amostra pode ser um pequeno volume de solução preparada partir de terra, pó, plantas, ou alimento, e aplicados de modo similar diretamente à tira de teste da membrana. Na maioria dos casos, não é necessária instrumentação ancilar para realizar os testes referidos, e os dispositivos referidos podem ser facilmente usados em clínicas, laboratórios, localizações de campo, e em casa mesmo por pessoas inexperientes.

Foram desenvolvidos dispositivos de imunoensaio para a identificação ou monitoração de rotina de condições fisiológicas e patológicas (por exemplo, doenças infecciosas, gravidez, câncer, distúrbios endócrinos) usando amostras biológicas diferentes (por exemplo, urina, soro, plasma, sangue, saliva), e para análise de amostras ambientais (por exemplo, fluidos naturais e efluentes de plantas industriais), por exemplo, para contaminação.

Muitos destes testes se baseiam nas interações altamente específicas entre pares de ligação específica. Exemplos de semelhantes pares de ligação incluem antígeno/anticorpo, hapteno/anticorpo, lectina/carboidrato, apoproteína/cofator e biotina/(estrept)avidina. Além disso, muitos destes testes envolvem dispositivos (por exemplo, fase sólida, tiras de teste de fluxo lateral, testes de fluxo direto) com um ou mais dos membros de um par de ligação fixados a um material de fase sólida móvel ou imóvel tal como contas de látex, fibras de vidro, contas de vidro, tiras de celulose ou membranas de nitrocelulose (Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.703.017; 4.743.560; e 5.073.484).

Uma categoria principal de imunoensaio é o ensaio "sanduíche". Em geral, procedimentos de imunoensaio sanduíche exigem misturar uma amostra, a qual pode conter um analite de interesse (por exemplo, anticorpo antilipoidal), com um reagente detector que especificamente reconhece o analite, por exemplo, Proteína A conjugada a ouro, Proteína G conjugada a ouro, ou anticorpo secundário conjugado a ouro específico para anticorpo antilipoidal (por exemplo, anticorpo secundário anti-humano Ab ou anti-humano Ab(Fc)). O reagente detector é móvel e tipicamente é ligado a uma etiqueta ou outro reagente de sinalização, tal como látex tingido, um sol de metal coloidal, ou um radioisótopo. Esta mistura é em seguida aplicada a um meio cromatográfico (tal como uma membrana microporosa ou bíbula, como nitrocelulose, náilon ou PVDF) contendo uma banda ou zona de antígenos imobilizados reconhecidos pelo anticorpo de interesse do analite. O meio cromatográfico freqüentemente está sob a forma de uma tira que se assemelha a uma haste graduada ou a qual pode ser incorporada em um estojo, tal como em um dispositivo de fluxo lateral ou um dispositivo de fluxo direto. Quando o complexo da molécula a ser testado e o reagente detector atingem a zona dos antígenos imobilizados sobre o meio cromatográfico, ocorre ligação e o complexo de reagente detector é localizado na zona. Isto indica a presença da molécula a ser testada. Esta técnica pode ser usada para obter resultados quantitativos ou semi-quantitativos. Exemplos de imunoensaios sanduíche realizados sobre tiras de teste são descritos, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.168.146 e 4.366.241.

Em outras formas comuns de imunoensaios à base de membrana, conforme tipificado por alguns kits domésticos de detecção de gravidez e ovulação, uma tira de teste (ou haste graduada) é "mergulhada" em uma amostra suspeita de conter o analite do sujeito. Reagente detector marcado com enzima é em seguida adicionado, quer simultaneamente ou depois de um período de incubação. O dispositivo em seguida é lavado e em seguida inserido em uma segunda solução contendo um substrato para a enzima. A etiqueta da enzima, caso presente, interage com o substrato, causando a formação de produtos coloridos, os quais ou depositam como um precipitado sobre a fase sólida ou produzem uma alteração de cor visível na solução do substrato. O requerimento de patente européia No. EP-A 0 125 118 descreve um imunoensaio de haste graduada do tipo sanduíche semelhante. O requerimento de patente européia No. EP-A 0 282 192 descreve um dispositivo de haste graduada para uso em testes do tipo de competição.

Dispositivos de imunoensaio do tipo de fluxo direto foram designados, em parte, para prevenir a necessidade de etapas de incubação e lavagem associadas com testes de haste graduada. Dispositivos de imunoensaio de fluxo direto envolvem um reagente de captura (tal como um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal) ligado a uma membrana porosa ou filtro ao qual uma amostra de líquido é adicionada. À medida que o liquido escoa através da membrana, o analite alvo (tal como anticorpo antilipoidal) liga ao reagente de captura. A adição de amostra é seguida por adição de reagente detector (tal como, Proteína A conjugada a ouro ou IgG anti-humana conjugada a ouro (Fc)). Alternativamente, o reagente detector pode ser colocado sobre a membrana em uma maneira que permite ao detector misturar com a amostra e deste modo marcar o analite. A detecção visual de reagente detector proporciona uma indicação da presença de analite alvo na amostra. Dispositivos de fluxo direto de imunoensaio típicos são descritos nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.246.339; 4.277.560; 4.632.901; 4.812.293; 4.920.046; e 5.279.935; e nos Requerimentos de Patente U.S. Nos. 20030049857 e 20040241876.

Dispositivos de teste de migração geralmente incorporam dentro dos mesmos reagentes que foram fixados a etiquetas coloridas, deste modo permitindo detecção visível dos resultados de teste sem adição de substâncias. Vide, por exemplo, a Patente U.S. No. 4.770.853; a Publicação de Patente Mundial PCT No. WO 88/08534 e o requerimento de Patente Européia No. EP-A 0 299 428.

Há uma série de testes do tipo de fluxo lateral disponíveis comercialmente e patentes descrevendo métodos para a detecção de grandes analites (peso molecular maior do que 1.000 Daltons). Patente U.S. No. 5.229.073 descreve um método de fluxo lateral de imunoensaio competitivo semiquantitativo para medir os níveis de lipoproteína plasmática. Este método utiliza uma pluralidade de zonas de captura ou linhas contendo anticorpos imobilizados para ligar tanto a lipoproteína marcada quanto livre para dar um resultado semi-quantitativo.

A Patente U.S. No. 5.591.645 proporciona uma tira de teste cromatográfico com no mínimo duas porções. A primeira porção inclui um traçador móvel e a segunda porção inclui um aglutinante imobilizado capaz de ligar ao analite. Exemplos adicionais de testes de fluxo lateral para grandes analites são descritos nos seguintes documentos de patente: Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.168.146; 4.366.241; 4.855.240; 4.861.711; e 5.120.643; Patente Européia No. 0296724; publicações de Patente Internacional Nos. WO 97/06439; e WO 98/36278.

Também há testes do tipo de fluxo lateral para a detecção de pequenos analites (peso molecular 100 a 1.000 Daltons). Geralmente, estes testes de pequenos analites envolvem inibição competitiva "típica" para produzir resultados de relatórios negativos ou indiretos (isto é, redução de sinal com concentração de analite crescente), conforme exemplificado pela Patente U.S. No. 4.703.017. No entanto, foram desenvolvidas várias abordagens para detectar pequenos analites usando testes de fluxo lateral que produzem resultados de relatórios positivos ou diretos (isto é, aumento em sinal com concentração de analite crescente). Estes incluem, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.451.504; 5.451.507; 5.798.273; e 6.001.658.

A Patente U.S. No. 5.451.504 proporciona um método com três zonas específicas (mobilização, captura e detecção) cada uma contendo um conjugado de látex diferente para produzir um sinal positivo. A zona de mobilização contém anticorpo marcado para ligar o analite na amostra. Na zona de captura, anticorpo marcado e não ligado é em seguida capturado por análogo de analite imobilizado. A zona de detecção captura o complexo de analite marcado-anticorpo.

A Patente U.S. No. 5.451.507 descreve um método de imunoensaio desconectado de duas zonas. A primeira zona tem reagente ligado não difusivamente que liga com um componente, por exemplo, um analite análogo ligado a, ou capaz de ser ligado a, um membro de um sistema produtor de sinal. A segunda zona liga ao componente somente quando o analite a ser testado está presente. A distância que o componente migra para dentro da segunda zona está diretamente relacionada com a concentração de analite.

A Patente U.S. No. 5.798.273 descreve um dispositivo de fluxo lateral que inclui uma zona de captura com analite imobilizado análogo e uma ou mais zonas de leitura para ligar analite marcado análogo.

A Patente U.S. No. 6.001.658 revela um dispositivo de tira de teste com um parceiro de ligação marcado difundível que liga com analite, um analite imobilizado, e uma área de detecção contendo um anticorpo imobilizado.

Os dispositivoss descritos aqui, neste requerimento de patente, geralmente incluem uma tira de material absorvente (tal como uma membrana microporosa), a qual, em alguns casos, pode ser feita de diferentes substâncias cada uma ligada à outra em zonas, as quais podem ser limitadas e/ou sobrepostas. Em alguns exemplos, a tira de absorvente pode ser fixada sobre um material não interativo de suporte (tal como poliéster não tecido), por exemplo, para proporcionar aumentada rigidez para a tira. Zonas dentro de cada tira podem conter diferencialmente um ou mais parceiros de ligação específicos e/ou outros reagentes requeridos para a detecção e/ou quantificação do analite em particular sendo testado para, por exemplo, um anticor-

po antilipoidal. Portanto estas zonas podem ser visualizadas como setores funcionais ou regiões funcionais dentro do dispositivo de teste.

Em geral, uma amostra de fluido (ou uma amostra suspendida em um fluido) é introduzida para a tira na extremidade proximal da tira, por exemplo, mergulhando ou pintando. Uma amostra é coletada ou obtida usando métodos de conhecimento geral daqueles versados na técnica. A amostra contendo os anticorpos antilipoidais a serem detectados pode ser obtida de qualquer fonte biológica. Exemplos de fontes biológicas incluem soro sangüíneo, plasma sangüíneo, urina, fluido espinal, saliva, fluido de fermentação, fluido linfático, fluido de cultura de tecido e fluido de ascite de um ser humano ou animal. A amostra pode ser diluída, purificada, concentrada, filtrada, dissolvida, suspendida ou manipulada de modo diverso antes de imunoensaio para otimizar os resultados do imunoensaio. O fluido migra distalmente através de todas as regiões funcionais da tira. A distribuição final do fluido nas regiões funcionais individuais depende da capacidade adsortiva e das dimensões dos materiais usados.

Em algumas modalidades, suportes sólidos porosos, tais como nitrocelulose, descritos acima preferencialmente estão sob a forma de chapas ou tiras. A espessura de semelhantes chapas ou tiras pode variar dentro de amplos limites, por exemplo, a partir de cerca de 0,01 a 0,5 mm, de cerca de 0,02 a 0,45 mm, de cerca de 0,05 a 0,3 mm, de cerca de 0,075 a 0,25 mm, de cerca de 0,1 a 0,2 mm, ou de cerca de 0,11 a 0,15 mm. O tamanho de poro de semelhantes chapas ou tiras pode variar de modo similar dentro de amplos limites, por exemplo, a partir de cerca de 0,025 a 15 micra, ou mais especificamente de cerca de 0,1 a 3 micra; no entanto, não se pretende que o tamanho de poro seja um fator limitante na seleção do suporte sólido. O índice de fluxo de um suporte sólido, onde aplicável, também pode variar dentro de amplos limites, por exemplo, de cerca de 12,5 a 90 s/cm (isto é., 50 a 300 s/4 cm), cerca de 22,5 a 62,5 s/cm (isto é, 90 a 250 s/4 cm), cerca de 25 a 62,5 s/cm (isto é, 100 to 250 s/4 cm), cerca de 37,5 a 62,5 s/cm (isto é, 150 a 250 s/4 cm), ou cerca de 50 a 62,5 s/cm (isto é, 200 a 250 s/4 cm). Em modalidades específicas de dispositivos descritos aqui,

neste requerimento de patente, o índice de fluxo é cerca de 62,5 s/cm (isto é, 250 s/4 cm). Em outras modalidades específicas de dispositivos descritos aqui, neste requerimento de patente, o índice de fluxo é de cerca de 37,5 s/cm (isto é, 150 s/4 cm).

Outra característica comum a ser considerada no uso de dispositivos de imunoensaio é um meio para detectar a formação de um complexo entre um analite (tal como um anticorpo antilipoidal) e um reagente de captura (tal como complexos de anticorpo âncora-antígeno lipoidal). Um detector (também referido como reagente detector) serve esta finalidade. Um detector pode ser integrado em um dispositivo de imunoensaio (por exemplo, incluído em um bloco de conjugado, conforme 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 a finalidade de detecção. Em alguns casos, um reagente detector é um parceiro de ligação marcado específico para o analite (tal como, Proteína A conjugada a ouro para um analite de anticorpo, ou Ab anti-humano marcado com ouro (Fc) para um analite de anticorpo humano). Em outros casos, um reagente detector inclui coletivamente um primeiro parceiro de ligação não marcado específico para o analite e um segundo parceiro de ligação marcado específico para o primeiro parceiro de ligação e assim por diante. Em cada caso, um reagente detector especificamente detecta analite ligado de um complexo de analite-reagente de captura e, portanto, um reagente detector preferencialmente não substancialmente liga a ou reage com o reagente de captura ou outros componentes localizados na área de captura do analite. A ligação ou reação não específica referida de um detector pode proporcionar um resultado falso positivo. Opcionalmente, um reagente detector pode reconhecer especificamente uma molécula de controle positivo (tal como uma IgG humana não específica para um detector de Proteína A marcada, ou um detector de Proteína G marcada, ou um Ab anti-humano marcado (Fc)) que está presente em uma área de captura secundária.

Preferencialmente, um reagente detector para uso nos métodos ou dispositivos descritos não substancialmente liga a ou reage com um complexo de anticorpo âncora imobilizado-antígeno lipoidal. Uma pessoa de conhecimento regular da técnica pode facilmente determinar combinações de reagentes detectores particulares e complexos de anticorpo âncora-antígeno lipoidal particulares que satisfarão esta preferência para a detecção de analites particulares. Por exemplo, para a detecção de anticorpos antilipoidais humanos, algumas combinações típicas não limitantes incluem:

Antígeno Lipoidal	**Anticorpo Âncora**	**Reagente Detector**
CL/L/Ch	fragmento de ligação anti-antígeno lipoidal humano (por exemplo, Fab)	Proteína A, Proteína G, ou Ab anti-humano (Fc)
CL/L/Ch	fragmento de ligação de antígeno anti-colesterol humano (por exemplo, Fab)	Proteína A, Proteína G, ou Ab anti-humano (Fc)
CL/L/Ch	fragmento de ligação de antígeno anti-cardiolipina humano (por exemplo, Fab)	Proteína A, Proteína G, ou Ab anti-humano (Fc)
CL/L/Ch	Ab de extensão total antilipoidal não humano	Ab anti-humano (qualquer especificidade)
CL/L/Ch	Ab de extensão total anti-colesterol não humano	Ab anti-humano (qualquer especificidade)
CL/L/Ch	Ab de extensão total anti-cardiolipina não humano	Ab anti-humano (qualquer especificidade)
CL/L/Ch	fragmento de ligação anti-antígeno lipoidal não humano (mamífero) (por exemplo, Fab)	Proteína A, Proteína G, Ab anti-humano (qualquer especificidade)
CL/L/Ch	fragmento de ligação anti-antígeno de colesterol não humano (mamífero) (por exemplo, Fab)	Proteína A, Proteína G, Ab anti-humano (qualquer especificidade)

Antígeno Lipoidal	Anticorpo Âncora	Reagente Detector
CL/L/Ch	fragmento de ligação anti-antígeno de cardiolipina não humano (mamífero) (por exemplo, Fab)	Proteína A, Proteína G, Ab anti-humano (qualquer especificidade)

B. Construção e Desenho de Dispositivo de Fluxo Direto

Um dispositivo de fluxo direto envolve um reagente de captura (tal como um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal) imobilizado sobre um suporte sólido, tipicamente, uma membrana (tal como, nitrocelulose, náilon, ou PVDF). Características de membrana úteis foram descritas previamente; no entanto, é útila observar que em um teste de fluxo direto aumento capilar não é uma característica particularmente importante de uma membrana uma vez que a amostra se move verticalmente através da membrana ao invés de sobre esta como em um teste de fluxo lateral. Em um simples formato representativo, a membrana de um dispositivo de fluxo direto é colocada em contato funcional ou físico com uma camada absorvente (vide, por exemplo, descrição de "bloco absorvente" abaixo), a qual age como um reservatório para extrair uma amostra de fluido através da membrana. Opcionalmente, depois de imobilização de um reagente de captura, quaisquer sítios de ligação de proteína remanescentes sobre a membrana podem ser bloqueados (ou antes ou simultaneamente com a administração da amostra) para minimizar interações não específicas. Uma modalidade física típica de um dispositivo de fluxo direto é mostrada na FIGURA 10.

Na operação de um dispositivo de fluxo direto, uma amostra de fluido (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 da amostra (ou reservatório) para receber e reter temporariamente uma amostra de fluido de um volume desejado. A amostra passa através da matriz da membrana. Neste processo, um analite na amostra (tal como um anticorpo antilipoidal) pode ligar especificamente ao reagente de captura imobilizado (tal como complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoi-

dal). Onde se deseja a detecção de um complexo de analite-reagente de captura, um reagente detector (tal como Proteína A marcada, Proteína G marcada, ou IgG anti-humana marcada (Fc)) pode ser adicionado com a amostra ou uma solução contendo um reagente detector pode ser adicionado subseqüente à aplicação da amostra. Se um analite for especificamente ligado por reagente de captura, um visual típico atribuível ao reagente detector em particular pode ser observado sobre a superfície da membrana. Etapas de lavagem opcionais podem ser adicionadas em qualquer momento do processo, por exemplo, depois de aplicação da amostra, e/ou depois de aplicação de um reagente detector.

C. Construção e Desenho de Dispositivo de Fluxo Lateral

Dispositivos de fluxo lateral são comumente conhecidos na técnica. Em resumo, um dispositivo de fluxo lateral é um dispositivo analítico tendo como sua essência uma tira de teste, através da qual flui um fluido de amostra de teste que é suspeito de conter um analite de interesse. O fluido de teste e qualquer analite suspendido pode escoar ao longo da tira para uma zona de detecção na qual o analite (caso presente) interage com um agente de captura e um agente de detecção para indicar uma presença, ausência e/ou quantidade do analite.

Foram descritos numerosos dispositivos analíticos de fluxo lateral, e incluem aqueles mostrados nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 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; na Patente Européia No. EP 0810436; e nas publicações de Patentes Internacionais Nos. WO 92/12428; WO 94/01775; WO 95/16207; e WO 97/06439, cada uma das quais é incorporada por meio de referência.

Muitos dispositivos de fluxo lateral são testes de fluxo lateral de uma etapa nos quais um fluido biológico é colocado em uma área da amostra sobre uma tira bíbula (embora possam ser usados materiais não bíbulos, e tornados bíbulos aplicando um tensoativo ao material), e deixado para mi-

grar ao longo da tira até o líquido entrar em contato com um parceiro de ligação específico que interage com um analite no líquido. Uma vez que o analite interage com o parceiro de ligação, um sinal (tal como um corante fluorescente ou visível de modo diverso) indica que ocorreu a interação. Múltiplos parceiros de ligação distintos podem ser colocados sobre a tira (por exemplo, em linhas paralelas) para detectar múltiplos analites no líquido. As tiras de teste também podem incorporar indicadores de controle, os quais proporcionam um sinal de que o teste foi realizado adequadamente, mesmo se um sinal positivo indicando a presença (ou ausência) de um analite não for vista sobre a tira.

A construção e o desenho de dispositivos de fluxo lateral é de conhecimento geral na técnica, conforme descrito, por exemplo, em Millipore Corporation, *A Short Guide Developing Immunochromatographic Test Strips*, 2nd Edition, pp. 1-40, 1999, disponível a pedido em (800) 645-5476; e Schleicher & Schuell, *Easy to Work with BioScience, Products e Protocols 2003*, pp. 73-98, 2003, 2003, disponível a pedido em Schleicher & Schuell BioScience, Inc., 10 Optical Avenue, Keene, NH 03431, (603) 352-3810; ambos os quais são incorporados aqui, neste requerimento de patente, por meio de referência em suas totalidades.

Dispositivos de fluxo lateral têm uma ampla variedade de formatos físicos que são igualmente de conhecimento geral na técnica. Qualquer formato físico que suporte e/ou encerre os componentes básicos de um dispositivo de fluxo lateral na relação de função apropriada é contemplado por esta descoberta. A FIGURA 7 mostra vários exemplos de dispositivos de fluxo lateral. Estes 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 FIGURA 8, a qual mostra uma modalidade particular na qual um estojo alongado 10 contém uma tira de fluxo lateral bíbula 12 que prolonga substancialmente toda a extensão do estojo 10. A tira de fluxo lateral 12 é dividida em um bloco de aplicação de amostra proximal 14 posicionado abaixo de uma porta de introdução de a-

mostra 15, uma membrana do resultado do teste intermediário 16, e um bloco absorvente distal 18. A tira de fluxo 12 é interrompida por um bloco de conjugado 20 que contém conjugado marcado (tal como Proteína A conjugada a ouro, Proteína G conjugada a ouro, Ab anti-humano conjugado a ouro). Uma tira ao longo do caminho de fluxo 12 passa do bloco proximal 14, através do bloco de conjugado 20, para a membrana do resultado do teste 16, para acumulação eventual no bloco absorvente 18. Agentes de ligação seletiva (tais como um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal) são posicionados sobre uma linha de teste proximal 22 na membrana do resultado do teste 16. Uma linha controle 24 é proporcionado na membrana do resultado do teste 16 ligeiramente distal à linha de teste 22.

Na operação da modalidade particular de um dispositivo de fluxo lateral ilustrado na FIGURA 8, uma amostra de fluido contendo um analite de interesse, tal como um anticorpo antilipoidal, é aplicada ao bloco de amostra 14 através da porta de introdução de amostra 15. Em alguns exemplos, a amostra pode ser aplicada à porta de introdução de amostra 15 gota a gota ou, menos preferencialmente, mergulhando a extremidade do dispositivo contendo a porta de introdução de amostra 15 dentro da amostra. Em outros exemplos onde uma amostra é sangue total, um fluido revelador opcional é adicionado à amostra de sangue para causar hemólise das hemácias e, em alguns casos, para fazer uma diluição apropriada da amostra de sangue total. A partir do bloco de amostra 14, a amostra passa, por exemplo, por ação capilar, para o bloco de conjugado 20. No bloco de conjugado 20, o analite de interesse pode ligar (ou ser ligado por) um reagente detector mobilizado ou mobilizável. Por exemplo, um analite de anticorpo antilipoidal pode ligar a um reagente detector de Proteína A conjugada a ouro contido no bloco de conjugado. O analite em complexo com o reagente detector pode em seguida escoar para a membrana do resultado do teste 16 onde o complexo pode interagir adicionalmente com um parceiro de ligação analite-específico (tal como um complexo de anticorpo âncora-antígeno lipoidal), o qual é imobilizado na linha de teste proximal 22. Em alguns exemplos, um anticorpo antilipoidal em complexo com um reagente detector (tal como, Proteína A conju-

gada a ouro, Proteína G conjugada a ouro, ou Ab anti-humano conjugado a ouro) pode ligar adicionalmente a complexos de anticorpo âncora-antígeno lipoidal imobilizado não marcados na linha de teste proximal 22. A formação do imunocomplexo entre anticorpo antilipoidal, reagente detector marcado (por exemplo, conjugado a ouro) , e complexo de anticorpo âncora imobilizado-antígeno lipoidal pode ser detectada pelo aparecimento de uma linha visível na linha de teste proximal 22, a qual resulta da acumulação do marcador (por exemplo, ouro) na região localizada da linha de teste proximal 22. A linha controle 24 pode conter um parceiro de ligação de reagente detector-específico imobilizado, o qual pode ligar o reagente detector na presença ou ausência do analite. A ligação referida na linha controle 24 indica desempenho apropriado do teste, mesmo na ausência do analite de interesse.

Em outra modalidade de um dispositivo de fluxo lateral, pode haver uma segunda linha de teste localizada paralela ou perpendicular (ou em qualquer outra relação espacial) à linha de teste 22 na membrana do resultado do teste 16. A operação desta modalidade em particular é similar à descrita no parágrago imediatamente precedente com as considerações adicionais que (i) um segundo reagente detector específico para um segundo analite, tal como um anticorpo anti-*T. pallidum*, também pode estar contido no bloco de conjugado, e (ii) a segunda linha de teste conterá um segundo parceiro de ligação específico tendo afinidade para um segundo analite na amostra. Por exemplo, a segunda linha de teste pode conter antígenos treponemais imobilizados que especificamente ligarão anticorpos anti-*T. pallidum* presentes na amostra.

Alguns dos materiais que podem ser úteis para os componentes de um dispositivo de fluxo lateral são mostrados na Tabela 1. No entanto, uma pessoa versada na técnica reconhecerá que os materiais particulares usados em um dispositivo de fluxo lateral particular dependerá de uma série de variáveis, incluindo, por exemplo, o analite a ser detectado, o volume da amostra, o índice de fluxo desejado e outros, e pode selecionar rotineiramente os materiais úteis por conseguinte.

Tabela 1.

Componente	Material Útila
Bloco da Amostra	Fibra de vidro Fibras tecidas Tela Fibras não tecidas Filtros celulósicos Papel
Bloco de Conjugado	Fibra de vidro Poliéster Papel Polipropileno modificado superficialmente
Membrana	Nitrocelulose (incluindo nitrocelulose pura e nitrocelulose modificada) Nitrocelulose fundida direta sobre suporte de poliéster Polivinilideno fluoreto Náilon
Bloco Absorvente	Filtros celulósicos Papel

1. Bloco da Amostra

O bloco da amostra (tal como o bloco da amostra 14 na FIGURA 8) é um componente opcional de um dispositivo de fluxo lateral que inicialmente recebe a amostra, e pode servir para remover particulados da amostra. Entre os vários materiais que podem ser usados para construir um bloco da amostra (vide a Tabela 1), um bloco da amostra de celulose pode ser benéfico se um grande volume de leito (por exemplo, 250 µl/cm^2) for um fator em uma aplicação particular. Blocos de amostra podem ser tratados com um ou mais agentes de liberação, tais como tampões, sais, proteínas, detergentes, e tensoativos. Os agentes de liberação referidos podem ser úteis, por exemplo, para promover ressolubilização de constituintes de bloco do conjugado, e bloquear sítios de ligação não específicos em outros componentes

de um dispositivo de fluxo lateral, tais como uma membrana de nitrocelulose. Agentes de liberação típicos incluem, por exemplo, trealose ou glucose (1% - 5%), PVP ou PVA (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 membranas úteis em um dispositivo de fluxo lateral (tais como nitrocelulose, náilon e PVDF), e considerações para aplicar um reagente de captura a membranas semelhantes foram discutidos previamente.

3. Bloco do Conjugado

O bloco de conjugado (tal como bloco de conjugado 20 na FIGURA 8) serve para, entre outras coisas, encerrar um reagente detector. Em algumas modalidades, um reagente detector pode ser aplicado externamente, por exemplo, de um frasco de revelador, em cujo caso um dispositivo de fluxo lateral não precisa conter um bloco de conjugado (vide, por exemplo, a Patente U.S. No. 4.740.468).

Um ou mais reagentes detectores contidos em um bloco de conjugado é liberado em solução na aplicação da amostra de teste. Um bloco de conjugado pode ser tratado com várias substâncias para influenciar a liberação do reagente detector em solução. Por exemplo, o bloco de conjugado pode ser tratado com PVA ou PVP (0,5% a 2%) e/ou Triton X-100 (0,5%). Outros agentes de liberação incluem, sem limitação, hidroxipropilmetila celulose, SDS, Brij e β-lactose. Uma mistura de dois ou mais agentes de liberação podem ser usados em qualquer dada aplicação. Na modalidade descita em particular, o reagente detector no bloco de conjugado 20 é Proteína A marcada, Proteína G, ou IgG anti-humana (Fc).

4. Bloco Absorvente

O uso de um bloco absorvente 18 em um dispositivo de fluxo lateral é opcional. O bloco absorvente age aumentando o volume total de amostra que penetra no dispositivo. Este volume aumentado pode ser útila, por exemplo, para lavar o analite não ligado da membrana. Qualquer um de uma variedade de materiais é útila para preparar um bloco absorvente, vide, por exemplo, a Tabela 1. Em algumas modalidades de dispositivos, um blo-

co absorvente pode ser papel (isto é, fibras celulósicas). Uma pessoa versada na técnica pode selecionar um bloco de papel absorvente com base em, por exemplo, sua espessura, compressibilidade, manufaturabilidade, e uniformidade do volume do leito. O volume de captação de um absorvente preparado pode ser ajustado alterando as dimensões (geralmente a extensão) de um bloco absorvente.

D. Dispositivos de Combinação

Cada um dos dispositivos de imunoensaio discutidos acima (por exemplo, haste graduada, dispositivo de fluxo direto ou dispositivo de fluxo lateral) pode ser, em algumas modalidades, formatado para detectar múltiplos analites pela adição de áreas de captura secundárias, terciárias ou mais contendo reagentes de captura específicos para os outros analites de interesse. Em particular, esta descoberta contempla dispositivos de imunoensaio que detectam simultaneamente anticorpo antilipoidal e treponemas ou anticorpos anti-treponemais em amostras de fluido (tal como, soro humano). Os dispositivos de combinação referidos adicionalmente incluem uma área de captura treponemal envolvendo (a) um antígeno treponemal imobilizado capaz de ser especificamente ligado por um anticorpo anti-*T. pallidum*, ou (b) um anticorpo anti-*T. pallidum* imobilizado que liga especificamente um antígeno treponemal móvel. Conforme usado aqui, neste requerimento de patente, um "antígeno treponemal" é um antígeno contendo no mínimo um determinante antigênico que liga especificamente anticorpos anti-*T. pallidum*. Foram descritos na técnica numerosos antígenos treponemais; vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.479.248; 6.248.331; 5.681.934; 5.578.456; 4.868.118; e 4.740.467. Por exemplo, polipeptídeos de no mínimo os seguintes pesos moleculares aparentes foram descritos como antígenos de *T. pallidum*: 16-20 kDa, 18 kDa, 18-23 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 particulares, vide a Patente U.S. No. 4.846.118).

Antígenos treponemais e anticorpos anti-*T. pallidum* são polipeptídeos; portanto, quando usados como reagentes de captura, estas molécu-

las podem ser diretamente aderidas a um suporte sólido (tal como, nitrocelulose, náilon ou PVDF). Não obstante, é contemplado que antígenos treponemais ou anticorpos anti-*T. pallidum* podem ser imobilizados (diretamente or indiretamente) sobre um suporte sólido por qualquer método disponível.

Um reagente detector pode ser usado para detectar a formação de um complexo entre um reagente de captura treponemal e analite treponema-específico (tal como, um treponema, um antígeno treponemal, ou um anticorpo anti-treponemal). Em algumas modalidades, um reagente detector (tal como um Ab anti-humano (Fc)) pode detectar especificamente um analite treponema-específico ligado (por exemplo, um anticorpo anti-treponemal humano) e um analite de anticorpo antilipoidal ligado (por exemplo, um anticorpo antilipoidal humano). Em outros casos, são previstos dois reagentes detectores separados para detecção específica de um analite treponema-específico ligado (por exemplo, anticorpo anti-treponemal ou antígeno treponemal) ou um analite de anticorpo antilipoidal ligado.

A operação de um dispositivo de imunoensaio útila para realizar testes treponemais e não treponemais simultâneos é substancialmente similar aos dispositivos descritos alhures nesta especificação. Uma característica particular de um dispositivo de combinação é que uma amostra de fluido aplicada a uma área de aplicação da amostra é capaz de contatar (por exemplo, fluir para ou fluir através de) cada uma de uma área de captura de anticorpo antilipoidal e para uma área de captura treponemal.

VI. Kits

São descritos aqui, neste requerimento de patente, kits para uso na detecção de anticorpos antilipoidais em uma amostra (tal como, uma amostra biológica). Os kits referidos também podem ser usados, por exemplo, no diagnóstico de doenças nas quais a presença de anticorpos antilipoidais é sintomática da doença (tal como, sífilis ou lúpus). Algumas modalidades dos kits descritos são geralmente portáveis e proporcionam um modo simples, rápido, e/ou de custo eficaz para detectar anticorpos antilipoidais e/ou diagnosticar doença (tal como sífilis) sem a necessidade de instalações laboratoriais, tal como em uma instalação de ponto de atendimento.

Os kits incluem um ou mais dispositivos de imunoensaio conforme revelado aqui, neste requerimento de patente, e um meio de veículo, tal como uma caixa, uma bolsa, uma sacola, caixa plástica (tal como plástico moldado ou outra embalagem transparente), empacotador (tal como, um plástico selado ou selável, papel, ou empacotador metálico), ou outro recipiente. Em alguns exemplos, os componentes dos kits serão contidas em uma única unidade de embalagem, tal como uma caixa ou outro recipiente, cuja unidade de embalagempode ter compartimentos nos quais um ou mais componentes do kit podem ser dispostos. Em outros exemplos, um kit inclui um ou mais recipientes, por exemplo, frascos, tubos, e semelhantes que podem reter, por exemplo, uma ou mais amostras biológicas a serem testadas, amostras de controle positivo e/ou negativo ou soluções (tais como, um soro controle positivo contendo anticorpos antilipoidais ou treponemais), diluentes (tais como, tampões de fosfato, ou tampões de salina), reagentes detectores (por exemplo, para aplicação externa a um dispositivo do kit), reagentes de substrato para visualização de enzimas reagentes detectores (tal como, 5-bromo-4-cloro-3-indolila fosfato, nitroblue tetrazólio em dimetila formamida), e/ou soluções de lavagem (tais como, tampões Tris, tampão de salina, ou água destilada).

Outras modalidades de kits incluem seringas, dispositivos de picada digital, esfregaços de álcool, compressas de gaze, bolas de algodão, bandagens, luvas de látex, bandejas de incubação com números variáveis de depósitos, seladores de placa adesivas, chapas de relatórios de dados, as quais podem ser úteis para manusear, coletar e/ou processar uma amostra biológica. Os kits também podem conter opcionalmente implementos úteis para introduzir amostras em uma câmara de amostra de um dispositivo de imunoensaio, incluindo, por exemplo, conta-gotas, Dispo-pipetas, tubos capilares, bulbos de borracha (por exemplo, para tubos capilares), e semelhantes. Ainda outras modalidades de kits podem incluir meios para descarte para descartar um dispositivo de imunoensaio usado e/ou outros ítens usados com o dispositivo (tais como amostras de pacientes, e etc.). Os meios para descarte podem incluir, sem limitação, recipientes que são capazes de

conter vazamento a partir de materiais descartados, tais como plástico, metal ou outras bolsas, caixas ou recipientes impermeáveis.

Em alguns exemplos, um kit revelado incluirá instruções para o uso de um dispositivo de imunoensaio. As instruções podem proporiconar orientação sobre como aplicar amostra ao dispositivo de teste, a quantidade de tempo necessária ou aconselhável para esperar pelo desenvolvimento dos resultados, e detalhes sobre como ler e interpretar os resultados do teste. As instruções referidas também podem incluir padrões, tais como tabelas, gráficos, ou figuras padrões para comparação dos resultados de um teste. Estes padrões podem incluir opcionalmente a informação necessária para quantificar o analite usando o dispositivo de teste, tal como uma curva padrão relacionando a intensidade de sinal ou número de linhas de sinal a uma quantidade de analite presente portanto na amostra.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são proporcionados para ilustrar algumas características e/ou modalidades particulares. Estes exemplos não devem ser considerados para limitar a invenção às características ou modalidades particulares descritas.

EXEMPLO 1

Preparação de um Antígeno Lipoidal de USR

Este Exemplo descreve a preparação de um antígeno lipoidal exemplar, um antígeno de USR, o qual pode ser fixado a um suporte sólido, tal como nitrocelulose, usando os métodos descritos. Cerca de 100 ml de um antígeno de USR pode ser preparado conforme descrito neste Exemplo; no entanto, aqueles de conhecimento regular da técnica reconhecerão que este protocolo descrito pode ser escalada para cima ou para baixo para produzir mais ou menos, respectivamente, antígeno de USR. Além disso, a menos que determinado expressamente de modo diverso, todas as etapas do método, reações, e etc. neste e nos exemplos seguintes foram realizados em temperatura ambiente (por exemplo, de cerca de 20°C a cerca de 25°C).

Oito (8) ml de salina tamponada com VDRL (10 gramas de NaCl, 0,5 mL de formaldeído, 0,093 gramas de dissódio hidrogênio fosfato, e 0,170

gramas de diidrogênio fosfato de potássio em 1 litro de água destilada) foi adicionado a um frasco redondo com rolha de vidro de 250 mL. Durante um período de 40 a 60 segundos, 10 mL de antígeno de VDRL (0,9% de colesterol, 0,03% de cardiolipina de coração bovino, e cerca de 0,21% de leticina em etanol) foi adicionado diretamente sobre a salina tamponada com contínua rotação do frasco. A rotação do frasco foi continuada por aproximadamente 10 segundos depois da adição do antígeno de VDRL. Em seguida, 82 mL de salina tamponada de VDRL foi adicionado à mistura da reação. Com o topo posiciomado no frasco, o frasco foi agitado de baixo para cima e de volta aproximadamente 30 vezes em 10 segundos. Alíquotas de cerca de 19 mL da mistura agitada foram centrifugadas em tubos de aço inoxidável em uma centrífuga angular (Sorvall SS-3) em temperatura ambiente em uma força centrífuga relativa de aproximadamente 2000 x g por 15 minutos (medida quanto a centrífuga atingiu a velocidade desejada). O fluido do sobrenadante foi cuidadosamente decantado invertendo o tubo para longe do lado contendo o material sedimentado. Depois de remover o sobrenadante, o tubo da centrífuga foi invertido e esfregado com gaze de algodão sem agitar o sedimento. O sedimento foi em seguida ressuspendido com suave agitação em um volume de solução de ressuspensão (3,72% de EDTA, 40% de cloreto de colina (v/v), salina tamponada com fosfato pH 6.9 ± 0.1) igual ao da suspensão de antígeno centrifugada (neste caso, 19 ml). Todos os sedimentos ressuspendidos foram recombinados em um frasco com rolha de vidro e suavemente torvelinhados para misturar para formar a preparação de antígeno. A preparação de antígeno foi em seguida colocada dentro de um refrigerador (a partir de cerca de 2°C a cerca de 8°C) por aproximadamente uma semana para estabilizar.

EXEMPLO 2

Fracionamento por Sulfato de Amônio de Soro Humano Infectado por *T. pallidum*

Este Exemplo descreve um método para separar uma fração contendo imunoglobulina do soro. O método deste Exemplo (bem como outros métodos de isolamento de imunoglobulina que são comumente conhe-

cidos na técnica) pode ser usado para purificar parcialmente imunoglobulinas a partir de qualquer fonte de soro sangüíneo, inclusive soro de sujeitos não humanos (tais como coelhos).

Soro de pacientes humanos infectados com *T. pallidum* (referidos do início ao fim deste e nos exemplos seguintes como "anti-soro hiperimune") foi obtido da Biomedical Resources (Hatboro, PA). Um volume desejado de anti-soro hiperimune foi colocado em um recipiente que encerra mais de duas vezes o volume de soro. Com agitação, uma quantidade de 70% de sulfato de amônio saturado igual ao volume de soro foi lentamente adicionado gota a gota ao soro. Esta mistura foi agitada por aproximadamente 4 horas em temperatura ambiente antes de centrifugação a aproximadamente 3000 rcf por 30 minutos. Depois de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a fração contendo imunoglobulina precipitada foi ressuspendida em um volume de água destilada igual ao volume original de soro. Em seguida, uma quantidade igual de solução de sulfato de amônio saturado a 70% foi adicionada gota a gota à fração contendo imunoglobulina ressuspendida com agitação, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi decantado, e o precipitado foi ressuspendido como acima. Este procedimento foi em seguida repetido uma vez mais. O precipitado contendo imunoglobulina final foi ressuspendido com água destilada para um décimo do volume de soro original. A fração contendo imunoglobulina ressuspendida foi dialisada contra três volumes de 100x 0,85% de cloreto de sódio pH 8.0 de um dia para o outro a 2-8°C. A concentração de proteína total no retentado da diálise foi determinada pelo Teste de Proteína de Bradford Bio-Rad® de acordo com as instruções do fabricante.

EXEMPLO 3

Purificação de IgG Usando uma Coluna de Afinidade de Proteína A

IgGs foram isoladas da fração contendo imunoglobulina do Exemplo 2 usando cromatografia por ágarose de Proteína A. Conforme é de conhecimento na técnica, a Proteína A liga especificamente à região Fc da IgG de uma variedade de espécies de mamíferos.

Um reservatório de tampão contendo 1000 mL de tampão de

fosfato de sódio a 20 mM, pH 7.4 ("tampão de fosfato") foi conectado a uma coluna de 10 mL de Proteína A Sepharose CL-4B (Pharmacia). A coluna foi lavada com 200 mL do tampão de fosfato, e foi medido o pH do eluente. A coluna não foi carregada com a amostra contendo imunoglobulina até o pH do eluente estar na faixa de 7,3 ± 0,2.

Depois de desconectar o reservatório do tampão, o retentado da diálise contendo imunoglobulina do Exemplo 2 foi aplicado à coluna tomando cuidado para não perturbar a superfície da matriz da coluna. Em seguida, 20 mL de tampão de fosfato foi adicionado à coluna, o reservatório de tampão foi refixado à coluna, e frações foram coletadas usando uma coletor de fração carregado com tubos de 80-12 x 125 mm diâmetro. A absorvência a 280 nm do eluente da coluna foi monitorada. Quando a absorvência a 280 nm do eluente retornou à linha basal (indicando a elutriação substancialmente completa de proteína não específica), um segundo reservatório de tampão contendo 500 mL de glicina a 100 mM pH 2.7 foi conectado à coluna. Novamente, as frações foram coletadas ao mesmo tempo que monitorando a absorvência do eluente a 280 nm. Todas as frações elutrizada no tampão de glicina tendo uma absorvência$_{280nm}$ de 0,1 ou mais foram combinadas. As frações referidas incluíram proteínas especificamente ligadas por Proteína A, isto é, IgGs, que estavam presentes no soro humano infectado por *T. pallidu*. O pH da solução combinada foi ajustado para 7,2 ± 0,2 usando 2,0 M de tampão Tris, e a concentração de proteína total foi determinada conforme descrito previamente.

EXEMPLO 4

Ligação Específica de IgG Purificada em Proteína A a Antígeno de USR em Solução

Foi determinado o título de desfecho das IgGs purificadas com Proteína A obtidas conforme descrito no Exemplo 3. Foram feitas diluições seriais da amostra de IgG (a partir de 1:2 até 1:512) em 0,9% de salina. Cinqüenta (50) µl de cada diluição foi colocado em cada um de 10 círculos (14 mm) sobre uma lâmina de video de 5,08 x 7,62 cm (2 x 3 polegadas).

O antígeno de USR, preparado conforme descrito no Exemplo 1,

foi suavemente ressuspendido e colhido em uma agulha de administração e seringa em uma posição vertical. Várias gotas foram dispensadas e descartadas para limpar a agulha de ar. Em seguida, 1 gota em queda livre (aproximadamente 22 µL) de suspensão de antígeno foi adicionada a cada círculo contendo IgG. A lâmina foi colocada sobre o rotor mecânico por 4 minutos a 180 ± 2 rpm. Ao realizar este teste em um clima seco onde a evaporação pode ser um problema, pode ser vantajoso colocar as lâminas sob uma cobertura umidificante de umidade durante a etapa de rotação. Imediatamente depois de rotação, a lâmina foi visualizada microscopicamente usando oculares de 10x e uma objetiva de 10x para determinar em quais reações ocorreu floculação. O título de IgG foi determinado para serem a maior diluição que dá uma reação fraca (ou fracamente) positiva.

Um volume original de amostra de IgG purificada em Proteína A foi diluída em um primeiro volume de diluição de salina tamponada com fosfato pH 7,2 ± 0,2 ("PBS") para um título de anticorpo eficaz de 1:2048. Portanto, em uma situação onde o título de desfecho da amostra foi 1:32, um volume de amostra foi diluído com 64 volumes de salina tamponada com fosfato pH 7.2 ± 0.2 ("PBS") (Em outros exemplos, um soro tendo um título de desfecho de 1:16 será diluído com 128 volumes de PBS, e um soro tendo um título de desfecho de 1:64 será diluído com 32 volumes de PBS, e etc.). Em seguida, um volume de micela de USR (preparado conforme descrito no Exemplo 1) igual ao volume original de IgG purified foi adicionado à amostra de IgG diluída com suave misturação. A mistura foi deixada para sedimentar a 2-8°C por vários dias até o sobrenadante clarear. Em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído com um volume de PBS igual ao primeiro volume de diluição (por exemplo, 64 volumes de PBS na situação descrita acima). As etapas precedentes foram repetidas até o sobrenadante ser clareado. Depois de remover o sobrenadante final, o volume de material precipitado (contendo complexos de micela de USR -anticorpo (IgG); também referido como micelas revestidas com IgG) foi medido com um cilindro, e a concentração de proteína das revestidas com IgG foi determinada pelo método de Bradford.

EXEMPLO 5

Preparação e Isolamento de Fragmentos Fab

IgG purificada em Proteína A (preparado conforme descrito no Exemplo 3) foi concentrada para aproximadamente 20 mg/ml usando um filtro centrífugo Centricon® (Millipore) e dialisado contra 2 x 1000 mL de Tampão de Amostra (20 mM de fosfato de sódio, 10 mM de EDTA, pH 7.0).

Papaína imobilizada sobre 6% de contas reticuladas ágarose em uma pasta fluida a 50% em 50% de glicerol, 0,1 M de acetato de sódio (pH 4.4) e 0,05% de azida de sódio (Pierce) foi misturado por inversão ou suave agitação para obter uma suspensão uniforme. Em seguida, 2,5 mL da pasta fluida foi adicionado a um tubo de teste de vidro ou outro recipiente de reação adequado. Para equilibrar o gel, 20 mL de Tampão de Digestão recém-preparado (20 mM de fosfato de sódio, 10 mM de EDTA, 20 mM de cisteína-HCl, pH 7.0) foi adicionado à pasta fluida. Em seguida, o gel foi separado do tampão por centrifugação, e este procedimento foi repetido com outros 20 mL de Tampão de Digestão. O gel equilibrado foi ressuspendido em 2,5 mL de Tampão de Digestão.

IgG purificada em Proteína A (2,5 m1 de uma solução de 10 mg/ml) foi diluída com 2,5 mL de Tampão de Digestão. A solução de IgG foi adicionada ao tubo ou recipiente contendo a papaína imobilizada, e a mistura foi incubada a partir de cinco horas até de um dia para o outro em um banho-maria em shaker a 37°C em alta velocidade. Uma misturação constante do gel foi mantida durante a incubação.

Depois da incubação, 7,5 mL de 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5 foi adicionado à mistura da reação, e a mistura foi separada por centrifugação a 300 rpm por 25 minutos. O sobrenadante (o qual contém fragmentos de imunoglobulina) foi removido da papaína imobilizada sedimentada.

O sobrenadante foi passado sobre coluna de uma Proteína A conforme descrito no Exemplo 3. Conforme mostrado na FIGURA 1, foram recuperados dois picos protéicos. O Plco I, o qual não ligou especificamente Proteína A, foi a fração Fab de fragmentos de imunoglobulina, e o Plco II, o qual ligou especificamente Proteína A, foi a fração Fc. As concentrações protéicas das

frações Fab e Fc foram determinadas conforme previamente descrito.

EXEMPLO 6

Análise por Gradiente de Gel de Poliacrilamida SDS de Amostras Contendo Imunoglobulina

Este Exemplo ilustra o teor de proteína de várias amostras produzidas nos Exemplos 2, 3 e 5. Um gradiente de gel poliacrilamida linear a 10-20% pré-fundido Bio-Rad® com 4% de gel de empilhamento foi usado para separar, por tamanho, as bandas de proteína presentes na fração de imunoglobulina de sulfato de amônio (vide o Exemplo 2), Proteína A picos I e II (vide o Exemplo 3), IgG purificada em Proteína A antes e depois de digestão por papaína (vide o Exemplo 5), e IgG picos I (Fab fração) e II (Fc fração) depois de digestão por papaína (vide o Exemplo 5).

As amostras (2,5 µg/µl) foram diluídas a 1:1 em amostra tampão de Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, pH 6.8, 2% de SDS e 25 % de glicerol (sem β-mercaptoetanol)). As amostras foram aquecidas e carregadas nas cavidades respectivas. O tampão do reservatório foi Tris-glicina-SDS (25 mM de Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS). O gel foi passado por 45 minutos a 200 volts. Depois de três lavagens com H_2O, os géis foram corados por 30 minutos com Pierce Gel Code Blue® e em seguida clareados por lavagem repetida com água.

Conforme mostrado na FIGURA 2, a fração de soro (alameda 2) hiperimune humano (sifilítico) precipitada com sulfato de amônio continha uma mistura de bandas de proteína de predominantemente alto peso molecular. Conforme mostrado na FIGURA 2, alameda 4, uma fração de IgG relativamente pura foi ligada por e elutriada de uma coluna de Proteína A. Digestão por papaína da IgG purificada em Proteína A produziu uma mistura de proteínas (alameda 6), as quais foram separáveis em duas populações de proteínas por fracionamento sobre uma coluna de Proteína A. A FIGURA 2, alameda 7 mostra que um fragmento de IgG digerido por papaína predominante de aproximadamente 54 kD não foi retido pela coluna de Proteína A. Este peso molecular aparente é o tamanho esperado de fragmentos Fab. Não houve substancialmente bandas de proteína de maior peso molecular

(representando, por exemplo, fragmentos Fab_2 ou Fc ou IgG não digerida) observadas na alameda 7. Proteínas tendo os pesos moleculares esperados de fragmentos Fc e IgG não digerida foram retidas pela coluna de Proteína A (alameda 8).

EXEMPLO 7

Conjugado de Ouro Coloidal e Proteína A Não Detecta Fragmentos Fab

Um (1) µl das frações de digestão por papaína de IgG (preparado conforme descrito no Exemplo 5) foi pintado sobre uma membrana de nitrocelulose de 5 mm x 4 cm e secados de um dia para o outro. Cem (100) µl de caseína a 1% em 10 mM de tampão de fosfato com 0,25 M de cloreto de sódio, pH 7.4 foram colocados dentro das cavidades correspondentes de uma lâmina de microtítulo. Dois (2) µl de Proteína A conjugada a ouro coloidal foram misturados dentro de cada cavidade e as tiras correspondentes foram colcoadas dentro de cada cavidade.

Conforme mostrado na FIGURA 3, conjugado de ouro coloidal e Proteína A detectaram as frações de IgG e Fc mas não as frações Fab.

EXEMPLO 8

Determinação de uma Quantidade Útila de Fab para Fixar a Micela de USR

Fragmentos Fab preparados conforme descrito no Exemplo 5 foram diluídos em PBS para 1000 µg/µl, 100 µg/µl, 10 µg/µl, 1 µg/µl, 100 ng/µl e 10 ng/µl. Cada diluição de fração Fab foi misturada com um volume igual de uma solução de micelas de USR preparada conforme descrito no Exemplo 1. Um (1) µl desta mistura de Fab-micelas de USR foi pintado sobre uma membrana de nitrocelulose de 5 mm x 4 cm e secado de um dia para o outro em temperatura ambiente.

Um anti-soro humano (o qual foi reativo no teste de RPR em uma diluição a 1:64) foi diluído a 1:400 em um tampão consistindo em 1% de caseína, 10 mM de fosfato, 0,25 M de cloreto de sódio pH 7.4. Um soro humano RPR-não-reativo diluído de modo similar foi usado como um controle negativo. Cem (100) µl de anti-soro (ou soro não-reativo) e 2 µl de ouro coloidal Proteína A foram combinados em cada uma de várias cavidades de

uma lâmina de microtítulo. Uma única tira de nitrocelulose contendo antígeno lipoidal reagido com Fab secado foi colocada dentro de cada cavidade em temperatura ambiente por um tempo suficiente para os componentes dispostos dentro das cavidades migrarem ao longo da membrana para a localização onde a mistura de Fab-micelas de USR foi pintada.

Conforme mostrado na FIGURA 4, tiras de nitrocelulose tendo 1000, 10 ou 0,1 µg de Fab ligado ao antígeno de USR deu uma reação positiva com soro humano RPR-reativo (R). Não foi observada reação para quaisquer das amostras contendo soro RPR-não-reativo (NR).

Este Exemplo demonstra que, no mínimo, fragmentos Fab de a partir de cerca de 100 ng a cerca de 1 mg (tal como de cerca de 100 ng a cerca de 450 ng) podem ser reagidos com uma preparação de antígeno de USR (vide o Exemplo 1) para facilitar a fixação do antígeno lipoidal a uma membrana de nitrocelulose sem efeito adverso substancial sobre a reatividade do antígeno de USR com anticorpos antilipoidais séricos em uma prova de imunoensaio (tal como, tiras de teste, e dispositivos de fluxo direto e/ou fluxo lateral). Uma quantidade de fragmento Fab útila e não limitante para usar conforme descrito neste Exemplo é cerca de 10 µg.

EXEMPLO 9

Determinação de um pH Útila para Conjugação de IgG Anti-Humana de Coelho (Fc) Purificada por Afinidade a Ouro Coloidal

Este Exemplo ilustra um método representativo para determinar um pH útila para conjugação por afinidade de IgG anti-humana de coelho purificada (Fc) (Rockland, Gilbertsville, Pa.) com ouro coloidal. A IgG anti-humana de coelho (Fc) especificamente liga somente a porção Fc de IgG humana, e não liga às regiões Fab ou outras regiões não-Fc de uma IgG humana. Anticorpos com esta especificidade também podem ser referidos como "Fc anti-humano." Preparações de ouro coloidal tais como as descritas neste e em outros exemplos podem ser usadas como reagentes detectores em imunoensaios descritos (incluindo, por exemplo, tiras de teste, e dispositivos de fluxo direto e/ou fluxo lateral).

Cerca de 25 mL de tampão de fosfato a 10 mM foi colocado den-

tro de um béquer de 50 mL, e ajustado para pH 5.0 com 0,2 M de ácido fosfórico. Duas alíquotas de 0,5 mL do tampão em pH 5.0 foram transferidas para os dois tubos de teste de 12 x 75 mm, um marcado "teste" e o outro marcado "controle." Em seguida, o pH do tampão de fosfato remanescente dentro do béquer foi seqüencialmente ajustado para 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, e 10.0 usando 0,2 M de carbonato de potássio. Em cada pH, duas alíquotas de 0,5 mL foram transferidas para um tubo de teste de "teste" e de "controle" conforme descrito para a amostra de pH 5.0. Em seguida, 30 µg de IgG anti-humana de coelho purificada por afinidade (Fc) foi adicionado a cada um dos tubos de "teste" e "controle", e os conteúdos dos tubos foram bem misturados. Cerca de 25 mL de 40 nm de ouro coloidal (solução a 1%) (British Biocell International, Londres, Inglaterra) foi colocado dentro de um béquer separado de 50 mL, e foi produzida uma série de amostras de ouro coloidal de "controle" e de "teste" em pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, e 10.0 conforme descrito acima.

Um (1) mL de ouro coloidal em cada pH foi adicionado às soluções de "teste" e de "controle" tendo o pH correspondente. As soluções de ouro/IgG anti-humana de coelho (Fc) foram bem misturadas, e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de NaCl a 2 M foi adicionado à série de tubos marcados "teste" e 200 µl de água destilada foi adicionado à série de tubos marcados "controle." Os conteúdos de ambas as séries de tubos foram deixados para incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.

A densidade ótica a 580 nm (OD_{580}) de cada amostra de "teste" foi lida contra a amostra de "controle" correspondente. O pH da amostra com a menor OD_{580} foi determinado como sendo um pH favorável para a formação de uma preparação de conjugado de ouro. Partículas de ouro coloidal têm uma superfície carregada negativamente devido à camada de íons negativos adsorvidos sobre a superfície das partículas de ouro durante o processo de fabricação. Proteínas, tais como IgG serão atraídas para partículas de ouro carregadas negativamente através de interações iônicas, hidrofóbicas, e dativas. Acredita-se que estas interações fundamentem a formação

de conjugados de ouro coloidal-proteína. No pI de uma proteína conjugada a uma partícula de ouro (isto é, o pH onde a proteína tem uma carga zero líquida), o conjugado será o mais estável.

A adição de NaCl a partículas de ouro coloidal não conjugadas romperá a camada de íons negativamente carregados adsorvidos à superfície do ouro. Em conseqüência, a partícula de ouro dissociará e finalmente liberará íons de ouro (isto é, Au^{+}) em solução. Os íons de ouro livres podem ser medidos em OD_{580}. Em contraste, um conjugado de proteína-ouro é resistente a disrupção por NaCl no pI do componente da proteína do conjugado. Por conseguinte, o pH da amostra com a menor OD_{580} é um pH útila no qual realizar reações de conjugação de ouro para obter um conjugado de ouro estável.

Conforme mostrado na FIGURA 5, um pH útila para conjugação de 30 µg de IgG anti-humana de coelho (Fc) com até 10 µg de ouro coloidal (isto é, 1 mL de uma solução a 1%) é aproximadamente pH 9.5. O método descrito neste Exemplo é amplamente aplicável a qualquer número de outras proteínas que podem ser conjugadas a ouro para uso em um imunoensaio revelado (tal como, Proteína A ou Proteína G). Além disso, acredita-se que as reações descritas são escaláveis para outras quantidades de conjugado de ouro e proteína.

EXEMPLO 10

Determinação de uma Concentração de Proteína Útila para Conjugação de Ouro Coloidal

Este Exemplo ilustra um método exemplar para determinar uma concentração de proteína útila para reações de conjugação com ouro coloidal. Preparações de ouro coloidaltais como as descritas neste e em outros exemplos podem ser usadas como reagentes detectores em imunoensaios descritos (incluindo, por exemplo, tiras de teste, e dispositivos de fluxo direto e/ou fluxo lateral).

Metade (0,5) mL de 10 mM de tampão de fosfato (ajustado para o pH dando a menor OD_{580} conforme descrito no Exemplo 9) foi adicionado a 2 séries de 5 tubos. Uma série de tubos foi etiquetada "teste" e a outra série

foi etiquetada "controle." Trinta (30) µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg, ou 2,5 µg de IgG anti-humana de coelho (Fc) foi em seguida adicionado a cada uma das séries de tubos, e bem misturados. Um (1) mL de 40 nm de ouro coloidal (solução a 1% ajustada para o mesmo pH que o tampão de fosfato) foi adicionado a cada tubo. As amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de 2 M de NaCl foi adicionado às amostras etiquetadas "teste" e 200 µl de água destilada foi adicionado às amostras etiquetadas "controle." Depois de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, a OD_{580} das amostras de teste foram lidas contra as amostras controle correspondentes. A menor concentração de IgG anti-humana de coelho (Fc) produzindo a menor OD_{580} indica uma concentração útila (ou faixa de concentração) para formação de uma preparação de conjugado de proteína-ouro.

Neste Exemplo, a menor concentração de IgG anti-humana de coelho (Fc) produzindo a menor OD_{580} representa a concentração onde uma quantidade útila de IgG anti-humana de coelho (Fc) foi associada com partículas de ouro. Maiores concentrações de IgG anti-humana de coelho (Fc), embora úteis, são menos preferenciais porque o excesso de IgG anti-humana de coelho (Fc) pode formar associações mais fracas com as partículas de ouro, por exemplo, revestindo uma camada de moléculas de IgG anti-humana de coelho (Fc) que associaram previamente com as partículas de ouro.

Conforme mostrado na FIGURA 6, aproximadamente 30 µg é uma quantidade útila de IgG anti-humana de coelho (Fc) para conjugar a 10 µg de ouro coloidal (isto é, 1 mL de uma solução a 1%). O método descrito neste Exemplo é amplamente aplicável a qualquer número de outras proteínas que podem ser conjugadas a ouro para uso em um imunoensaio revelado (tal como, Proteína A ou Proteína G). Além disso, acredita-se que as reações descritas são escaláveis para outras quantidades de proteína e conjugado de ouro.

A. Preparação de uma "Mini-preparação" Conjugada a Ouro

Uma mini preparação de conjugado de ouro de Fc anti-humano

de coelho foi preparada adicionando 5 mL de tampão de borato a 10 mM a uma quantidade de IgG anti-humana de coelho (Fc) necessária para obter uma concentração de proteína útila (tal como, 30 µg) conforme descrito acima. Esta solução de proteína foi em seguinte ajustada para um pH útila (tal como, pH 9.5) conforme também descrito acima. Dez (10) mL de outo coloidal 40 nm (solução a 1% ajustada para o pH útila) foi adicionado à solução de proteína com pH ajustado com completa misturação. A mistura foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 1,6 mL de caseína a 10% foi adicionado para uma concentração final de 1% de caseína, e a incubação foi continuada um adicional de 20 minutos em temperatura ambiente. A mistura da reação foi centrifugada a 6500 x g por 10 minutos, e o sobrenadante foi removido e descartado. O pélete foi ressuspendido em 0,5 mL de tampão de ressuspensão (150 mM de NaCl, 20 mM de base Trizma, 10% de sucrose, 5% de Trehalose, 0,1% de caseína, 0,05% de azida de sódio).

O pélete ressuspendido contendo IgG anti-humana de coelho conjugada a ouro (Fc) pode ser usado para uma variedade de fins, incluindo sem limitação, como um reagente detector para anticorpos antilipoidais humanos em um dispositivo de fluxo lateral.

EXEMPLO 11

Detecção de Anticorpos Antilipoidais no Soro Humano

Este Exemplo demonstra que anticorpos antilipoidais em soro sifilítico podem ser detectados usando um reagente de captura de complexo antigênico Fab-USR imobilizado com nitrocelulose em combinação com uma IgG anti-humana de coelho móvel (Fc) ou reagente detector conjugado de ouro de Proteína A.

Um (1) µl do complexo antigênico Fab-USR foi aplicado para separar membranas de nitrocelulose e deixado para secar de um dia para o outro em temperatura ambiente conforme descrito no Exemplo 8. Um conjugado de ouro coloidal foi preparado conforme descrito no Exemplo 10. Soros sifilíticos humanos reativos e um soro humano não reativo (não sifilítico) foram diluídos a 1:100, 1:200 ou 1:400 em 1% de caseína, 10 mM de fosfato,

0,5 M de cloreto de sódio pH 7.4. Cem (100) µl de cada diluição de soro foi colocado em um número apropriado de cavidades separadas de uma lâmina de microtítulo. Dois (2) µl de Proteína A conjugada a ouro (preparado em uma maneira análoga ao Exemplo 10) foi em seguida adicionado a cada cavidade. Uma tira de nitrocelulose contendo reagente de captura de complexo antigênico Fab-USR imobilizado foi em seguida colocado dentro de cada cavidade contendo as soluções de anticorpo e reagente detector. A solução dentro das cavidades escoou para o alto da tira por ação capilar.

Conforme mostrado na Tabela 2, muitos dos sessenta soros sifilíticos humanos reativos reagiram com as preparações de antígeno Fab-USR imobilizado. Uma reação positiva foi caracterizada por um ponto visível de várias gradações de intensidade de cor, a partir de muito pálido (VF), pálido (F), fraco (W) e forte (S). Nenhuma reação visível foi indicada por "N." Não houve nenhuma reação observada para o soro humano não reativo (não sifilítico) em qualquer diluição de soro testada.

Tabela 2. Reatividade de Anticorpo Lipoidal Imobilizado com Soros Sifilíticos Humanos

Soro Nº	Título de RPR [a]	Diluições do Soro		
		100	200	400
1	R4	VF	VF	N
2	R8	N	VF	F
3	R2	N	N	N
4	R16	VF	N	W
5	R32	S	S	S
6	NR	N	N	N
7	R64	VF	F	W
8	R128	S	S	S
9	R4	VF	VF	N
10	R64	W	W	W
11	R256	S	S	S
12	NR	N	N	N
13	R512	S	S	S

Soro Nº	Título de RPR [a]	Diluições do Soro		
		100	200	400
14	R16	VF	W	W
15	R8	W	W	F
16	R1024	S	S	S
17	NR	N	N	N
18	R512	S	S	S
19	R64	F	W	W
20	R256	S	S	S
21	R8	VF	VF	F
22	R1024	S	S	S
23	NR	N	N	N
24	R32	W	S	S
25	R16	VF	F	W
26	R8	W	W	W
27	R32	W	W	S
28	R4	N	N	VF
29	NR	N	N	N
30	R1024	S	S	S
31	R32	S	S	S
32	R16	VF	W	W
33	NR	N	N	N
34	NR	N	N	N
35	R32	W	W	S
36	R64	F	W	W
37	R8	VF	F	W
38	NR	N	N	N
39	R4	N	N	VF
40	R32	W	S	S
41	R8	F	W	W
42	R128	W	S	S
43	R2	N	N	N

Soro Nº	Título de RPR [a]	Diluições do Soro		
		100	200	400
44	R512	S	S	S
45	R16	VF	W	W
46	R1024	S	S	S
47	NR	N	N	N
48	R64	VF	F	W
49	R512	S	S	S
50	NR	N	N	N
51	R256	S	S	S
52	R4	VF	F	N
53	R128	S	S	S
54	R32	W	W	S
55	R2	N	N	N
56	R256	S	S	S
57	NR	N	N	N
58	R64	W	W	S
59	R8	W	W	F
60	R128	S	S	S

[a] O Título de RPR é a maior diluição de soro sifilítico reativo a qual dá uma reação visível no teste de reagina plasmática rápida padrão (RPR).

EXEMPLO 12

Detecção Simultânea de Anticorpos Não Treponemal e Treponemal no Soro ou Plasma Humanos

Este Exemplo demonstra um dispositivo de teste de fluxo direto que possibilita a detecção simultânea em uma amostra biológica (tal como, soro ou plasma humanos) de anticorpos específicos para antígenos treponemais ou não treponemais (lipoidais). O dispositivo referido é útila, por exemplo, no diagnóstico de sífilis em um sujeito.

O dispositivo de teste de fluxo direto usado neste Exemplo incluiu uma membrana pintada com antígeno treponemal recombinante, antígeno de VDRL (imobilizado conforme descrito nos Exemplos precedentes) e um

controle. O dispositivo de protótipo foi proporcionado pela Span Diagnostics Ltd. (173-B, New Industrial Estate, Udhna, Surat -394 210, India). O antígeno treponemal recombinante, antígeno de VDRL imobilizado, e controle foram dispostos em uma configuração triangular ao longo das bordas da membrana (vide, por exemplo, a FIGURA 10). Os estudos foram realizados com o dispositivo de teste em repouso sobre uma superfície horizontal para assegurar distribuição igual dos reagentes durante o teste.

Cem (100) µl de tampão de lavagem foi adicionado ao centro do dispositivo de teste e deixado para embeber por no mínimo 30 segundos. O tampão de lavagem era destituído de solventes orgânicos e detergentes. Cem (100) µl de um soro ou plasma humanos foi em seguida adicionado ao centro da membrana do dispositivo de teste e foi deixado para reagir com a superfície por no mínimo 30 segundos. Se as amostras devessem ser mantidas por um período de tempo curto, as amostras foram armazenadas a 2-8°C. Para armazenamento mais longo, as amostras foram armazenadas a -20°C ou menos. Antes de testar amostras previamente congeladas, as amostras foram completamente degeladas, suavemente misturadas e submetidas a centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante transparente resultante foi em seguida testado. O dispositivo de teste foi em seguida lavado com tampão de lavagem (150 µl por no mínimo 30 segundos, o qual possibilitou a absorção da solução). Para determinar se anticorpos específicos para um ou mais antígenos treponemais e/ou não treponemais (lipoidais) estavam presentes na amostra, 200 µl de SIGNAL REAGENT (Reagente de Proteína A de Ouro Coloidal) foi adicionado e deixado para embeber. Para a interpretação inicial, os resultados foram lidos depois de cerca de 2 minutos. Para uma interpretação final os resultados foram lidos depois de cerca de 10 minutos.

Se um ponto colorido apareceu somente na área de controle, então a amostra foi considerada como sendo não reativo para anticorpos específicos para quer um ou mais antígenos treponemais e/ou não treponemais (lipoidais). A reatividade na área controle somente indicou que o dispositivo estava funcionando adequadamente, e indicou adicionalmente um di-

agnóstico negativo para sífilis (ou infecção por *T. pallidum*) para o sujeito do qual a amostra foi obtida. Se o ponto controle e qualquer um ou ambos os pontos de antígeno treponemal e/ou não treponemal foram reativos (isto é, coraram), foi adicionalmente considerado um diagnóstico positivo de sífilis (ou infecção por *T. pallidum*) no indivíduo (conforme discutido abaixo em mais detalhes). Se, ao completar o teste, nenhum dos pontos controle, de antígeno treponemal ou de antígeno não treponemal pareceram reativos, então o teste foi considerado inválido.

A Tabela 3 ilustra os resultados obtidos a partir do processamento de 150 amostras obtidos de doadores saudáveis que não tinham sido previamente infectados com *T. pallidum*.

Tabela 3

Amostra Qty	Teste de VDRL	Teste de TPHA	Teste de Fluxo direto	
			Ponto Treponemal	Ponto Não Treponemal
150	+ve: 2 -ve: 148	-ve: 150	-ve: 150	+ve: 2 -ve: 148

Os testes de VDRL e TPHA são testes à base de solução para detectar em amostras de indivíduos anticorpos específicos para antígenos não treponemais (lipoidais) e antígenos treponemais, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 3, o teste à base de membrana (de fluxo direto) para a detecção de cada tipo de anticorpo em amostras de pacientes proporcionaram o resultado idêntico ao teste à base de solução para o anticorpo correspondente. Vantajosamente, o teste de fluxo direto de detecção dupla possibilitou que tanto anticorpos anti-treponemais quanto anti-não-treponemais (antilipoidais) fossem detectados em um único ensaio. Somente duas amostras (1,3%) de um sujeito saudável apresentaram uma reação positiva com o teste de VDRL e o antígeno não treponemal (lipoidal) do dispositivo de fluxo direto. Portanto, ambos os testes tiveram incidência baixa e idêntica de resultados falso positivos e nenhuma incidência idêntica de resultados falso negativos ao testar soro de sujeitos não infectado com *T. pallidum*.

O dispositivo de teste foi em seguida usado para analisar soro de nove pacientes que se sabia estarem (ou terem sido) infectados com *T. pallidum* (o soro dos pacientes referidos também é referido como soro sifilítico). Conforme demonstrado na Tabela 4A, o teste à base de membrana (de fluxo direto) proporcionou resultados idênticos aos testes à base de solução para cada amostra; isto é, cada amostra teve a mesma reatividade no teste de VDRL à base de solução como para o antígeno não treponemal ligado a membrana, e no teste de TPHA à base de solução como para o antígeno treponemal ligado a membrana. Conforme descrito acima para as amostras de soro de indivíduos "saudáveis", a vantagem do teste de fluxo direto foi a capacidade para usar um único teste para testar simultaneamente o soro de pacientes para reatividade a antígenos treponemais e não treponemais (lipoidais).

Tabela 4A.

Amostra No.	Teste de VDRL	Teste de TPHA	Fluxo direto		
			Controle	Antígeno Treponemal	Antígeno Não Treponemal
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	-	+	-	+
8	+	-	+	-	+
9	+	-	+	-	+

Para comparar a sensibilidade dos testes de VDRL e TPHA à base de solução com o dispositivo de teste de fluxo direto, soro da amostra 6 acima foi selecionado, diluído serialmente, e cada dilution foi testado conforme acima. Conforme demonstrado na Tabela 4B, a sensibilidade do dispositivo de fluxo direto para detecção simultânea de anticorpos anti-não-treponemais (antilipoidais) e anti-treponemais em soro sifilítico foi similar ao teste de solução de detecção única para cada tipo do anticorpo.

Tabela 4B.

Diluição	Teste de VDRL	Teste de TPHA	Fluxo direto		
			Controle	Treponemal	Não treponemal
1:10	+	+	+	+	+
1:20	+/-	+	+	+	-
1:40	-	+	+	+	-
1:80	-	+/-	+	+	-
1:160	-	-	+	+/-	-
1:320	-	-	+	-	-
1:640	-	-	+	-	-

Amostras de quarenta e dois (42) pacientes foram triadas para anticorpos anti-treponemais e anti-não-treponemais (antilipoidais) usando o dispositivo de fluxo direto de detecção dupla e os testes à base de solução de TPHA e RPR. Em teste tradicional para sífilis, o soro dos pacientes freqüentemetne é primeiro triado para reatividade com um antígeno não treponemal (antígeno lipoidal), por exemplo, usando o teste de RPR. O teste de RPR tipicamente é relizado em um laboratório e pode levar vários dias para completar; entrementes, o paciente testado é liberado do local de teste. Se o teste de RPR for positivo, seria recomendado um teste subseqüente para determinar a reatividade do soro do paciente com um ou mais antígenos treponemais (tal como, o teste de TPHA) para um diagnóstico positivo de sífilis. Freqüentemetne é difícila fazer um paciente retornar para realizar um teste de TPHA subseqüente, cujo testte também é realizado tipicamente em um laboratório e pode levar dias para completar. Testar amostras de pacientes somente para reatividade a um ou mais antígenos treponemais (por exemplo, usando o teste TPHA) também tem limitações porque uma vez que um paciente tenha sido infectado com *T. pallidum* (isto é, tenha tido sífilis), seu título para anticorpos anti-treponemais tipicamente permanece elevado mesmo depois de tratamento bem-sucedido. Portanto, um teste positivo para antígeno treponemal somente pode não ser totalmente informativo.

As características de performance do dispositivo de fluxo direto comparado com os testes à base de solução de RPR ou TPHA na experimentação de uma população de 42 pacientes são apresentadas na Tabela

5A e 5B, respectivamente.

Tabela 5A

		TPHA		
		+	-	Total
Ponto Treponemal	+	20	4	24
	-	1	17	18
		21	21	42

A sensitibilidade do dispositivo de fluxo direto para detectar anticorpos anti-treponemais foi 95% e a especificidade foi 81%.

Tabela 5B

		RPR		
		+	-	Total
Ponto Não Treponemal	+	13	0	13
	-	1	28	29
		14	28	42

A sensitibilidade do dispositivo de fluxo direto para detectar anticorpos anti-não-treponemais (antilipoidais) foi de 93% e a especificidade foi de 100%.

De 42 pacientes triados, 13 pacientes foram considerados como sendo positivos para ponto tanto RPR quanto não treponemal (Tabela 5B, número esquerdo superior), e 20 foram considerados como sendo positivos para ponto tanto TPHA quanto treponemal (Tabela 5A, número esquerdo superior). Todos os 13 pacientes que foram positivos para ponto tanto RPR quanto não treponemal também foram positivos para ponto TPHA quanto treponemal. Portanto, baseado nos resultados do dispositivo de fluxo direto somente, estes 13 pacientes teriam sido tratados para sífilis imediatamente sem necessidade de experimentação subseqüente.

No uso do dispositivo de teste de fluxo direto descrito neste Exemplo, uma série de não limitante de recomendações de tratamento clínico são:

Ponto Treponemal	Ponto Não Treponemal	Recomendação Clínica
-	-	Nenhuma ação a ser tomada; repetir teste de fluxo direto depois de cerca de 3 meses, especialmente em populações em alto risco de sífilis
-	+	Nenhum tratamento para sífilis; investigar causas alternativas para título elevado de anticorpos antilipoidais (por exemplo, lúpus)
+	+	Tomar sangue para teste RPR quantitativo e obter medição basal; tratar paciente para sífilis; e repetir teste de RPR quantitativo em 6 meses para determinar a eficácdia do tratamento
+	-	Nenhum tratamento para sífilis; repetir teste de fluxo direto depois de cerca de 3 meses para detectar infecção ativa

Apesar desta descoberta ter sido descrita com uma ênfase em modalidades particulares, será óbvio para aqueles de conhecimento regular da técnica que podem ser usadsa variações das modalidades particulares e se pretende que a descoberta possa ser praticada de modo diverso de conforme especificamente descrito aqui, neste requerimento de patente. Por conseguinte, esta descoberta inclui todas as modificações englobadas dentro do espírito e do escopo da descoberta conforme definido pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo de imunoensaio, caracterizado pelo fato de que compreende um substrato microporoso tendo uma área de captura de anticorpo antilipoidal, compreendendo:

(a) um anticorpo âncora imobilizado sobre o substrato; e

(b) um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina, lecitina, e colesterol,

em que o anticorpo âncora imobilizado é especificamente ligado a um ou mais dos componentes de cardiolipina, lecitina ou colesterol do antígeno lipoidal formando deste modo um complexo de anticorpo âncora imobilizado-antígeno lipoidal.

2. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato é uma membrana microporosa.

3. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo âncora não liga especificamente um epítopo exógeno em um ou mais dos componentes de cardiolipina, lecitina ou colesterol do antígeno lipoidal.

4. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o antígeno lipoidal compreende uma micela e não um lipossoma.

5. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo âncora é especificamente ligado ao componente de cardiolipina do antígeno lipoidal.

6. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para determinar no mínimo uma da presença ou quantidade de um anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido, compreendendo adicionalmente uma área de aplicação da amostra e um caminho de fluxo da área de aplicação da amostra para a área de captura de anticorpo antilipoidal; em que a no mínimo uma da presença ou quantidade de um anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido pode ser detectada por formação de um complexo entre um anticorpo antilipoidal em uma amostra de

fluido e o complexo de antígeno lipoidal imobilizado-anticorpo âncora.

7. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma área de captura treponemal compreendendo:

(a) um antígeno treponemal imobilizado capaz de ser especificamente ligado por um anticorpo anti-*T. pallidum*, ou

(b) um anticorpo anti-*T. pallidum* imobilizado que liga especificamente um antígeno treponemal móvel.

8. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o substrato compreende nitrocelulose, náilon, fluoreto de polivinilideno (PVDF), polietersulfona, policarbonato, poliéster, acetato de celulose, ésteres celulósicos mistos, ou combinações dos mesmos.

9. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo âncora é um fragmento Fab específico para cardiolipina.

10. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo âncora é uma pluralidade de fragmentos Fab produzidos a partir de uma fração de imunoglobulina de um sujeito infectado com *T. pallidum*.

11. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o antígeno lipoidal é um antígeno de USR, um antígeno de VDRL, ou um antígeno de VDRL sintético.

12. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a área de captura de anticorpo antilipoidal compreende uma ou mais linhas.

13. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a uma ou mais linhas têm uma largura de cerca de 8 mm a cerca de 15 mm.

14. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1 ou 7, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de fluxo direto.

15. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um bloco absorvente, o qual está em contato com o substrato.

16. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o substrato tem um tamanho de poro de cerca de 0,2 μm a cerca de 8 μm.

17. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1 ou 7, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de fluxo lateral.

18. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o substrato tem um tamanho de poro de até cerca de 12 μm.

19. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de fluxo lateral compreende ainda um bloco de conjugado localizado no caminho de fluxo, em que o bloco de conjugado compreende um reagente de detector móvel ou mobilizável específico para o anticorpo antilipoidal.

20. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o reagente de detector compreende Proteína A conjugada a ouro, Proteína G Fc-específica conjugada a ouro, ou anticorpo anti-humano conjugado a ouro (porção Fc).

21. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o bloco de conjugado compreende ainda um reagente de detector móvel ou mobilizável específico para o anticorpo anti-*T. pallidum* ou o antígeno treponemal móvel.

22. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o reagente de detector específico para o anticorpo anti-*T. pallidum* compreende Proteína A conjugada a ouro, Proteína G Fc-específica conjugada a ouro, ou anticorpo anti-humano conjugado a ouro (porção Fc), ou o reagente de detector para o antígeno treponemal móvel compreende anticorpo antiantígeno treponemal marcado com ouro.

23. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora é imobilizado sobre o substrato por um método compreendendo:

contactar o antígeno lipoidal com um ou mais anticorpos âncora específicos para no mínimo um entre cardiolipina, lecitina, ou colesterol para formar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora; e

aplicar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora ao substrato.

24. Dispositivo de imunoensaio de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora é imobilizado sobre o substrato por um método, compreendendo:

imobilizar um anticorpo âncora específico para no mínimo um entre cardiolipina, lecitina, ou colesterol sobre o substrato;

bloquear sítios de ligação não específicos sobre o substrato;

contactar o anticorpo âncora imobilizado com um antígeno lipoidal para formar um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora; e

lavar o substrato para remover qualquer antígeno lipoidal não ligado especificamente pelo anticorpo âncora.

25. Método para detectar anticorpos antilipoidais em um sujeito, caracterizado pelo fato de compreende:

aplicar uma amostra biológica de um sujeito ao dispositivo de imunoensaio, como definido na reivindicação 1; e

detectar a formação de um complexo entre um anticorpo antilipoidal presente na amostra biológica e o complexo de antígeno lipoidal imobilizado-anticorpo âncora, em que a detecção da formação do complexo detecta o anticorpo antilipoidal no sujeito.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a detecção do anticorpo antilipoidal é usada para diagnosticar sífilis no sujeito.

27. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é sangue, soro, exudado de úlcera de pele, urina, saliva, escarro, ou fluido cerebroespinhal.

28. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende ainda aplicar ao dispositivo de imunoensaio um reagente de detector específico para o anticorpo antilipoidal.

29. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende ainda adicionar um reagente de detector específico para o anticorpo antilipoidal à amostra biológica antes de ou simultaneamente com a aplicação da amostra ao dispositivo de imunoensaio.

30. Método de acordo com a reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que o reagente de detector é Proteína A marcada, Proteína G Fc-específica, ou anticorpo anti-humano.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a etiqueta é uma enzima, partículas de ouro coloidal, partículas de látex coloridas, um agente quimiluminescente, ou um agente fluorescente.

32. Método para diagnosticar sífilis em um sujeito, caracterizado pelo fato de que compreende:

aplicar uma amostra biológica ao dispositivo, como definido na reivindicação 7;

detectar na área de captura de anticorpo antilipoidal a formação de um primeiro complexo entre um anticorpo antilipoidal presente na amostra biológica e o complexo de antígeno lipoidal imobilizado-anticorpo âncora; e

detectar na área de captura treponemal a formação de um segundo complexo entre:

(a) um anticorpo anti-*T. pallidum* presente na amostra biológica e o antígeno treponemal imobilizado, ou

(b) um antígeno treponemal presente na amostra biológica e o anticorpo anti-*T. pallidum* imobilizado,

em que a detecção da formação do primeiro complexo e o segundo complexo é usada para diagnosticar sífilis no sujeito.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado

pelo fato de que a amostra biológica é uma amostra de sangue humano.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a amostra de sangue humano é sangue total ou soro.

35. Dispositivo de imunoensaio, caracterizado pelo fato de que é para determinar no mínimo uma da presença ou quantidade de um anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido compreendendo:

uma membrana microporosa;

uma área de aplicação da amostra;

uma área de captura de anticorpo antilipoidal compreendendo um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo âncora, cujo complexo compreende um anticorpo âncora e um antígeno lipoidal especificamente ligado pelo anticorpo âncora, e cujo complexo é imobilizado sobre a membrana pelo anticorpo âncora; em que o antígeno lipoidal compreende cardiolipina, lecitina e colesterol; e

um caminho de fluxo da área de aplicação da amostra para a área de captura de anticorpo antilipoidal; em que a presença e/ou quantidade de um anticorpo antilipoidal em uma amostra de fluido aplicada à área de aplicação da amostra pode ser detectada por formação de um complexo entre o anticorpo antilipoidal e o complexo de antígeno lipoidal imobilizado-anticorpo âncora.

36. Método para imobilizar cardiolipina imunorreativa sobre um substrato, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

contactar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina imunorreativa, com um ou mais anticorpos específicos para no mínimo um componente do antígeno lipoidal para formar um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo; e

aplicar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo a um substrato, em que a aplicação do complexo de antígeno lipoidal-anticorpo ao substrato imobiliza a cardiolipina imunorreativa sobre o substrato.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o antígeno lipoidal é um antígeno de USR, um antígeno de VDRL, ou um antígeno de VDRL sintético.

38. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um fragmento de anticorpo que não reagirá substancialmente com Proteína A, Proteína G Fc-específica, ou anticorpo anti-humano (porção Fc).

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um fragmento Fab.

40. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é isolado do soro de um sujeito infectado com *T. pallidum* ou inoculado com *T. pallidum*.

41. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o substrato compreende nitrocelulose.

42. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que compreende:

contactar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina imunorreativa, lecitina, e colesterol, com um fragmento de anticorpo específico para cardiolipina, lecitina, ou colesterol para formar um complexo de antígeno lipoidal-anticorpo; em que o fragmento de anticorpo não reage substancialmente com Proteína A, Proteína G Fc-específica, ou anticorpo anti-humano(porção Fc); e

aplicar o complexo de antígeno lipoidal-anticorpo a um substrato, o qual imobiliza a cardiolipina imunorreativa sobre o substrato.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que compreende:

contactar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina imunorreativa, com um fragmento Fab específico para cardiolipina, lecitina, ou colesterol para formar um complexo de antígeno lipoidal-Fab; em que o antígeno lipoidal é um antígeno de USR, um antígeno de VDRL, ou um antígeno de VDRL sintético; e

aplicar o complexo de antígeno lipoidal-Fab a nitrocelulose, o qual imobiliza a cardiolipina imunorreativa sobre a nitrocelulose.

44. Método para imobilizar cardiolipina imunorreativa sobre um substrato, caracterizado pelo fato de que compreende:

imobilizar um ou mais anticorpos específicos para no mínimo um entre cardiolipina, lecitina ou colesterol sobre um substrato;

bloquear sítios de ligação não específicos sobre o substrato;

aplicar um antígeno lipoidal, compreendendo no mínimo uma cardiolipina imunorreativa, lecitina ou colesterol, ao substrato para formar complexos de antígeno lipoidal-anticorpo imobilizado; e

lavar o substrato para remover qualquer antígeno lipoidal que é não ligado especificamente pelo um ou mais anticorpos imobilizados.

FIG. 1

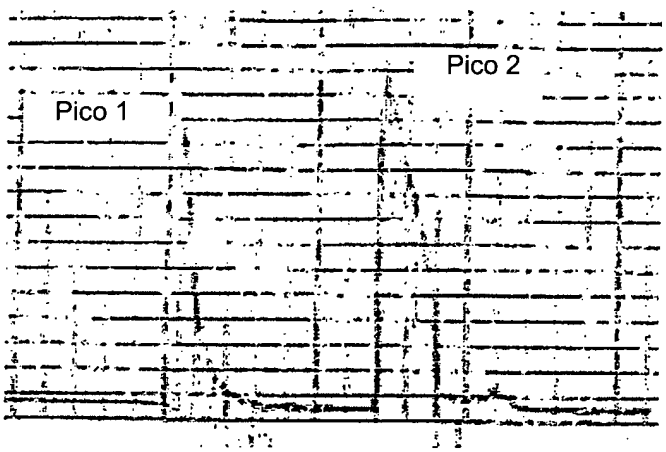


FIG. 2

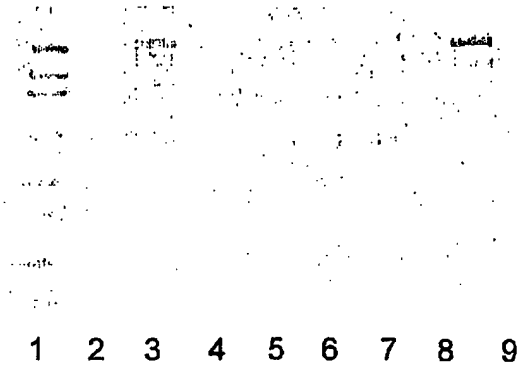


FIG. 3

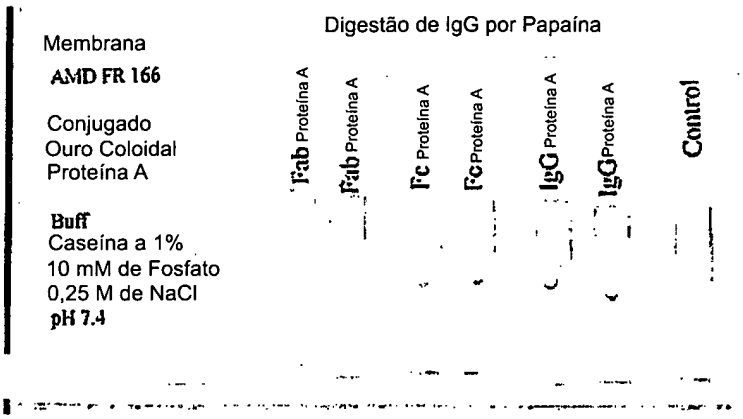

Digestão de IgG por Papaína
Membrana
AMD FR 166
Conjugado
Ouro Coloidal
Proteína A
Buff
Caseína a 1%
10 mM de Fosfato
0,25 M de NaCl
pH 7.4
Fab Proteína A
Fab Proteína A
Fc Proteína A
Fc Proteína A
IgG Proteína A
IgG Proteína A
Control

FIG. 4

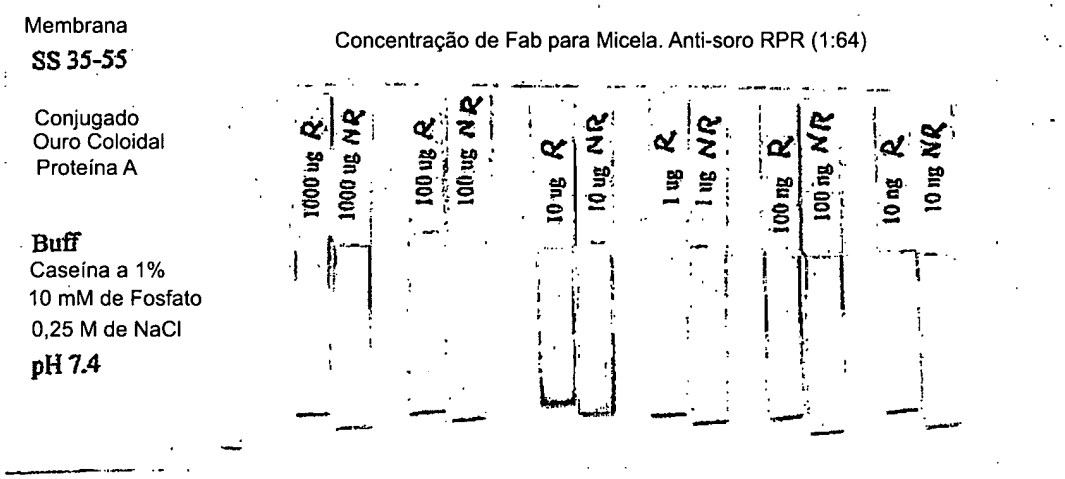

Membrana
SS 35-55
Conjugado
Ouro Coloidal
Proteína A
Buff
Caseína a 1%
10 mM de Fosfato
0,25 M de NaCl
pH 7.4
Concentração de Fab para Micela. Anti-soro RPR (1:64)
1000 ug R
1000 ug NR
100 ug R
100 ug NR
10 ug R
10 ug NR
1 ug R
1 ug NR
100 ng R
100 ng NR
10 ng R
10 ng NR

FIG. 5

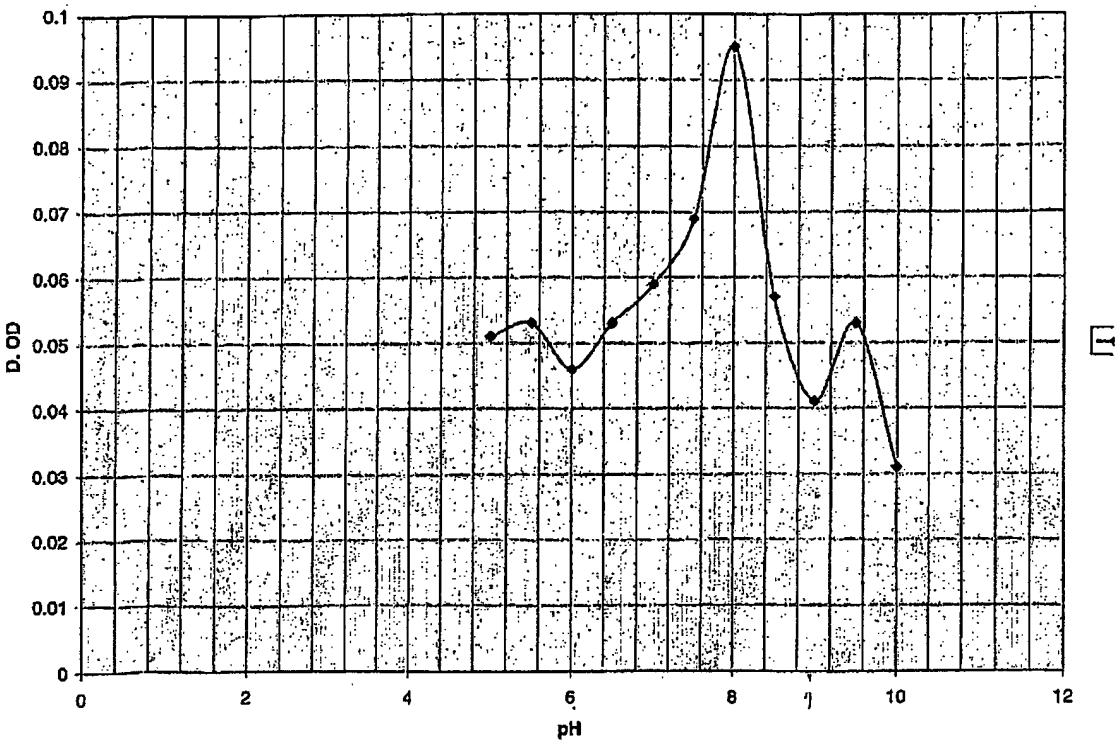


FIG. 6

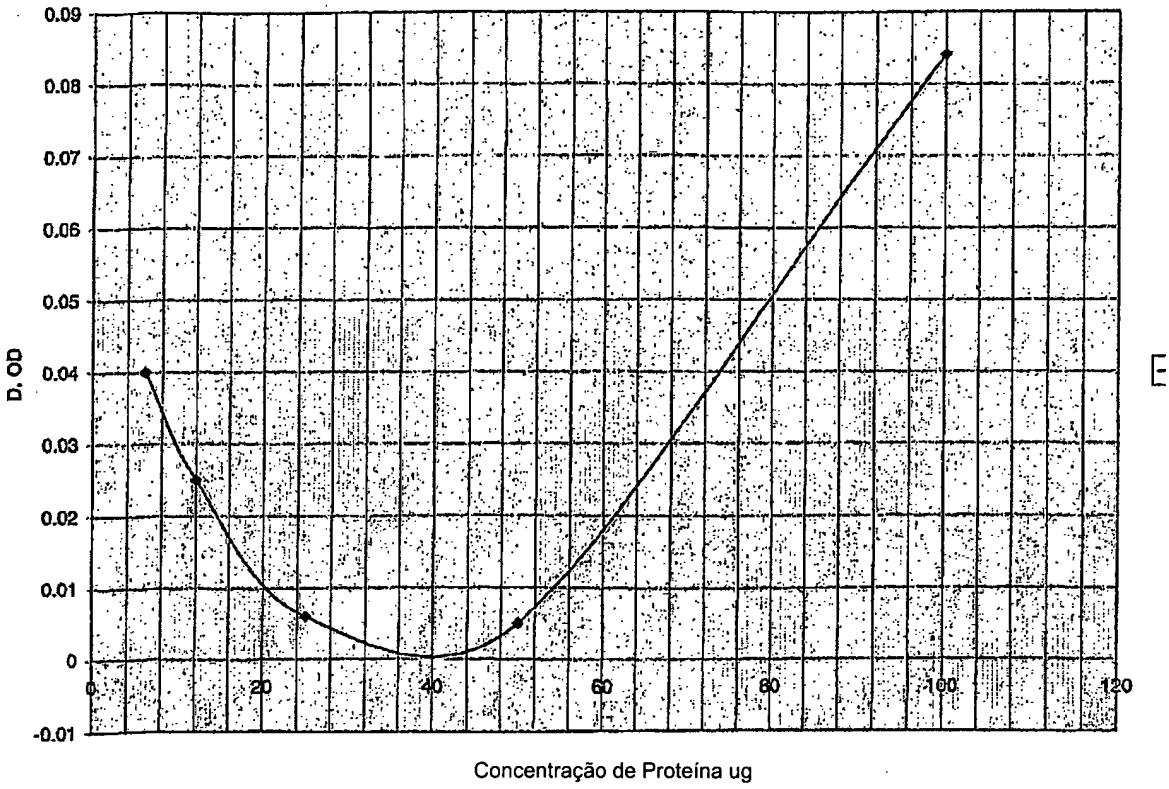

0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
-0.01
D. OD
0
20
40
60
80
100
120
Concentração de Proteína ug

FIG. 7

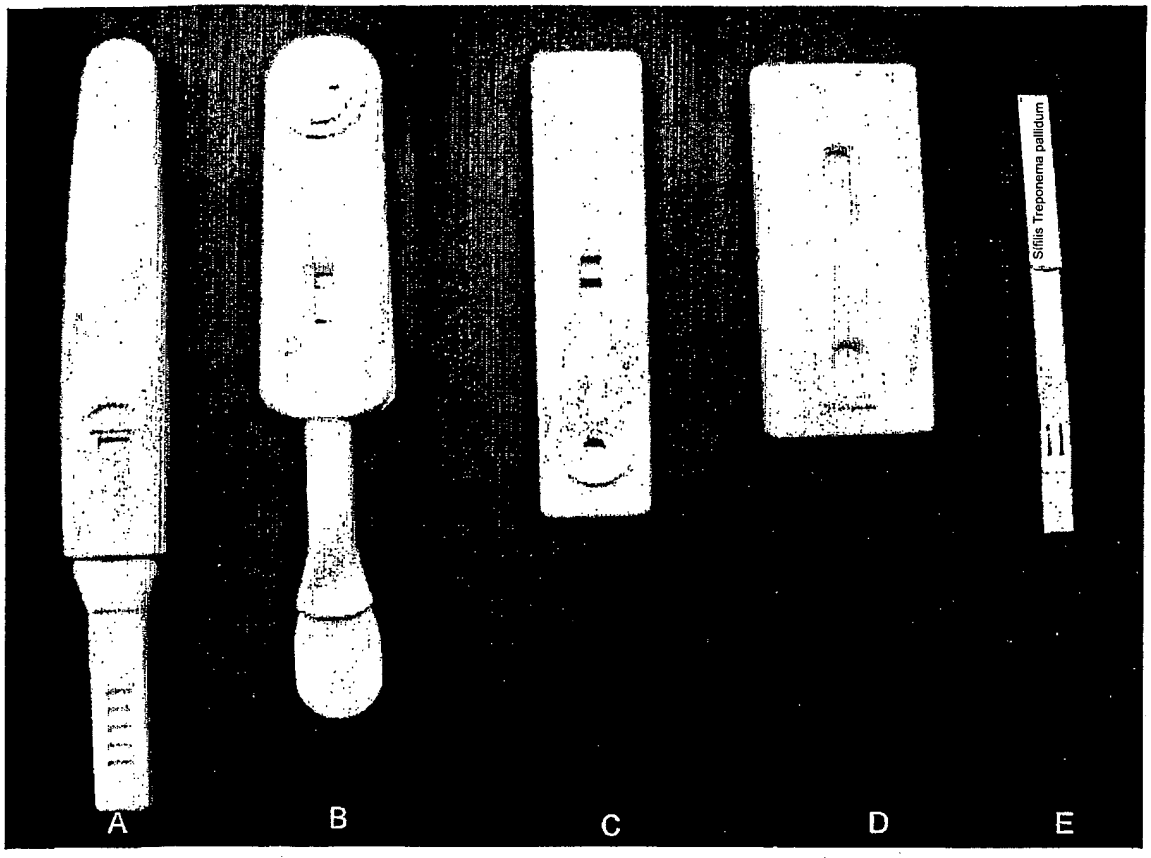


FIG. 8

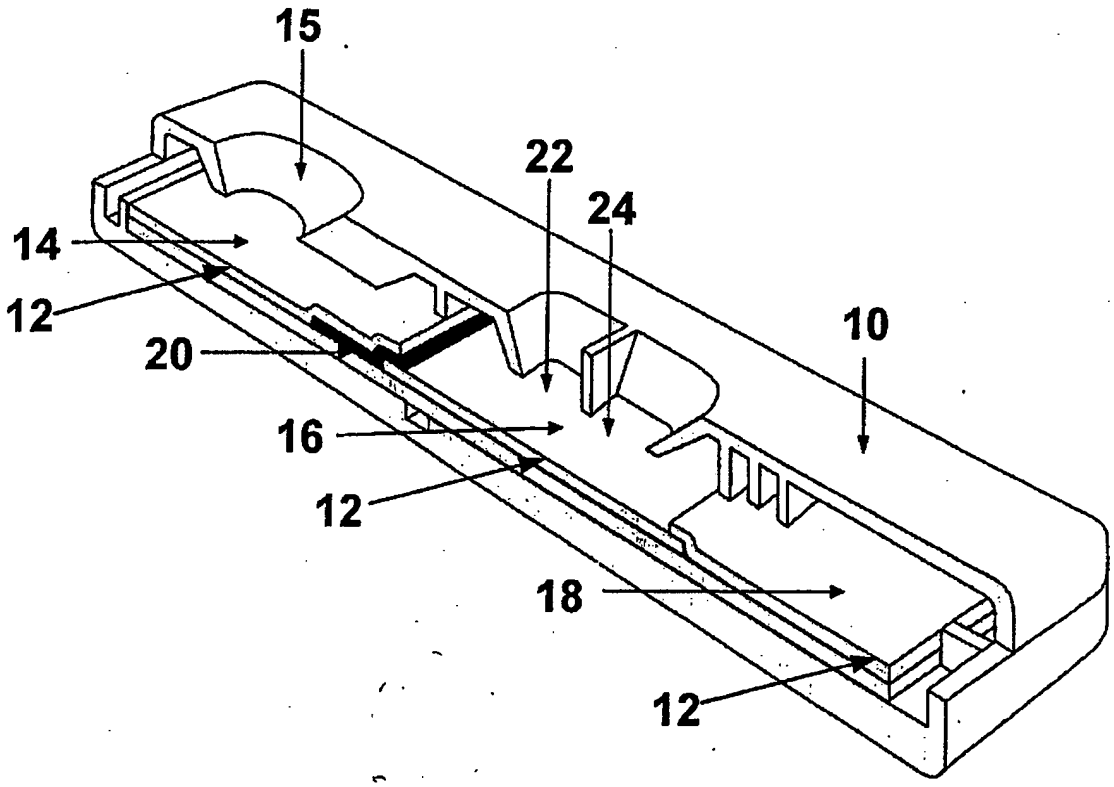


FIG. 9

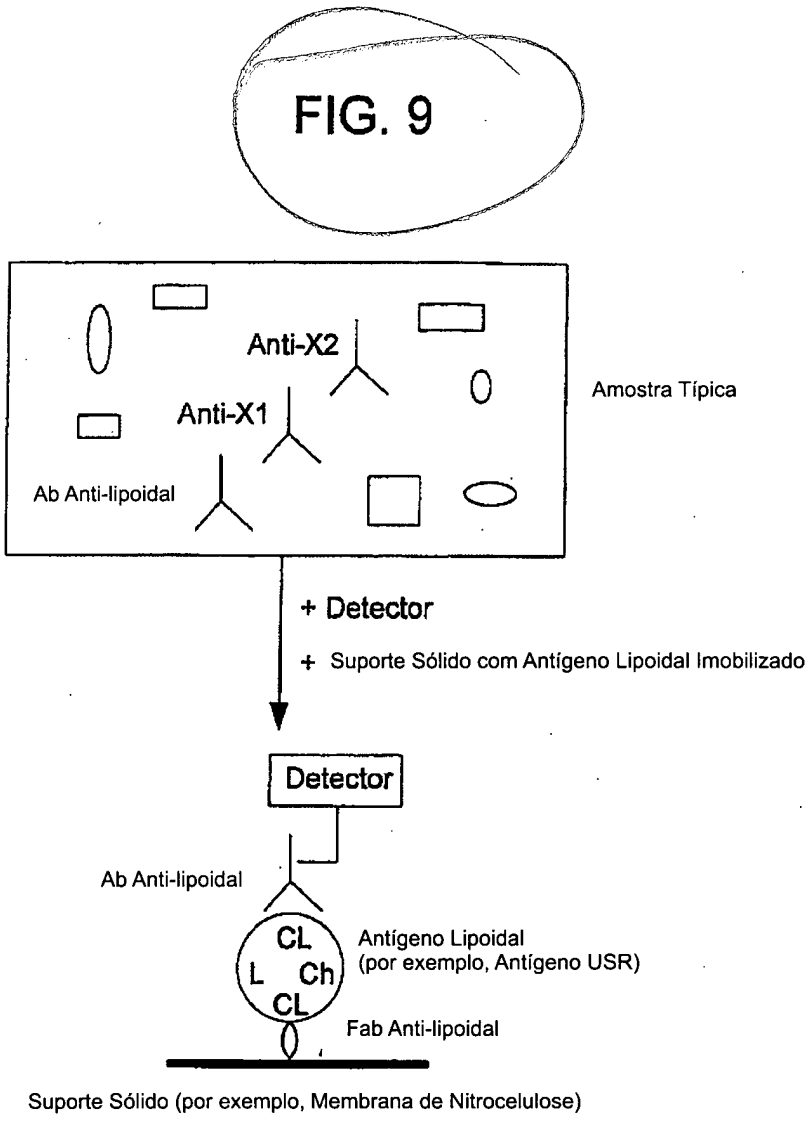
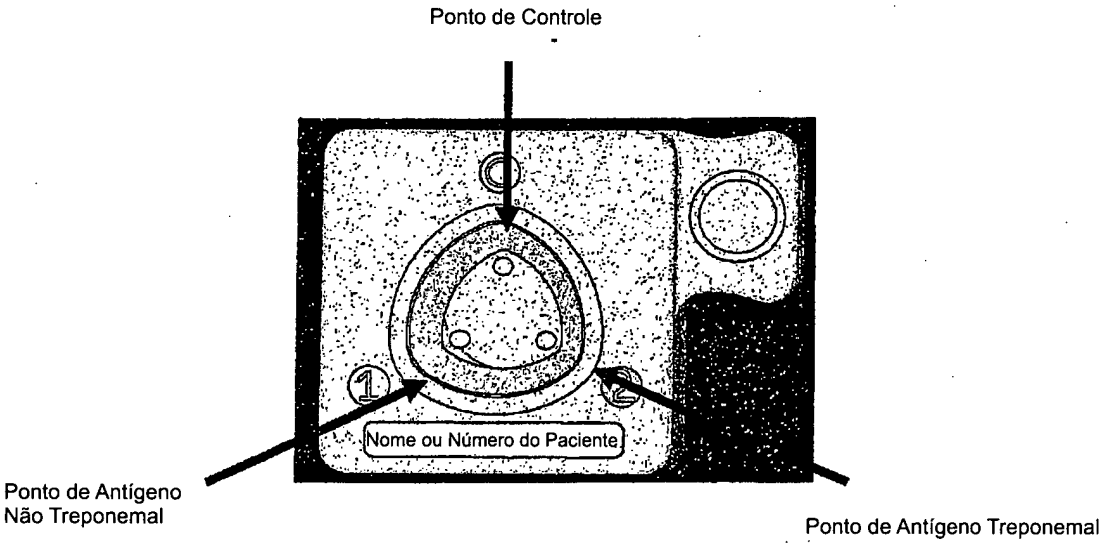

Anti-X2
Anti-X1
Ab Anti-lipoidal
Amostra Típica
+ Detector
+ Suporte Sólido com Antígeno Lipoidal Imobilizado
Detector
Ab Anti-lipoidal
CL
L Ch
CL
Antígeno Lipoidal
(por exemplo, Antígeno USR)
Fab Anti-lipoidal
Suporte Sólido (por exemplo, Membrana de Nitrocelulose)

FIG. 10


Ponto de Controle
1
2
Nome ou Número do Paciente
Ponto de Antígeno
Não Treponemal
Ponto de Antígeno Treponemal

PI 05...06-6

RESUMO

Patente de Invenção: **"DISPOSITIVO DE IMUNOENSAIO E MÉTODO PARA IMOBILIZAR CARDIOLIPINA IMUNORREATIVA".**

A presente invenção refere-se a composições, métodos e dispositivos para a detecção de anticorpos antilipoidais e o diagnóstico de doença, por exemplo, sífilis que são descritos. Em particular, é descrito um método para imobilizar um antígeno lipoidal, compreendendo cardiolipina, lecitina, e colesterol, sobre um suporte sólido (tal como uma membrana de nitrocelulose). A capacidade para imobilizar um antígeno lipoidal sobre uma membrana satisfaz a necessidade há muito tempo existente de teste à base de membrana para a detecção de anticorpos antilipoidais. Também são descritos dispositivos de imunoensaio para realizar simultaneamente testes treponemais e não treponemais para sífilis.