



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0923199-4 B1



(22) Data do Depósito: 25/11/2009

(45) Data de Concessão: 20/10/2020

(54) Título: MÉTODO PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE ANTICORPOS DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO

(51) Int.Cl.: G01N 33/535.

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2008 US 61/118,949.

(73) Titular(es): THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY.

(72) Inventor(es): DOLLY B. TYAN; GE CHEN.

(86) Pedido PCT: PCT US2009065984 de 25/11/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/065425 de 10/06/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 01/06/2011

(57) Resumo: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS COM FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO. A invenção fornece métodos para detecção sensível e específica de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica usando o fator de complemento C1q, incluindo fator de complemento autólogo C1q presente na amostra biológica e um anticorpo marcado de forma detectável que se liga ao fator de complemento autólogo C1q, fator de complexo exógeno humano C1q e um anticorpo marcado de forma detectável que se liga ao fator de complemento humano exógeno C1q, fator de complemento humano exógeno C1q marcado de forma detectável, ou uma combinação de fator de complemento autólogo C1q e fator de complemento humano exógeno C1q. A invenção também apresenta kits, sistemas e dispositivos para uso nos métodos da invenção.

MÉTODO PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE ANTICORPOS DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

- [0001]** O sistema complemento é um complexo grupo de proteínas do sangue que, em combinação com anticorpos e outros fatores, desempenha um importante papel como mediador de reações imunes, alérgicas, imunoquímicas e imunopatológicas. A ativação do sistema complemento pode resultar em uma ampla gama de reações, tais como a opsonização e lise de vários tipos de células, bactérias e protozoários, inativação de vírus e a mediação direta do processo inflamatório. Através da atividade tipo hormonal de vários dos seus componentes, o sistema complemento pode recrutar e mobilizar a participação de outros sistemas efetores humorais e celulares. Estes, por sua vez, podem induzir a migração direcionada de leucócitos, disparar a liberação de histamina de mastócitos e estimulam a liberação de constituintes lisossômicas de fagócitos.
- [0002]** O sistema complemento é constituído por pelo menos vinte proteínas plasmáticas distintas capazes de interagir umas com as outras, com os anticorpos, e com membranas celulares. Muitas destas proteínas, quando ativadas, combinam-se com outras proteínas para formarem enzimas para penetrar e ativar outras proteínas no sistema. A ativação sequencial dessas proteínas, conhecidas como a cascata do complemento, segue dois caminhos principais: a via clássica e a via alternativa. Ambas as vias convergem em C3 e usam um tronco terminal comum, que leva à lise celular, opsonização e lise bacteriana, ou inativação viral.
- [0003]** A via clássica pode ser ativada por complexos de antígeno-anticorpo, substâncias imunoglobulinas agregadas e não-imunológicas, tais como DNA e enzimas tipo tripsina. A via clássica de ativação envolve, sucessivamente, quatro componentes denominados C1, C4, C2 e C3. Esses componentes podem ser agrupados em duas unidades funcionais: unidade de reconhecimento ou C1 e unidade de ativação ou C4, C2 e C3. Cinco componentes adicionais denominados C5, C6, C7, C8 e C9 definem o complexo de ataque à membrana (MAC) que formam o tronco terminal comum a ambas as vias que levam à lise celular. A via alternativa utiliza o Fator B e ignora as etapas C1-C4-C2, ativando em C3.
- [0004]** A via clássica começa com o complexo C1, que consiste em uma molécula de C1q e duas moléculas de C1r e C1s. A ativação do complexo C1 é desencadeada quer pela ligação de C1q aos anticorpos das classes M e G, complexados com antígenos, ou pela

ligação de C1q à superfície de um patógeno. Ambos os C1r e C1s são serinas proteases. A ligação de C1q leva a mudanças conformacionais na molécula de C1q, que por sua vez, leva à ativação das duas moléculas C1r, seguidas pela ativação das moléculas C1s. A fim de evitar a ativação espontânea dessa cascata, C1r e C1s são inibidos pelo inibidor C1, um inibidor de serina protease. Uma vez ativado, o complexo-C1 se liga para se unir a C2 e C4, produzindo C2a e C4b. A C2a e C4b, em seguida, se liga para formar um complexo C4b2a, conhecido como C3-convertase. A produção de C3-convertase leva à clivagem de C3 em C3a e C3b, este último se une com C2a e C4b (a C3 convertase) para formar C5 convertase, que é o componente inicial do MAC.

[0005] O estudo e a medição da ativação de uma via de complemento podem fornecer uma indicação de muitos possíveis distúrbios biológicos. A via complementar tem sido implicada na patogênese ou na sintomatologia de um amplo espectro de doenças humanas e condições patológicas. Essas doenças incluem doenças complexas imunes de diversos tipos, doenças autoimunes, em especial o lúpus eritematoso sistêmico e doenças infecciosas, tais como aquelas que se encontram envolvidos nas infecções por bactérias gram-negativas, vírus, parasitas, fungos e diversas doenças dermatológicas, renais e hematológicas. Alguns distúrbios podem ser devido à insuficiência de complemento no paciente.

[0006] Há ainda uma necessidade no campo de métodos para detecção de anticorpos de fixação de complemento que fixam em uma amostra de paciente de uma forma que seja rápida, sensível e específica, nomeadamente no que diz respeito à capacidade de se diferenciar de forma precisa e definitiva entre os antígenos específicos.

[0007] A presente invenção atende a essas necessidades.

Literatura Relevante

[0008] As Patentes US 6.514.714 e 6.150.122; Wahrman et al., J. Immunol. Methods. 275(1-2):149-60 (2003); e Smith et al., Am. J. Transplant. 7(12):2809-15 (2007).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] A invenção fornece métodos para detecção sensível e específica de anticorpos de fixação de complemento em uma amostra biológica usando fator de complemento C1q, incluindo fator de complemento autólogo C1q presente na amostra biológica e um anticorpo marcado de forma detectável que se liga ao fator de complemento autólogo C1q, fator de complemento humano exógeno C1q e um anticorpo marcado de forma detectável que se

liga ao fator de complemento humano exógeno C1q, ao fator do complemento humano exógeno marcado de forma detectável C1q, ou uma combinação de fator de complemento autólogo C1q e fator de complemento humano exógeno C1q. A invenção também apresenta kits, sistemas e dispositivos para uso nos métodos da invenção.

[0010] Em um aspecto, a invenção fornece um método para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito que se ligam especificamente a um antígeno de interesse, pelo contato com um substrato sólido com um antígeno de interesse (AgI) imobilizado no mesmo com uma amostra biológica de um sujeito e fator de complemento C1q, em que o contato é por um tempo suficiente para permitir que os anticorpos com fixação ao complemento anti-AgI na amostra se liguem ao AgI e permitir que o fator de complemento C1q se ligue aos anticorpos anti- AgI com fixação de complemento; incubação do substrato sólido, com pelo menos um ligando marcado de forma detectável capaz de se ligar especificamente ao fator de complemento C1q ligado aos anticorpos anti-AgI com fixação de complemento ligados a AgI, e detecção da presença ou ausência do ligando marcado de forma detectável ligado ao fator de complemento C1q para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento que se ligam especificamente a AgI na amostra biológica.

[0011] Em algumas modalidades, o fator de complemento C1q é o fator de complemento autólogo C1q. Em outras modalidades, o fator de complemento C1q é o fator de complemento exógeno C1q. Em ainda outras modalidades, o fator de complemento C1q é uma combinação do fator de complemento autólogo C1q e fator de complemento exógeno C1q.

[0012] Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma placa de múltiplos poços. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana. Ainda em outras modalidades, o substrato sólido é uma micropartícula, como uma esfera de poliestireno, uma esfera de látex, ou uma esfera magnética. Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma célula. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana celular. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o ligando marcado de forma detectável é um anticorpo marcado de forma detectável ou fragmento de ligação do mesmo. Em algumas modalidades, a marcação detectável é um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma

molécula de biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.

[0013] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito que se ligam especificamente a um antígeno de interesse, pelo contato com um substrato sólido com um antígeno de interesse (AgI) imobilizado no mesmo com uma amostra biológica de um sujeito e fator complemento exógeno C1q diretamente marcado, em que o contato é por um tempo suficiente para permitir que anticorpos com fixação ao complemento anti-AgI que fixa na amostra se liguem a AgI e para permitir que o fator de complemento exógeno C1q marcado diretamente se ligue aos anticorpos com fixação ao complemento anti-AgI, e detectar a presença ou ausência do C1q exógeno marcado diretamente ligado aos anticorpos de fixação de complemento anti-AgI para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento na amostra biológica que se ligam especificamente ao AgI.

[0014] Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma placa de múltiplos poços. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana. Em ainda outras modalidades, o substrato sólido é uma de micropartícula, como uma esfera de poliestireno, uma esfera de látex, ou uma esfera magnética. Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma célula. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana celular. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o C1q exógeno marcado diretamente é marcado com um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma molécula de biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.

[0015] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito que se ligam especificamente aos antígenos leucocitários humanos (HLA), através da incubação de uma amostra biológica de um sujeito com uma coleção de micropartículas de diferentes subtipos e fator de complemento C1q, em que cada micropartícula é revestida com um subtipo HLA purificado diferente, é derivado de uma população de células que apresentam o mesmo HLA, e em que a incubação é por um tempo suficiente para permitir que os anticorpos de fixação de complemento anti-HLA na amostra biológica se liguem aos HLAs e permitir que o fator de complemento C1q se ligue aos anticorpos de fixação de complemento anti-HLA na amostra biológica;

incubar as micropartículas com pelo menos um ligando marcado de forma detectável capaz de se ligar especificamente com o fator de complemento C1q ligado aos anticorpos de fixação de complemento anti-HLA ligado ao HLA, e detectar a presença ou ausência do ligando marcado de forma detectável ligado ao fator de complemento C1q para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento.

[0016] Em algumas modalidades, o fator de complemento C1q é o fator de complemento autólogo C1q. Em outras modalidades, o fator de complemento C1q é o fator de complemento exógeno C1q. Em outras modalidades, o fator de complemento C1q é uma combinação do fator de complemento autólogo C1q e fator complemento exógeno C1q.

[0017] Em algumas modalidades, a micropartícula é uma esfera de agarose. Em outras modalidades, a micropartícula é uma esfera de látex. Ainda em outras modalidades, a micropartícula é uma esfera magnética. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o ligando marcado de forma detectável é um anticorpo marcado de forma detectável ou fragmento de ligação do mesmo. Em algumas modalidades, a marcação detectável é um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma molécula de biotina, um elétrons doador, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo. Em algumas modalidades, a detecção é por citometria de fluxo.

[0018] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito que se ligam especificamente aos antígenos leucocitários humanos (HLA), através da incubação de uma amostra biológica de um sujeito com uma coleção de micropartículas de diferentes subtipos e fator de complemento exógeno C1q diretamente marcado, em que cada micropartícula é revestida com um subtipo HLA diferente purificado, é derivada de uma população de células que apresentam os mesmos HLAs, e em que a incubação é por um tempo suficiente para permitir que os anticorpos de fixação de complemento anti-HLA na amostra biológica se liguem a HLA e permitir que o fator de complemento C1q se ligue aos anticorpos de fixação de complemento anti-HLA na amostra biológica, e detectar a presença ou ausência do fator de complemento exógeno C1q diretamente marcado ligado aos anticorpos de fixação de complemento anti-HLA para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento da amostra biológica que se ligam especificamente ao HLA.

- [0019] Em algumas modalidades, a micropartícula é uma esfera de agarose. Em outras modalidades, a micropartícula é uma esfera de látex. Em ainda outras modalidades, a micropartícula é uma esfera magnética. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o C1q exógeno marcado diretamente é marcado com um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma molécula de biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo. Em algumas modalidades, a detecção é por citometria de fluxo.
- [0020] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um kit para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito que se ligam especificamente a um antígeno de interesse, incluindo um substrato sólido com um antígeno de interesse (AgI) imobilizado no mesmo, um ligando marcado de forma detectável capaz de se ligar especificamente ao fator de complemento C1q; e instruções para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito contra o antígeno de interesse.
- [0021] Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma placa de múltiplos poços. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana. Em ainda outras modalidades, o substrato sólido é uma micropartícula, como uma esfera de agarose, uma esfera de poliestireno, uma esfera do látex, ou uma esfera magnética. Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma célula. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana celular. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o ligando marcado de forma detectável é um anticorpo marcado de forma detectável ou fragmento de ligação do mesmo. Em algumas modalidades, a marcação detectável é um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma molécula de biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.
- [0022] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um kit para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito que se ligam especificamente a um antígeno de interesse, incluindo um substrato sólido com um antígeno de interesse (AgI) imobilizado no mesmo, um C1q exógeno marcado diretamente capaz de se ligar aos anticorpos de fixação de complemento, e instruções para determinar a presença ou ausência de anticorpos com

fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito contra o antígeno de interesse.

- [0023]** Em algumas modalidades, o substrato sólido é uma placa de múltiplos poços. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana ou uma célula. Em ainda outras modalidades, o substrato sólido é uma micropartícula, como uma esfera de agarose, uma esfera de poliestireno, uma esfera do látex, ou uma esfera magnética. Em outras modalidades, o substrato sólido é uma membrana celular. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o C1q exógeno marcado diretamente é marcado com um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma molécula de biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.
- [0024]** Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um kit para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito contra antígenos leucocitários humanos (HLAs), incluindo uma coleção de subtipos de micropartículas em que cada subtipo de micropartículas é revestido com diferentes HLA purificados para representar a população do antígeno HLA de uma única linhagem celular ou de múltiplas linhagens celulares, de tal forma que a coleção simula a distribuição de HLAs em uma população humana normal, um ligando marcado de forma detectável capaz de se ligar especificamente com um fator de complemento C1q; e instruções para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento em uma amostra de um sujeito contra HLAs.
- [0025]** Em algumas modalidades, a micropartícula é uma esfera de agarose, uma esfera de látex, uma esfera magnética ou uma esfera de poliuretano. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o ligando marcado de forma detectável é um anticorpo marcado de forma detectável ou fragmento de ligação do mesmo. Em algumas modalidades, a marcação detectável é um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.
- [0026]** Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece um kit para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação de complemento em uma amostra biológica de um sujeito contra antígenos leucocitários humanos (HLAs), incluindo uma coleção de subtipos de micropartículas em que cada subtipo de micropartículas é revestido com diferentes HLAs purificados para representar a população do antígeno HLA de uma

única linhagem celular ou de múltiplas linhagens celulares, de tal forma que a coleção simula a distribuição de HLAs em uma população humana normal; um C1q exógeno marcado diretamente capaz de se ligar aos anticorpos de fixação de complemento; e instruções para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento em uma amostra de um sujeito contra HLAs.

[0027] Em algumas modalidades, a micropartícula é uma esfera de agarose, uma esfera de látex, uma esfera magnética ou uma esfera de poliuretano. Em algumas modalidades, a amostra biológica é o soro, sangue, saliva, plasma ou urina. Em algumas modalidades, o C1q exógeno marcado diretamente é marcado com um fluorcromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.

[0028] Estes e outros objetos, vantagens e características da invenção se tornarão aparentes para as pessoas versadas na técnica mediante a leitura de detalhes da invenção conforme mais completamente descritos abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0029] A invenção é mais bem compreendida a partir da seguinte descrição detalhada quando lida em conjunto com os desenhos que acompanham. Ressalta-se que, de acordo com a prática comum, as várias características dos desenhos não estão em escala. Pelo contrário, as dimensões das várias características são arbitrariamente ampliadas ou reduzidas para maior clareza. Incluídas nos desenhos estão às figuras a seguir.

[0030] A **FIG. 1** fornece um esquema geral de uma modalidade da presente divulgação. Um substrato sólido tendo um antígeno ou antígenos individualmente distinguíveis de interesse (AgI) imobilizados no mesmo é contatado com uma amostra biológica suspeita de conter anticorpos de fixação de complemento anti-AgI (CFAb). Como mostrado nas figuras, às amostras também irão provavelmente incluir os anticorpos com fixação de não complemento (não-CFAb), bem como C1q autólogo e/ou exógeno que se liga especificamente aos anticorpos de fixação de complemento na mesma amostra. Após a incubação, se houver, os anticorpos de fixação de complemento anti-AgI se ligam especificamente ao AgI imobilizado e o C1q se liga especificamente aos anticorpos de fixação de complemento AgI. O substrato sólido é contatado com anticorpos C1q anti-humanos marcados detectáveis (anti-hC1q) que se ligam especificamente a C1q humana.

A presença da marcação detectável é então testada usando métodos conhecidos na técnica.

[0031] A **FIG 2** apresenta um esquema geral de uma outra modalidade da presente divulgação. Nesta modalidade, os anticorpos anti-C1q (anti-hC1q) marcados detectáveis são adicionados diretamente à amostra biológica antes do substrato sólido ser contatado com a amostra. Alternativamente, os anticorpos anti-hC1q e a amostra biológica podem ser introduzidos no substrato sólido, ao mesmo tempo.

[0032] A **FIG 3** apresenta um esquema geral de uma outra modalidade da presente divulgação. Nesta modalidade, C1q exógeno marcado de forma detectável é adicionado diretamente à amostra biológica antes do substrato sólido ser contatado com a amostra. Alternativamente, o C1q exógeno marcado de forma detectável e a amostra biológica podem ser introduzidos no substrato sólido, ao mesmo tempo, ou o C1q exógeno marcado de forma detectável pode ser introduzido no substrato sólido depois da amostra biológica ter sido introduzida no substrato. Nesta modalidade, como em outras modalidades, a presença de C1q exógeno marcado de forma detectável é analisada usando métodos conhecidos na técnica.

[0033] A **FIG 4** apresenta um esquema geral de uma outra modalidade da presente divulgação. Esta modalidade é semelhante à modalidade descrita na FIG 1, e funciona de forma semelhante. Nesta modalidade, no entanto, o substrato sólido tendo um antígeno ou antígenos individualmente distinguíveis de interesse (AgI) imobilizados nos mesmos é uma esfera, microesfera, microgrânulo, micropartícula, célula ou membrana.

[0034] A **FIG. 5** fornece um esquema de uma outra modalidade da presente divulgação. Esta modalidade é semelhante à modalidade descrita na FIG 2, e funciona de forma semelhante. Nesta modalidade, no entanto, o substrato sólido tendo um antígeno ou antígenos individualmente distinguíveis de interesse (AGI) imobilizados nos mesmos é uma esfera, microesfera, microgrânulo, micropartícula, célula ou membrana.

[0035] A **FIG 6** apresenta um esquema de uma outra modalidade da presente divulgação. Esta modalidade é semelhante à modalidade descrita na Fig. 3, e funciona de maneira semelhante. Nesta modalidade, no entanto, o substrato sólido tendo um antígeno ou antígenos individualmente distinguíveis de interesse (AgI) imobilizados nos mesmos é uma esfera, microesfera, microgrânulo, micropartícula, célula ou membrana.

[0036] A **FIG 7** mostra uma comparação da capacidade do procedimento C1q em uma etapa versus duas etapas para definir anticorpos esperados.

- [0037] A **FIG 8** mostra os resultados de pico da gama-globulina intravenosa (IVIG) utilizando o teste LMX-IgG normal que não funciona. A figura representa o teste do soro de controle negativo diluído em tampão versus diluído em IVIG como seria feito para a IVIG em ensaio de inibição *in vitro* e usa uma segunda etapa marcada com anti-IgG (o ensaio comercial atual).
- [0038] A **FIG. 9** é a mesma que a **FIG 8**, exceto que o soro do paciente é fortificado. Os resultados mostram que seria impossível detectar a inibição do anticorpo do paciente (visível na amostra diluída em tampão) se IVIG fosse adicionada ao soro e detectada com uma anti-IgG.
- [0039] A **FIG 10** mostra uma comparação entre os ensaios de citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e ensaio de C1q para a determinação da inibição de IVIG. O ensaio do CDC é o ensaio disponível anteriormente apenas para esta determinação.
- [0040] A **FIG 11** mostra IVIG o ensaio de inibição de C1q real *in vitro* em soro de pacientes adultos cardíacos, sugerindo que somente o A24 seria capaz de ser inibida pelo IVIG se o paciente fosse tratado.
- [0041] As **FIGS 12A-12B** mostram uma comparação dos ensaios de LMX-C1q (FIG 12A) e LMX-IgG (FIG 12B) na mudança de monitoramento no anticorpo A24 do soro dos pacientes cardíacos adultos com cada tratamento subsequente. (O mesmo paciente como na FIG 11).
- [0042] As **FIGS 13A-13B** mostram o acompanhamento de todos os anticorpos do paciente com tratamentos subsequentes de ensaios de IVIG, da LMX-C1q (FIG 12A) e LMX-IgG (FIG 12B). Observe a dificuldade em ver a supressão / desaparecimento de anticorpos através da análise de LMX-IgG.
- [0043] A **FIG 14** mostra os resultados de um ensaio de inibição de C1q em IVIG *in vitro*, semelhante à FIG 11, mas os resultados são para um paciente renal pediátrico sugerindo que os anticorpos B57, B58 seriam efetivamente suprimidos por IVIG.
- [0044] A **FIG 15** mostra uma comparação lado a lado dos resultados *in vitro* e *in vivo* dos resultados. Painel da esquerda (o mesmo que a FIG. 14) mostra a inibição de IVIG *in vitro* e o painel da direita mostra o antes e o depois da infusão de IVIG no paciente ao soro de mesma data.
- [0045] A **FIG 16A-N** é uma tabela que mostra os resultados do experimento de validação C1q.
- [0046] A **FIG 17A-J** é uma tabela que mostra os resultados do experimento de validação C1Q - IVIG.

[0047] A FIG. 18 fornece um esquema geral de um ensaio de C1q diretamente marcado.

[0048] As FIG 19A-B fornecem uma comparação entre a marcação direta e indireta de C1q utilizando um ensaio de LMX-C1q.

[0049] As FIG 20A-B fornecem uma comparação entre a marcação indireta de C1q em um ensaio de inibição de LMX-C1q IVIG (Fig. 20A) *in vitro* e a marcação direta de C1q em um ensaio de inibição de LMX-C1q IVIG (FIG. 20B) *in vitro*.

DEFINIÇÕES

[0050] O termo "anticorpo com fixação de complemento" se refere a um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno de patógeno e inicia a cascata do complemento do sistema imunológico, que fornece a depuração do alvo portador do antígeno (por exemplo, celular) ou patógeno do organismo. Em geral, um anticorpo com fixação de complemento é um anticorpo IgM ou um IgG que seja reconhecido e especificamente ligado pelo fator de complemento C1q.

[0051] O fator de complemento C1q é a subunidade do complexo enzimático de C1 que ativa o sistema complemento sérico. O mesmo é composto de 9 dímeros ligados a dissulfeto de cadeias A, B e C, que compartilham uma estrutura comum que consiste em uma região N-terminal não-helicoidal, uma região de tripla hélice (colágeno), e uma cabeça globular C-terminal (Smith et al. Biochem. J. 1994. 301:249-256). O C1q está envolvido na defesa do hospedeiro, inflamação, apoptose, autoimunidade, diferenciação celular, organogênese, hibernação e obesidade resistente à insulina. Cinco resíduos estritamente conservados foram identificados na família de C1q (Kishore et al. Trends in Immunology 2004. 25(10):551-561). Cada C1q apresenta um dobramento tipo sanduíche com dez filamentos, com uma topologia tipo rocambole, consistindo de duas formas β -folhas com cinco filamentos (A', A, H, C, F) e (B', B, G, D, E), cada um composto de filamentos antiparalelos. Em geral, o fator de complemento C1q está presente no soro de animais e tem tanto a especificidade de ligação quanto a afinidade de ligação para os anticorpos de fixação de complemento, que também estão presentes no soro do animal. A ligação do fator de complemento C1q aos anticorpos de fixação de complemento ativa a cascata do sistema complemento imunológico.

[0052] Por "autólogo" quer-se dizer o derivado da mesma amostra do paciente como outro elemento. Por exemplo, em referência ao C1q autólogo quer-se dizer que o C1q ocorre na mesma amostra em questão que os anticorpos de fixação de complemento.

- [0053] Por "exógeno" quer-se dizer um elemento que não é, naturalmente, derivada de um organismo particular. Por exemplo, em referência ao C1q exógeno quer-se dizer que o C1q é derivado de um diferente sistema ou organismo da amostra em questão com os anticorpos de fixação de complemento.
- [0054] Um "reagente de afinidade" da invenção em questão tem um domínio de ligação do analito, porção, ou componente que tem uma alta afinidade de ligação para um analito alvo. Por alta afinidade de ligação quer-se dizer uma afinidade de ligação de pelo menos cerca de 10^{-4} M, geralmente, pelo menos cerca de 10^{-6} M ou superior, por exemplo, 10^{-9} M ou superior. O reagente de afinidade pode ser qualquer um de uma variedade de diferentes tipos de moléculas, contanto que apresentem o requisito de afinidade de ligação para a proteína-alvo, quando presentes como ligante de afinidade marcado.
- [0055] Como tal, o reagente de afinidade pode ser um ligante de molécula pequena ou molécula grande. Por ligante de molécula pequena quer-se dizer um ligante que varia no tamanho de cerca de 50 a cerca de 10.000 daltons, geralmente de cerca de 50 a cerca de 5.000 daltons e mais geralmente a partir de cerca de 100 a cerca de 1000 daltons. Por molécula grande quer-se dizer o ligante com um tamanho de cerca de 10.000 daltons ou mais em peso molecular.
- [0056] De interesse particular como ligantes de afinidade de moléculas grandes são os anticorpos, bem como fragmentos de ligação e miméticos dos mesmos. Quando os anticorpos são o ligante de afinidade, eles podem ser derivados a partir de composições policlonais, de modo que uma população heterogênea de anticorpos que diferem pela especificidade são, cada uma, marcadas com a mesma marcação (tag) de ácido nucléico, ou composições monoclonais, em que uma população homogênea de anticorpos idênticos que têm a mesma especificidade para a proteína-alvo são, cada um, marcados com a mesma marcação (tag) (por exemplo, fluoróforo). Como tal, o ligante de afinidade pode ser um anticorpo monoclonal, oligoclonal e/ou policlonal. Em ainda outras modalidades, o ligante de afinidade é um fragmento ou mimético de ligação do anticorpo, onde esses fragmentos e miméticos têm o requisito de afinidade de ligação para a proteína alvo. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos, como Fv (Fab')₂ e Fab podem ser preparados pela clivagem da proteína intacta, por exemplo, clivagem pela protease ou química. Também de interesse são os fragmentos de anticorpos produzido de forma recombinante, como os anticorpos de cadeia única ou scFvs, onde tais fragmentos de anticorpos produzidos de forma recombinante mantém as características de ligação

dos anticorpos acima. Esses fragmentos de anticorpos produzidos de forma recombinante geralmente incluem pelo menos os domínios de VH e VL dos anticorpos em questão, de forma a manter as características de ligação dos anticorpos em questão. Esses fragmentos de anticorpos ou miméticos produzidos de forma recombinante da invenção em questão podem ser facilmente preparados usando qualquer metodologia conveniente, tais como a metodologia divulgada nas Patentes US 5.851.829 e US 5.965.371, as divulgações das quais sendo aqui incorporada por referência.

[0057] Os anticorpos, fragmentos e miméticos dos mesmos descritos acima podem ser obtidos a partir de fontes comerciais e/ou preparados usando qualquer tecnologia conveniente, onde os métodos de produção de anticorpos policlonais, anticorpos oligoclonais, anticorpos monoclonais, fragmentos e miméticos dos mesmos, incluindo os derivados recombinantes dos mesmos, são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0058] Por "epítopo" quer-se dizer um sítio um antígeno ao qual as células B e células T específicas respondem. O termo também é usado intercambiavelmente com "determinante antigênico" ou "sítio antigênico determinante." Um epítopo pode incluir um ou mais aminoácidos, tal como três ou mais aminoácidos, em uma conformação espacial única para o epítopo. Geralmente, um epítopo inclui pelo menos 5 desses aminoácidos e, mais geralmente, consiste em pelo menos 8 a 10 desses aminoácidos. Os métodos de determinação da conformação espacial de aminoácidos são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional. Além disso, a identificação dos epítopos em uma determinada proteína é facilmente realizada usando técnicas bem conhecidas na arte. Veja, por exemplo, Geysen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA (1984) 81:3998-4002 (método geral para sintetizar peptídeos rapidamente para determinar a localização de epítopos imunogênicos em um dado antígeno); Patente US 4.708.871 (procedimentos para identificar e sintetizar quimicamente epítopos de antígenos) e Geysen et al, Molecular Immunology (1986) 23:709-715 (técnica para identificar peptídeos com alta afinidade por um determinado anticorpo). Os anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo podem ser identificados em um imunoensaio simples, mostrando a capacidade de um anticorpo para bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno alvo.

[0059] Por "liga-se especificamente" ou "especificamente se liga" quer-se dizer a avidez elevada e/ou alta afinidade de ligação de um anticorpo contra um antígeno específico. O anticorpo que se liga seu epítopo em um antígeno específico é com maior avidez e/ou

afinidade do que a ligação do mesmo anticorpo a diferentes epítomos, particularmente diferentes epítomos que podem estar presentes nas moléculas em associação com, ou em uma mesma amostra, como um antígeno específico de interesse. Os anticorpos de fixação de complemento podem, no entanto, ter a mesma ou semelhantes avidez e/ou afinidade para vários epítomos em diferentes antígenos de interesse. Como tal, "liga-se especificamente" ou "especificamente se liga" não se destina a excluir um dado anticorpo com fixação de complemento de ligação a mais de um antígeno de interesse. Os anticorpos que se ligam especificamente a um polipeptídeo de interesse podem ser capazes de se ligar a um outro polipeptídeo, em um nível fraco, mas ainda detectável (por exemplo, 10% ou menos da ligação mostrada ao polipeptídeo de interesse). Tal ligação fraca ou ligação de fundo, é facilmente perceptível a partir da ligação do anticorpo específico para o polipeptídeo de interesse, por exemplo, pelo uso de controles adequados.

[0060] Por "ligando marcado de forma detectável", ou "ligando secundário marcado de forma detectável" quer-se dizer um ligante tendo uma marcação detectável fixa, onde o ligante é capaz de se ligar especificamente a um outro composto. Exemplos de ligandos incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo que mantém a especificidade de ligação. A marcação detectável pode ser fixa por conjugação química, mas onde a marcação é um polipeptídeo, a mesma poderia ser, alternativamente, fixa por meio de técnicas de engenharia genética. Métodos para produção de proteínas marcadas de forma detectável são bem conhecidas na técnica. As marcações detectáveis podem ser selecionadas a partir de uma variedade de marcações conhecidas na técnica, mas normalmente são radioisótopos, cromóforos, fluoróforos, fluorcromos, enzimas (por exemplo, peroxidase), moléculas de ligante ou outras porções ou compostos que emitem um sinal detectável (por exemplo, a radioatividade, a fluorescência, cor) ou emitem um sinal detectável após a exposição da marcação a seu substrato. Os vários pares de marcação detectável / substrato (por exemplo, peroxidase / diaminobenzidina, avidina / estreptavidina, luciferase / luciferina), métodos para marcação de anticorpos, e métodos para uso de anticorpos secundários marcados para detectar um antígeno são bem conhecidos na técnica. [Nota: Ver, por exemplo, Harlow e Lane, eds. (Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)].

- [0061]** Por "C1q diretamente marcados" quer-se dizer uma molécula de C1q exógeno tendo uma marcação fixa detectável. A marcação pode ser fixa por conjugação química, mas onde a marcação é um polipeptídeo, a mesma poderia ser, alternativamente, fixa por meio de técnicas de engenharia genética. Os métodos para produção de proteínas marcadas de forma detectável são bem conhecidos na técnica. As etiquetas detectáveis podem ser selecionadas a partir de uma variedade de tais marcações conhecidas na técnica, mas normalmente são radioisótopos, cromóforos, fluoróforos, enzimas (por exemplo, peroxidase de rabanete), as moléculas de ligante, ou outras porções ou compostos que emitem um sinal detectável (por exemplo, a radioatividade, fluorescência, cor) ou emitem um sinal detectável após a exposição da marcação a seu substrato. Vários pares de marcação detectável / substrato (por exemplo, peroxidase de rabanete / diaminobenzidina, avidina / estreptavidina, luciferase / luciferina), métodos para marcação de anticorpos, marcação e métodos para uso de anticorpos secundários marcados para detectar um antígeno são bem conhecidos na técnica. [Nota: Ver, por exemplo, Harlow e Lane, eds. (Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)].
- [0062]** Como usado aqui o termo "isolado", quando usado no contexto de um composto isolado, refere-se a um composto de interesse que está em um ambiente diferente daquele em que o composto ocorre naturalmente. "Isolado" é destinado a incluir os compostos que estão dentro de amostras que são substancialmente enriquecidas para o composto de interesse e/ou em que o composto de interesse é parcialmente ou substancialmente purificado. O termo "isolado" engloba situações em que o composto não é acompanhado por pelo menos alguns dos materiais com os quais o mesmo é normalmente associado em seu estado natural. Por exemplo, o termo "isolado" em relação a um polipeptídeo geralmente se refere a uma molécula de aminoácido desprovida, no todo ou em parte, de sequências normalmente associadas à mesma na natureza, ou uma sequência, como existe na natureza, mas tendo sequências heterólogas em associação com estas.
- [0063]** "Purificada", como usado aqui significa que o material recitado compreende pelo menos cerca de 75% em peso da proteína total, com pelo menos cerca de 80% sendo preferido, e pelo menos cerca de 90% sendo particularmente preferido. Como usado aqui, o termo "substancialmente puro" refere-se a um composto que é retirado do seu ambiente natural e é pelo menos 60% livre, de preferência 75% livre, e mais preferencialmente, 90% livre de componentes com os quais está naturalmente associado.

- [0064] Quando usados neste documento, uma "amostra biológica" se refere a uma amostra de tecido ou fluido isolado de um sujeito que, no contexto da invenção geralmente se refere a amostras suspeitas de conter anticorpos com fixação ao complemento anti-AgI, cujas amostras, após processamento opcional, podem ser analisadas em um ensaio *in vitro*. As amostras típicas de interesse incluem, mas não estão necessariamente limitadas a, sangue, plasma, soro, células do sangue, urina, saliva e mucosa. Exemplos também incluem amostras *in vitro* de constituintes de cultura de células, incluindo mas não limitado a meios condicionados resultantes do crescimento de células e tecidos em meio de cultura, por exemplo, células recombinantes, e componentes celulares.
- [0065] Como usados neste documento, os termos "sistema de antígeno leucocitário humano" ou "HLA" refere-se ao complexo principal de histocompatibilidade, que abrange cerca de 3,5 milhões de pares de bases no braço curto do cromossomo 6. É dividido em três regiões distintas que contêm os genes de classe I, classe II e classe III. Nos humanos, o complexo HLA de classe I é de cerca de 2.000 kb e contém cerca de 20 genes. Dentro da região de classe I existem genes que codificam as moléculas MHC de classe I bem caracterizadas designadas HLA-A, HLA-B e HLA-C. Além disso, existem genes de classe I não clássicos que incluem HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, J-HLA e HLA-X, bem como uma nova família conhecida como MIC. A região de classe II contém três genes conhecidos como loci HLA-DP, HLA-DQ e loci HLA-DR. Estes genes codificam as cadeias α e β das moléculas MHC de classe II clássicas designadas HLA-DR, DP e DQ. Em humanos, os genes não clássicos designados DM, DN e DO também foram identificados na classe II. A região de classe III contém uma coleção heterogênea de mais de 36 genes.
- [0066] Um "subtipo de HLA purificado", como usado neste documento refere-se a um antígeno substancialmente purificado de um subtipo de HLA, como descrito na tabela abaixo. Quando usado em referência a uma microesfera revestida com "um subtipo de HLA diferente" não se quer dizer que cada população de uma microesfera é revestida com um diferente subtipo de antígeno HLA.
- [0067] Uma "população de antígeno HLA" como aqui usado refere-se a uma população específica de antígenos HLA encontrada em qualquer uma das coleções, que podem ser naturais ou não naturais, tais como em uma célula específica ou tipo de tecido.

- [0068] Como usado aqui "a distribuição de HLAs em uma população humana normal" refere-se a uma população específica de antígenos de HLA encontrados em uma população humana normal, como em uma célula específica ou tipo de tecido ou em um indivíduo.
- [0069] O termo "avaliação" inclui qualquer forma de medição, e inclui determinar se um elemento está presente ou não. Os termos "determinação", "medição", "estimação", "avaliação" e "ensaio" são usados intercambiavelmente e incluem determinações quantitativas e qualitativas. A avaliação pode ser relativa ou absoluta. "Avaliar a presença de" inclui a determinação da quantidade de algo presente, e/ou determinação de se está presente ou ausente. Como usado aqui, os termos "determinação", "medição" e "avaliação" e "ensaio" são usados intercambiavelmente e incluem tanto as determinações quantitativas quanto as qualitativas.
- [0070] O termo "substrato sólido" refere-se a um suporte sólido no qual antígenos e/ou anticorpos podem ser imobilizados nos mesmos. Substratos sólidos exemplares incluem placas multipoços, membranas, incluindo membranas de nitrocelulose e membranas de polietileno, membranas celulares e células, esferas, micropartículas, microesferas e microgrânulos. Os métodos da invenção podem ser realizados com micropartículas, microesferas, microgrânulos, ou esferas de qualquer material, por exemplo, sílica, ouro, látex, polímeros, tais como poliestireno, polissulfona, polietil ou hidrogel. Além disso, as micropartículas, microesferas, esferas ou microgrânulos podem ser um campo magnético.
- [0071] Note-se ainda que as reivindicações podem ser escritas para excluir qualquer elemento opcional. Como tal, esta afirmação se destina a servir como base antecedente para uso de tal terminologia exclusiva como "exclusivamente", "apenas" e similares, em conexão com a recitação dos elementos das reivindicações, ou a uso de uma limitação "negativa".

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

- [0072] A invenção fornece métodos para detecção sensível e específica de anticorpos de fixação de complemento em uma amostra biológica usando fator de complemento C1q, incluindo fator de complemento autólogo C1q presente na amostra biológica e um anticorpo marcado de forma detectável que se liga ao fator de complemento autólogo C1q, fator de complemento humano exógeno C1q e um anticorpo marcado de forma detectável que se liga ao fator de complemento humano exógeno C1q, fator de complemento humano exógeno C1q marcado de forma detectável, ou uma combinação de fator de

complemento autólogo C1q e fator de complemento humano exógeno C1q. A invenção também apresenta kits, sistemas e dispositivos para uso nos métodos da invenção.

- [0073]** Antes de a presente invenção ser descrita, deve ser entendido que essa invenção não se limita às modalidades particulares descritas, como tal pode, evidentemente, variar. Também é preciso entender que a terminologia usada aqui é para o propósito de descrever modalidades particulares apenas, e não se destina a ser limitante, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado somente pelas reivindicações apenas.
- [0074]** Quando um intervalo de valores é fornecido, entende-se que cada valor de intervenção, ao décimo da unidade do limite inferior, a menos que o contexto claramente dite de outra forma, entre os limites inferior e superior do intervalo também é especificamente divulgado. Cada intervalo menor entre qualquer valor indicado ou valor de intervenção em um intervalo indicado e qualquer outro valor declarado ou de intervenção nesse intervalo indicado insere-se no invento. Os limites superiores e inferiores destes intervalos menores podem ser independentemente incluídos ou excluídos no intervalo, e cada intervalo onde qualquer, ou ambos os limites estão incluídos no intervalo menor é também abrangido pela invenção, sujeito a qualquer limite expressamente excluído do intervalo indicado. Quando o intervalo indicado inclui um ou ambos os limites, os intervalos que excluem um ou ambos os limites são também incluídas na invenção.
- [0075]** A não ser que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como geralmente compreendido por um especialista na arte a qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, alguns métodos potenciais e preferenciais e materiais são descritos. Todas as publicações mencionadas aqui são incorporadas aqui por referência a divulgação e descrevem os métodos e/ou materiais em relação aos quais as publicações são citadas. Entende-se que a presente divulgação substitui qualquer divulgação de uma publicação incorporada na medida em que há uma contradição.
- [0076]** Deve ser notado que como usado aqui e nas reivindicações apenas, as formas singulares "um", "uns" e "o, a, os, as" incluem referências no plural a menos que o contexto claramente indique o contrário. Assim, por exemplo, a referência a "uma célula" inclui uma pluralidade de tais células e referência ao "composto" inclui uma referência a um ou mais compostos e seus equivalentes conhecidos por aqueles versados técnica, e semelhantes.

[0077] As publicações aqui discutidas são fornecidas unicamente para a sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada aqui contido deve ser interpretado como uma admissão de que a presente invenção não tenha direito a antecipar essa publicação em virtude da invenção anterior. Além disso, as datas de publicação fornecidas podem ser diferentes das datas de publicação efetivas, que podem precisar ser independentemente confirmadas.

Métodos de Detecção

[0078] Como foi resumido acima, a presente invenção fornece um método para determinar a presença ou ausência de anticorpos com fixação ao complemento em uma amostra biológica. Os métodos da invenção utilizam o fator de complemento C1q em questão (por exemplo autólogo, ou exógeno) para identificar anticorpos com fixação ao complemento na mesma amostra biológica que se ligam especificamente a um antígeno de interesse.

[0079] Os métodos geralmente incluem o contato com um suporte de fase sólida, tendo um antígeno de interesse (AgI) imobilizado no mesmo com uma amostra biológica suspeita de conter os anticorpos com fixação ao complemento que se ligam especificamente ao antígeno de interesse. Se presentes, os anticorpos com fixação ao complemento se ligarão especificamente ao antígeno imobilizado no suporte de fase sólida, e C1q se ligará ao anticorpo com fixação de complemento. A ligação de C1q pode então ser analisada pelo contato com o suporte da fase sólida com um anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável que se liga especificamente ao C1q ligado. Alternativamente, o C1q diretamente marcado pode ser usado no ensaio, e a ligação a esse C1q marcado diretamente pode ser medida diretamente, com o uso de um anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável.

[0080] A amostra biológica irá geralmente incluir anticorpos com fixação de não complemento, bem como anticorpos de fixação de complemento. Uma das vantagens da presente invenção é que a mesma pode diferenciar entre os dois anticorpos diferentes, usando C1q presente na mesma amostra, ou usando C1q exógeno. Ao usar o C1q presente na mesma amostra, o ensaio fornece detecção sensível e específica dos anticorpos de fixação de complemento relevantes que não ocorreriam se um C1q xenogênico fosse usado, tal como um derivado do soro de coelho.

[0081] Como será facilmente perceptível, o projeto dos ensaios descritos neste documento está sujeito a uma grande variação, e muitos formatos são conhecidos na técnica. As descrições a seguir são meramente fornecidas como orientação e uma pessoa versada na técnica pode facilmente modificar os protocolos descritos, usando técnicas bem conhecidas na arte.

Antígeno de Interesse (AgI)

[0082] Um determinante antigênico ou antígeno capaz de induzir um anticorpo é adequado para uso na presente invenção. Esses determinantes antigênicos ou antígenos podem ser, por exemplo, aqueles derivados de humanos normais [por exemplo, antígenos leucocitários humanos (HLA)], bactérias, vírus, fontes parasitárias ou fúngicas, ou tecidos anormais, tais como antígenos tumorais. Um antígeno é geralmente uma molécula para a qual um anticorpo podem ser gerado, incluindo as moléculas que exigem a presença de um adjuvante ou conjugação para outra molécula para induzir a formação de anticorpos. Um antígeno pode ser um peptídeo ou proteína, carboidrato, um ácido nucléico, ou um lipídeo. O termo "antígeno" também inclui porções de moléculas que ocorrem naturalmente, como, por exemplo, uma subunidade de uma proteína ou um fragmento de uma proteína que contém um domínio funcional ou motivo biologicamente relevante. Os antígenos adequados incluem, mas não estão limitados a, proteínas associadas ao ciclo celular, proteínas específicas do tecido, marcadores tumorais, citocinas, proteínas do complexo principal de histocompatibilidade, proteínas de choque térmico, e as proteínas associadas aos patógenos (quando um patógeno pode ser uma bactéria, um vírus, um fungo, um protozoário, um parasita multicelular, ou um príon), bem como resíduos de carboidratos associados com antígenos de transfusão de sangue e tipagem de tecido, lipopolissacarídeos, esfingolipídeos, etc. Antígenos exemplares são aqueles que provocam uma resposta imune que protege um animal da doença. Exemplos de tais antígenos incluem, mas não estão limitados a, um antígeno parasita protozoário, um antígeno parasita de helmintos, um antígeno de ectoparasitas, um antígeno de fungos, um antígeno bacteriano, e um antígeno viral.

[0083] Exemplos de antígenos virais incluem antígenos derivados de vírus como o vírus da hepatite B (HBV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da influenza A, vírus Epstein-Barr (EBV), vírus do herpes simplex (HSV), vírus sincicial respiratório (VSR), citomegalovírus humano (HCMV), vírus zoster varicela (VZV) e o vírus do sarampo.

Exemplos de antígenos bacterianos incluem, mas não estão limitados a, antígenos de *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteróides*, *Bordetella*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Dermatophilus*, *Enterococcus*, *Ehrlichia*, *E.coli*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemobartonella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, bactérias de forma-L, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neorickettsia*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Yersinia*. Exemplos de antígenos fúngicos incluem, mas não estão limitados a, antígenos de *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Basidiobolus*, *Bipolaris*, *Blastomyces*, *Candida*, *Clamydia*, *Coccidioides*, *Conidiobolus*, *Cryptococcus*, *Curvalaria*, *Epidermophyton*, *Exophiala*, *Geotrichum*, *Histoplasma*, *Madurella*, *Malassezia*, *Microsporum*, *Moniliella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialemonium*, *Phialophora*, *Prototheca*, *Pseudallescheria*, *Pseudomicrodochium*, *Pythium*, *Rhinosporidium*, *Rhizopus*, *Scolecobasidium*, *Sporothrix*, *Stemphylium*, *Trichophyton*, *Trichosporon*, e *Xylohypha*. Exemplos de antígenos parasitários de protozoários e helmintos incluem, mas não estão limitados a, antígenos de *Babesia*, *Balantidium*, *Besnoitia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Encephalitozoon*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Hammondia*, *Hepatozoon*, *Isospora*, *Leishmania*, *Microsporídios*, *Neospora*, *Nosema*, *Pentatrichomonas*, *Plasmodium*, *Pneumocytis*, *Sarcocystis*, *Schistosoma*, *Theileria*, *Toxoplasma* e *Trypanosoma*, *Acanthocheilonema*, *Aelurostrongylus*, *Ancylostoma*, *Angiostrongylus*, *Ascaris*, *Brugia*, *Bunostomum*, *Capillaria*, *Chabertia*, *Cooperia*, *Crenosoma*, *Dictyocaulus*, *Dioctophyme*, *Dipetalonema*, *Diphyllbothrium*, *Diplydium*, *Dirofilaria*, *Dracunculus*, *Enterobius*, *Filaroides*, *Haemonchus*, *Lagochilascaris*, *Loa*, *Mansonella*, *Muellerius*, *Nanophyetus*, *Necator*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Onchocerca*, *Opisthorchis*, *Ostertagia*, *Parafilaria*, *Paragonimus*, *Parascaris*, *Physaloptera*, *Protostrongylus*, *Setaria*, *Spirocerca*, *Spirometra*, *Stephanofilaria*, *Strongyloides*, *Strongylus*, *Thelazia*, *Toxascaris*, *Toxocara*, *Trichinella*, *Trichostrongylus*, *Trichuris*, *Uncinaria* e *Wuchereria*. Exemplos de antígenos de ectoparasitas incluem, mas não estão limitados a, antígenos (incluindo antígenos protetores, assim como alérgenos) de pulgas, carrapatos, incluindo os carrapatos duros e carrapatos moles; moscas, como mosquito-pólvora, mosquitos, moscas da areia, moscas pretas, moscas de cavalo, moscas do chifre, moscas de veados, moscas tsé-tsé, moscas de

estábulo, moscas causadoras de miíases e mosquitos que picam, formigas, aranhas, piolhos, ácaros e insetos, como percevejos e barbeiros.

[0084] Os antígenos exemplares incluem, mas não estão limitados a, um antígeno calicivírus, um antígeno coronavírus, um antígeno herpesvírus, um antígeno do vírus da imunodeficiência, um antígeno do vírus da peritonite infecciosa, um antígeno do vírus da leucemia, um antígeno de vírus da panleucopenia, um antígeno de parvovírus, um antígeno do vírus da raiva, um antígeno de Bartonella, um antígeno de Yersinia, um antígeno de Dirofilaria, um antígeno de Toxoplasma, um antígeno do tumor, um antígeno da pulga, um alérgeno de pulga, um antígeno de mosquito-pólvora, um alérgeno de mosquito-pólvora, um antígeno de ácaros, e um alérgeno de ácaro. Os antígenos particularmente preferenciais incluem um antígeno da glicoproteína G do vírus da raiva; dirofilariose, PLA2, P39, P4, P22U, Gp29, astacina, cisteína protease, fator inibitório de migração de macrófagos, alérgeno de veneno de animais peçonhentos, TPX-1, TPX-2, transglutaminase, anquirina, e antígenos da asparaginase; serina protease de pulgas, cisteína protease, aminopeptidase, serpina, carboxiesterases, esterase do hormônio juvenil, e antígenos epóxido hidrolases; antígenos salivares de pulgas; antígenos de Yersinia F1 e V, e antígenos de Toxoplasma gondii.

[0085] O antígeno usado no presente invenção pode ser aquele que é produzido por um método de recombinação genética ou é quimicamente sintetizado, com base na sequência do gene ou sequência de peptídeo determinada pela recombinação genética. Assim, é um antígeno recombinante, que é preparado de tal forma que a já conhecida sequência do genoma, ou sequências de DNA obtidas por uma clonagem molecular de vírus naturais ou células pela utilização de técnicas de recombinação genética é tratado com enzimas ou similares ou submetido a sínteses químicas e a sequência de DNA resultante ou sequência de DNA modificada é expressa por um micróbio, animal, planta, inseto ou algo semelhante para dar um antígeno recombinante, ou é um peptídeo ou um peptídeo modificado que é preparado por meio de uma síntese química de peptídeo conhecida como um método de fase líquida ou um método em fase sólida, utilizando as informações acima. Um método sintético em fase sólida para peptídeo pode ser feito geralmente através de um aparelho sintético de peptídeo automatizado em uma forma vantajosa.

Preabsorção

[0086] Em algumas modalidades, a amostra biológica é opcionalmente primeiramente contatada com um antígeno de reação cruzada. Em geral, o contato da amostra biológica com um antígeno de reação cruzada resultará na depleção dos anticorpos de reação cruzada em uma amostra biológica apesar de também não esgotar os anticorpos de fixação de complemento específico de anti-AgI (antígeno de interesse), que se presentes, permanecem na amostra em níveis detectáveis (por exemplo, pelo uso de um ensaio para detectar anticorpos de fixação de complemento específico de anti-AgI, tal como descrito aqui). Portanto, o antígeno de reação cruzada usado para manter contato com a amostra biológica geralmente não compreende o AgI que será usado para detectar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI na amostra biológica preabsorvida.

[0087] O contato pode ser feito, por exemplo, pelo contato da amostra biológica com um ou mais antígenos de reação cruzada como descrito aqui. A amostra biológica pode ser contatada com o antígeno de reação cruzada e, em seguida, o suporte de sólido específico com AgI é imobilizado em etapas sequenciais. Em algumas modalidades, a amostra biológica é contatada com um antígeno de reação cruzada de acordo com a invenção para "preabsorver" anticorpos não específicos a partir da amostra antes da detecção de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI na amostra. Salvo indicação específica, o termo "preabsorção" como aqui usado não implica necessariamente que a amostra biológica é contatada com o antígeno de reação cruzada primeiro, seguido pelo contato da amostra com um AgI, mas sim significa que os anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI não são detectados até depois da amostra ter sido exposta ao antígeno de reação cruzada.

Preparação da amostra

[0088] Ao praticar os métodos em questão, uma amostra de um sujeito é analisada quanto à presença de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI. Em algumas modalidades, a amostra que é analisada é uma amostra que é, ou é derivada de, qualquer fonte inicial que contenha anticorpos de fixação de complemento que se ligam especificamente a um AgI. Em outras modalidades, a amostra é, ou é obtida a partir de, qualquer complemento insuficiente contendo a fonte inicial. Essas amostras incluem aquelas em que o complemento C1q foi destruído por inativação pelo calor, e aquelas em que o C1q é fornecido exogenamente. Assim, uma fonte de amostra adequada será obtida

a partir de fluidos em que os anticorpos de fixação de complemento que se ligam especificamente a uma AgI foram liberados. As fontes de amostra de interesse incluem, mas não estão limitadas a, muitos fluidos corporais diferentes, produtos de sangue ou sangue particularmente, por exemplo, soro, plasma e sangue total, células do sangue e urina. O volume de amostra pode ser qualquer volume que seja compatível com o formato de ensaio específico. Em algumas modalidades, a amostra será diluída em uma solução adequada antes do teste para detectar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento que se ligam especificamente a um AgI. Em geral, uma solução adequada para a diluição de uma amostra biológica inclui um tampão, como o tampão fosfato (PBS), e pode incluir itens adicionais, como, por exemplo, um agente de bloqueio não específico, como a albumina de soro bovino (BSA), um detergente, tais como o Triton-X-100 e semelhantes.

- [0089]** As amostras de controle adequadas para o ensaio incluem, mas não estão limitadas a, sangue, soro, sangue total ou urina de seres humanos que não tenham anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI (ou seja, controle negativo), ou amostras que contêm uma quantidade conhecida, predeterminada de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI (ou seja, um controle positivo).
- [0090]** Em muitas modalidades, uma fonte inicial adequada para a amostra humana é uma amostra de sangue. Como tal, a amostra usada nos ensaios em questão é geralmente uma amostra derivada de sangue. A amostra derivada de sangue pode ser derivada de sangue total ou de uma fração dos mesmos, por exemplo, soro, plasma, etc., onde, em algumas modalidades a amostra é derivada do sangue deixado coagular e o soro é separado e coletado para ser usado para ensaio.
- [0091]** Em modalidades em que a amostra é soro, plasma ou uma amostra derivada de soro, a amostra geralmente é uma amostra fluida. Qualquer metodologia conveniente para produzir uma amostra de soro fluida pode ser empregada. Em muitas modalidades, o método utiliza a retirada de sangue venoso por punção na pele (por exemplo, furo no dedo, punção venosa) em um tubo de separação ou de coagulação do soro, permitindo que o sangue coagule, e a centrifugação do soro ocorre distante do sangue coagulado. O soro é coletado e armazenado até ser ensaiado. Da mesma forma, uma amostra de plasma pode ser coletada do paciente pela retirada de sangue venoso em um tubo e centrifugação do sangue de modo que as células do sangue coletado fiquem na parte inferior do tubo. A parte líquida da amostra, que é o plasma sanguíneo, pode ser coletada e armazenada até

ser ensaiada. Uma vez que a amostra derivada é obtida, a amostra é analisada para determinar a presença de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI.

[0092] A amostra pode ser tratada de uma variedade de formas, de modo a melhorar a detecção da presença de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI. Por exemplo, quando a amostra é de sangue, os glóbulos vermelhos podem ser removidos da amostra (por exemplo, por centrifugação) antes do ensaio. A detecção da presença de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI também podem ser intensificada através da concentração da amostra usando procedimentos conhecidos na técnica (por exemplo, precipitação de ácido, precipitação de álcool, a precipitação de sal, a precipitação de hidrófobos, filtração (usando um filtro que é capaz de reter moléculas superiores a 30 kD, por exemplo, CENTRIM 30™), a purificação por afinidade).

Formatos de Ensaio

[0093] Os suportes sólidos imobilizados de AgIs são aqui usados como diagnóstico para detectar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento específicos para anti-AgI reativos em uma amostra biológica. Normalmente, os ensaios geralmente envolvem a separação do anticorpo não ligado em uma fase líquida a partir de um suporte de fase sólida para o qual os complexos de antígeno-anticorpo com fixação de complemento são ligados. O ensaio é geralmente descrito na FIG 1, FIG. 2 e FIG. 3 com relação a um suporte sólido substancialmente plano (por exemplo, forma de poço de microtitulação ou membrana) e na FIG. 4, FIG. 5 e FIG 6 com relação a um suporte sólido de microesferas. Os suportes sólidos que podem ser usados na prática da invenção incluem substratos tais como nitrocelulose (por exemplo, na forma de poços de microtitulação ou membrana); policloreto de vinila (por exemplo, folhas ou poços de microtitulação); poliestireno; látex (por exemplo, esferas, microesferas, micropartículas, microgrânulos ou placas de microtitulação); fluoreto poli vinilideno; papel diazotizado; membranas de náilon; membranas de polietileno, esferas ativadas, esferas magneticamente responsivas, células e membranas celulares, e semelhantes.

[0094] Em algumas modalidades, a amostra biológica vai ser diluída em uma solução adequada antes do ensaio. Em geral, uma solução adequada para a diluição de uma amostra biológica inclui um tampão, como o tampão fosfato (PBS), e pode incluir itens

adicionais, como, por exemplo, um agente de bloqueio não específico, como a albumina de soro bovino (BSA), um detergente, tal como o Triton-X-100 e semelhantes.

[0095] Em geral, um suporte sólido é primeiramente reagido com um componente de fase líquida (por exemplo, um ou mais antígenos específicos de interesse (AgI)), sob condições adequadas de ligação tais que o componente seja suficientemente imobilizado no suporte. Opcionalmente, a imobilização do antígeno no suporte pode ser intensificada primeiramente pelo acoplamento de AgI com uma proteína com melhores propriedades de ligação. As proteínas de acoplamento apropriadas incluem, mas não estão limitadas a, macromoléculas, tais como albuminas do soro incluindo albumina do soro bovino (BSA), hemocianina do molusco keyhole limpet, moléculas de imunoglobulina, tireoglobulina, ovalbumina, e outras proteínas bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Outras moléculas que podem ser usadas para ligar os antígenos ao suporte incluem polissacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, os copolímeros de aminoácidos, e semelhantes. Tais moléculas e métodos de acoplamento destas moléculas para o AgI, são bem conhecidos por aqueles que possuem habilidades comuns na arte. Ver, por exemplo, Brinkley, M.A. *Bioconjugate Chem.* (1992) 3:2-13; Hashida et al., *J. Appl. Biochem.* (1984) 6:56-63; e Anjaneyulu e Staros, *International J. of Peptide and Protein Res.* (1987) 30:117-124.

[0096] Depois de contatar o suporte sólido com o AgI, qualquer AgI não imobilizado é removido do suporte por lavagem. O AgI ligado ao suporte é então contatado com uma amostra biológica suspeita de conter anticorpos de fixação de complemento anti-AgI em condições adequadas de ligação. Se presentes, os anticorpos de fixação de complemento se ligam especificamente ao AgI imobilizado. O C1q (por exemplo, autólogo, ou exógeno) presente na amostra se ligam ao anticorpo com fixação de complemento ligado ao AgI imobilizado sobre o suporte de fase sólida. O C1q presente na amostra pode ser C1q autólogo da amostra biológica em si, ou pode ser C1q exógeno. Em algumas modalidades, o C1q ligado é então analisado pelo contato do suporte da fase sólida com um anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável que se liga especificamente ao C1q. A presença do anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável pode ser detectada através de técnicas bem conhecidas na arte.

[0097] Em algumas modalidades, o ensaio é realizado de forma sequencial, primeiramente contatando o suporte da fase sólida com a amostra biológica contendo anticorpos de fixação de complemento anti-AgI e C1q, em seguida, contatando o suporte da fase sólida

com um anticorpos anti-C1q marcado de forma detectável. Esta abordagem está descrita na FIG. 1. Em outras modalidades, o suporte da fase sólida é contatado tanto com a amostra biológica quanto com o anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável ao mesmo tempo. Esta abordagem está descrita na FIG. 2.

[0098] Em algumas modalidades, Cq1 exógeno marcado de forma detectável é usado no ensaio. Em tais modalidades, o suporte da fase sólida é contatado tanto com a amostra de interesse quanto com o C1q exógeno marcado de forma detectável ao mesmo tempo. O C1q ligado é então detectado através de técnicas bem conhecidas na arte. Esta abordagem está descrita na FIG. 3.

[0099] Mais particularmente, em algumas modalidades, um método ELISA pode ser usado, onde os poços de uma placa de microtitulação são revestidos com AgI específicos (por exemplo, os AgI específicos são imobilizados na superfície). Uma amostra que contenham ou que seja suspeita de conter anticorpos de fixação de complemento anti-AgI e C1q (por exemplo, autólogo, ou exógeno) é então adicionada aos poços revestidos. Opcionalmente, uma série de padrões, contendo concentrações conhecidas de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento pode ser analisada em paralelo com as amostras ou alíquotas do mesmo para servir como controle. Geralmente a partir de cerca de 0,001 a 1 ml de amostra, diluída ou não, é suficiente, geralmente cerca de 0,01 ml é suficiente. Além disso, em certas modalidades, cada amostra e o padrão serão adicionados aos múltiplos poços de modo que os valores médios podem ser obtidos para cada um. As amostras de teste e de controle são, cada uma, incubadas com o suporte sólido por um tempo suficiente para ocorrer a ligação de um anticorpo ao antígeno. Geralmente, de cerca de 0,1 a 3 horas é suficiente, bastando geralmente 1 hora.

[00100] Após um período de incubação suficiente para permitir a ligação do anticorpo ao AgI imobilizado e a ligação de C1q presente na amostra aos anticorpos com fixação de complemento ligados à AgI imobilizado, a(s) placa(s) opcionalmente pode ser lavada para remover anticorpos não ligados. Geralmente, um meio detergente não iônico diluído com um pH adequado, geralmente 7 a 8, pode ser usado como um meio de lavagem. Um tampão isotônico, como o tampão fosfato, pode ser empregado na etapa de lavagem. Em certas modalidades, nenhuma lavagem será feita durante o ensaio.

[00101] Em uma modalidade alternativa, uma amostra biológica que contenha ou que seja suspeita de conter anticorpo anti-AgI com fixação de complemento é primeiramente contatada com o antígeno de reação cruzada em uma solução para fornecer uma mistura

preabsorvida. Após um período de incubação suficiente para permitir a ligação do anticorpo ao antígeno de reação cruzada, a mistura preabsorvida contendo o anticorpo "residual" é então adicionada aos poços de uma microplaca revestida com AgI específico. Após um período de incubação suficiente para permitir que os anticorpos anti-AgI "residuais" com fixação ao complemento a partir da mistura preabsorvida se liguem ao AgI imobilizado e a ligação de C1q (por exemplo autólogo, ou exógeno) presente na amostra à anticorpos de fixação de complemento ligados à imobilizada AgI, a(s) placa (s) pode(m), opcionalmente, ser lavada(s) para remover os anticorpos não ligados. Em certas modalidades, nenhuma lavagem será executada. A molécula de ligação secundária marcada de forma detectável é adicionada para que ligue o C1q ligado aos anticorpos de fixação de complemento. A molécula de ligação secundária é deixada reagir com qualquer C1q (por exemplo, autólogo, ou exógeno) ligado aos anticorpos anti-AgI com fixação de complemento (por exemplo, anticorpos de fixação de complemento ligados aos antígenos AgI específicos imobilizados na superfície), a placa é, opcionalmente, lavada, e a presença da molécula de ligação secundária é detectada através de métodos conhecidos na técnica.

[00102] Assim, em uma modalidade especial, a presença de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento ligados e C1q autólogo a partir de uma amostra biológica pode ser facilmente detectada através de um ligante secundário compreendendo um anticorpo dirigido contra o C1q autólogo. Em outra modalidade, a presença de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento ligados a partir de uma amostra biológica pode ser facilmente detectada usando um ligante secundário compreendendo um C1q exógeno marcado diretamente. Várias moléculas C1q anti-humanas são conhecidas na técnica (por exemplo, C1q de cabra anti-humano, C1q de ovino anti-humano comercialmente disponível, etc.) as quais podem ser facilmente conjugadas a uma marcação detectável para facilitar a detecção direta, indireta de autólogo do C1q exógeno. Exemplos de marcações que permitem a medição direta de imunocomplexos incluem as radiomarcações, como ^3H ou ^{125}I , fluoróforos, corantes, esferas, quimiluminescentes, partículas coloidais, e semelhantes. Exemplos de marcações que permitem a medição indireta de ligação incluem enzimas onde o substrato pode fornecer um produto colorido ou fluorescente. A marcação pode ser detectada diretamente (por exemplo, um radioisótopo) ou pela ligação a uma ou mais moléculas adicionais (por exemplo, um epítipo que se liga a um anticorpo marcado). Exemplos não limitantes de compostos

fluorescentes que podem ser usados de acordo com a invenção incluem fluorcromos como a fluoresceína (FITC) ou Alexa 488, Cy 3 ou Cy 5 e proteína verde fluorescente, bem como ficoeritrina (PE), PE-Cy5, PerCP, DCE, e semelhantes. Em algumas modalidades, o anticorpo é marcado com uma enzima ligada covalentemente capaz de fornecer um sinal de produto detectável após a adição de um substrato adequado. Exemplos de enzimas adequadas para uso em conjugados incluem peroxidase de rabanete, fosfatase alcalina, malato desidrogenase e afins. Quando não comercialmente disponíveis, tais conjugados de anticorpo-enzima são facilmente produzidos por técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica.

[00103] Em tais ensaios, a concentração do anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável ou C1q marcado diretamente será geralmente cerca de 0,1 a 500 µg/ml, como cerca de 150 µg/ml. A solução contendo o anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável é geralmente tamponado na faixa de cerca de pH 6,5 a 9,5. O tempo de incubação deve ser suficiente para o anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável se ligar ao C1q autólogo ou exógeno disponíveis. Geralmente, de cerca de 0,1 a 3 horas é suficiente, geralmente 40 minutos é suficiente. Depois que o material ligado não especificamente foi removido, o sinal produzido pelo anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável ligado é detectado por meios convencionais. Por exemplo, quando a marcação detectável é um composto fluorescente, a presença da marcação pode ser detectada usando técnicas de citometria de fluxo ou outras técnicas semelhantes, tais como o sistema Luminex xMAP. Quando um conjugado de enzima é usado, um substrato de enzima apropriado é fornecido para que um produto detectável seja formado. Mais especificamente, quando uma peroxidase é a enzima conjugada selecionada, uma combinação de substrato preferido é H₂O₂ e fenilenodiamina-O que gera um produto colorido sob condições de reação apropriadas. Os substratos adequados para outros conjugados de enzimas, como os revelados acima são conhecidos por aqueles versados na técnica. As condições de reação adequadas, bem como meios para detectar os vários conjugados úteis de seus produtos, são também conhecidas por aqueles versados na técnica. Para o produto de substrato fenilenodiamina-O, por exemplo, a absorbância de luz em 490 a 495 nm é convenientemente medida com um espectrofotômetro.

[00104] Os ensaios também podem ser conduzidos em solução, de modo que o AgI e os anticorpos presentes em uma amostra biológica forma complexos sob condições de

precipitação. Em uma modalidade particular, os AgI específicos podem ser imobilizados a uma partícula em fase sólida (por exemplo, uma esfera de agarose, esfera de látex, ou semelhante) usando técnicas de acoplamento conhecidas na técnica, como pela química direta ou acoplamento indireto. A partícula revestida com AgI e o antígeno de reação cruzada livre (por exemplo, não imobilizado a uma partícula em fase sólida) são então contatados sob condições adequadas de ligação com uma amostra biológica suspeitas de conter anticorpos anti-AgI com fixação de complemento. A reticulação entre anticorpos anti-AgI com fixação de complemento ligado e C1q (por exemplo, autólogo ou exógeno) provoca a formação de agregados de partículas de complexos de antígeno-anticorpo que podem ser precipitadas e separadas da amostra utilizando a lavagem e/ou centrifugação. A mistura reacional pode ser analisada para determinar a presença ou ausência de complexos de antígeno-anticorpo com qualquer uma de uma série de métodos padrões, tais como os métodos de imunodiagnóstico descrito acima, incluindo o uso de um anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável.

[00105] Em uma modalidade adicional, o AgI específico pode ser imobilizado a uma primeira partícula de fase sólida (por exemplo, uma esfera de agarose ou similar) e o antígeno de reação cruzada pode ser imobilizado a uma partícula a uma segunda partícula de fase sólida (por exemplo, uma esfera magnética), onde a primeira partícula da fase sólidas e a segunda partícula da fase sólida são diferentes. Em tais modalidades, as partículas revestidas com o antígeno de reação cruzada e as partículas revestidas com AgI específico são então contatadas sob condições adequadas de ligação com uma amostra biológica suspeitas de conter anticorpos anti-AgI com fixação de complemento. Os complexos de anticorpo - antígeno de reação cruzada - partícula podem, então, ser separados da amostra. Por exemplo, quando os antígenos de reação cruzada são fixos a uma primeira partícula, como esferas magnéticas, os complexos de anticorpo - antígeno de reação cruzada - partícula podem ser separados da solução usando qualquer um de uma série de métodos padrões. A mistura reacional pode então ser analisada para determinar a presença ou ausência de complexos de antígeno AgI específico - anticorpos de fixação de complemento usando os métodos descritos acima.

[00106] Em ainda outra modalidade, um método para diagnóstico da infecção (por exemplo, viral ou bacteriana), utilizando a presente invenção envolve o uso de um dispositivo de ensaio para detectar a presença ou ausência de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento em uma amostra por primeiramente, opcionalmente, contatar a

amostra com antígenos de reação cruzada para remover quaisquer anticorpos que poderiam reagir de forma cruzada com o AgI específico e, em seguida, contatar a amostra com AgI específico para ligar quaisquer anticorpos anti-AgI com fixação de complemento na amostra. Em tais modalidades, o dispositivo de ensaio compreende pelo menos uma região de aplicação de amostra, uma zona de preabsorção, e uma zona de detecção e será composto por uma membrana capaz de conduzir o fluxo de fluido, como uma tira de membrana de nitrocelulose. Opcionalmente, a membrana pode ser fornecida em uma superfície de suporte rígida ou semirrígida, como uma tira de polietileno. Em modalidades representativas, a zona de preabsorção será interposta entre a região de aplicação de amostra e na zona de detecção. A localização das zonas será tal que o fluxo lateral de fluido ao longo da membrana faça com que todos os componentes da amostra entrem em contato com a primeira zona preabsorção e depois entrem em contato com a zona de detecção. Como tal, o fluxo de fluidos ao longo da membrana da região de aplicação da amostra em direção a zona de preabsorção e, então, a zona de detecção é facilitada por ação de capilaridade através da membrana. Os dispositivos exemplares de ensaio de fluxo lateral e métodos de detecção que empregam os dispositivos de ensaio de fluxo lateral são fornecidos, por exemplo, na Patente US 6.146.589, a divulgação da qual sendo aqui incorporada por referência.

[00107] Em modalidades representativas, os antígenos de reação cruzada são imobilizados na zona de preabsorção e os AgI específicos são imobilizados na zona de detecção. A detecção da presença ou ausência de anticorpo anti-AgI com fixação de complemento é realizada primeiramente pela adição da amostra para a região de aplicação de amostra e permitindo que a amostra migre por ação de capilaridade ao longo da tira de membrana. Na medida em que a amostra migra através da tira da membrana, a primeira amostra entra em contato com os antígenos de reação cruzada imobilizados na zona de preabsorção para fornecer uma amostra preabsorvida. A amostra preabsorvida então migra para a zona de detecção onde a mesma entra em contato com AgI específicos imobilizados. Se presentes, os anticorpos de fixação de complemento anti-AgI se ligam especificamente ao AgI imobilizado, e C1q (por exemplo, autólogo ou exógeno), em seguida, liga-se especificamente aos anticorpos anti-AgI com fixação de complemento ligados. O anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável pode, então, ser contactado com a zona de detecção para detectar a presença de C1q e complexo de anticorpo anti-AgI com fixação de complemento como descrito acima. A molécula de

anticorpo anti-C1q marcada de forma detectável é deixada reagir com uma amostra de C1q capturado, e a presença da molécula de ligação secundária é detectada usando os métodos descritos acima e bem conhecidos na técnica.

[00108] Em qualquer das modalidades acima descritas, de uma a seis lavagens podem ser empregadas, com volume suficiente para lavar completamente quaisquer proteínas ligadas não especificamente ou outras moléculas presentes.

Kits

[00109] Também são fornecidos kits que encontram uso na prática dos métodos em questão, como descrito acima. Os kits para a prática de métodos em questão, pelo menos, incluem reagentes para o ensaio de uma amostra derivada de um sujeito humano para a presença ou ausência de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento, onde esses kits podem incluir: AgIs específicos e/ou dispositivos de imunoensaio que compreendem os AgIs específicos, anticorpos anti-C1q marcados de forma detectável, C1q exógenos diretamente rotulados, bem como membros de um sistema de produção de sinal, tais como substratos de enzima, e semelhantes; vários tampões para uso na realização dos ensaios de detecção em questão, uma referência para determinar a presença ou ausência de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento em uma amostra, e semelhantes.

[00110] Em algumas modalidades, as composições serão fornecidas em uma solução adequada para diluir uma amostra biológica. Em geral, uma solução adequada para a diluição de uma amostra biológica vai incluir um tampão, como salina tamponada com fosfato (PBS), e pode incluir itens adicionais, como, por exemplo, um agente de bloqueio não específico, tal como albumina de soro bovino (BSA), um detergente, tais como o Triton-X-100 e semelhantes.

[00111] Os kits podem ainda incluir um ou mais reagentes que podem ser usados na preparação da amostra derivada do paciente, tais como a heparina, Ficoll-Hypaque, tampão de lise, inibidor da protease, e etc.. Além disso, os kits em questão podem ainda incluir um ou mais componentes empregados no fracionamento da amostra, tal como um meio eletroforético ou precursores do mesmo, por exemplo, precursores secos de géis de poliacrilamida, um ou mais meios de tampão ou os seus componentes e afins.

[00112] Em certas modalidades, os kits incluem ainda pelo menos um meio de apresentação e armazenamento de informações que contém dados de referência com o qual os resultados do ensaio podem ser comparados, a fim de diagnosticar a infecção, por

exemplo, dados de referência que positiva ou negativamente se correlacionam com a presença de anticorpos anti -AgI com fixação de complemento que se ligam especificamente a um antígeno de interesse derivado de uma fonte viral ou bacteriana, como descrito acima. O meio de apresentação ou armazenamento de informações pode ser de qualquer forma conveniente, como a informação impressa em um folheto, um arquivo eletrônico presente em um meio de armazenamento eletrônico, por exemplo, um disco magnético, CD-ROM, e semelhantes. Em ainda outras modalidades, os kits podem incluir meios alternativos para a obtenção de dados de referência, por exemplo, um website para obter os dados de referência "on line".

[00113] Os kits podem ainda incluir os meios para a obtenção da amostra do paciente, por exemplo, uma seringa. Os kits em questão normalmente incluem instruções para a realização dos métodos em questão, onde estas instruções podem estar presentes em um folheto e/ou na embalagem do kit. Finalmente, o kit pode ainda incluir um ou mais reagentes a partir de um ensaio bioquímico adicional que é usado para detectar a presença de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento.

[00114] Os componentes do kit podem estar presentes em recipientes separados, ou um ou mais dos componentes podem estar presentes no mesmo recipiente, onde os recipientes podem ser recipientes de armazenamento e/ou recipientes que são usados durante o ensaio para o qual o kit é projetado.

Dispositivos

[00115] Também são fornecidos dispositivos que encontram formas de uso na prática dos métodos em questão, como descrito acima. Os dispositivos para praticar os métodos em questão, pelo menos, incluem reagentes para o ensaio de uma amostra derivada de um sujeito humano para a presença ou ausência de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento, onde tais dispositivos podem incluir: o AgI específico e, opcionalmente, antígenos de reação cruzada, imobilizados na superfície de um suporte sólido, como uma placa de microtitulação ou microesfera, tal como uma esfera de agarose ou de látex.

[00116] Em certas modalidades, uma placa de microtitulação será fornecida com um único AgI imobilizado na superfície de cada poço da placa. Em outras modalidades, uma placa de microtitulação será fornecida com o mesmo AgI imobilizado na superfície de um ou mais poços da placa. Em certas modalidades, uma população de microesferas será fornecida com um AgI imobilizado na superfície da população das microesferas. Em

certas modalidades, uma população de microesferas será fornecida com um único AgI imobilizado na superfície de cada sub-população de microesferas. Por exemplo, uma população de microesferas será fornecida tal que inclua 10 subpopulações, onde cada sub-população inclui um único AgI imobilizado. Por exemplo, trinta dos antígenos HLA de classe I (Tabela 1 e Tabela 3) e 30 dos antígenos HLA de classe II (Tabela 2 e Tabela 4) podem ser imobilizados na superfície das microesferas, como esferas de látex, ou ainda em forma de um antígeno único (Tabelas 1 e 2) ou em subpopulações (Tabela 3 e 4) para uso na identificação de anticorpos de fixação de complemento que se ligam especificamente a um subtipo de HLA.

Tabela 1

No. da Esfera	Tipagem de Antígeno HLA de CLASSE I	No. da Esfera	Tipagem de Antígeno HLA de CLASSE I
1	A1	36	B47
2	A2	37	B48
3	A3	38	B49
4	A11	39	B50
5	A23	40	B51
6	A24	41	B52
7	A25	42	B53
8	A26	43	B54
9	A29	44	B55
10	A30	45	B56
11	A31	46	B57
12	A32	47	B58
13	A33	48	B59
14	A34	49	B60
15	A36	50	B61
16	A43	51	B62
17	A66	52	B63
18	A68	53	B64
19	A69	54	B65
20	A74	55	B67
21	A80	56	B71
22	B7	57	B72
23	B8	58	B73
24	B13	59	B75
25	B18	60	B76
26	B27	61	B78
27	B35	62	B81
28	B37	63	B8201
29	B38	64	BW4
30	B39	65	BW6
31	B41		
32	B42		
33	B44		
34	B45		
35	B46		

Tabela 2

No. da Esfera	Tipagem de Antígeno HLA de CLASSE II
1	DR1
2	DR4
3	DR7
4	DR8
5	DR10
6	DR103
7	DR11
8	DR12
9	DR13
10	DR14
11	DR15
12	DR16
13	DR17
14	DR18
15	DR51
16	DR52
17	DR53
18	DR15, 17
19	DQ2
20	DQ4
21	DQ5
22	DQ6
23	DQ7
24	DQ8
25	DQ9

Tabela 3

No. da Esfera	Tipagem de Antígeno HLA de CLASS I	
1	A11	B27,48
2	A2,29	B39,56
3	A1,29	B8,45
4	A2,24	B7,55
5	A2,25	B18,64
6	A26,24	B52,62
7	A31,68	B53
8	A2,11	B13,62
9	A23,33	B45,63
10	A23,34	B44
11	A11,23	B49,52
12	A11,24	B59,60
13	A24,33	B44,51
14	A23,26	B41,72
15	A3,32	B50,56
16	A2,24	B54,67
17	A2	B52,73
18	A26,66	B38,75
19	A11,33	B51,54
20	A30	B13,72
21	A30,36	B35,71
22	A69	B35,61
23	A1,32	B60,64
24	A2	B7,46
25	A30	B42
26	A2	B8,58
27	A2,3	B58,65
28	A1,36	B37,57
29	A3,68	B7,65
30	A33,36	B53,61

Tabela 4

No. da Esfera	Tipagem de Antígeno HLA de CLASS II		
1	DR15, 9	53, 51	DQ5, 9
2	DR4, 15	53, 51	DQ6, 7
3	DR16, 4	53, 51	DQ4, 5
4	DR8, 14	52	DQ4, 5
5	DR4, 7	53	DQ2, 8
6	DR15, 18	51, 52	DQ6, 4
7	DR11, 12	52	DQ5, 7
8	DR103, 17	52	DQ5, 2
9	DR1, 13	52	DQ5, 6
10	DR9, 10	53	DQ5, 9
11	DR15, 12	51, 52	DQ5, 7
12	DR16, 14	51, 52	DQ5
13	DR13, 8	52	DQ5, 6
14	DR11, 13	52	DQ5, 6
15	DR17, 7	52, 53	DQ2, 9
16	DR15, 8	51	DQ6, 8
17	DR15, 4	51, 53	DQ2, 6
18	DR15, 17	51, 52	DQ6, 2
19	DR15, 7	51, 53	DQ6, 2
20	DR1, 7	53	DQ2, 5
21	DR15, 11	52	DQ5, 6
22	DR7, 13	52, 53	DQ6, 9
23	DR15, 13	51, 52	DQ6, 2
24	DR9, 14	52, 53	DQ5, 9
25	DR8, 9	53	DQ2, 7
26	DR17, 14	52	DQ2, 5
27	DR1, 11	52	DQ5, 6
28	DR17, 4	52, 53	DQ2
29	DR11, 4	52, 53	DQ7, 8
30	DR1, 14	52	DQ5

[00117] Vários de tais dispositivos são conhecidos na técnica. Em um exemplo não limitante, o dispositivo compreende um AgI imobilizado em uma partícula em fase sólida (por exemplo, uma esfera de agarose, esfera de látex, esfera magnética, etc.) usando técnicas de acoplamento conhecidas na técnica, como pela química direta ou acoplamento indireto. O complexo de partícula - AgI pode então ser usados nos ensaios descritos acima. Em algumas modalidades, o AgI é imobilizado na partícula de fase sólida por um grupamento de ligação tal como, por exemplo, um polipeptídeo.

[00118] Os itens adicionais que são necessários ou desejados nos métodos a serem praticado com os dispositivos podem estar presentes, cujos itens adicionais incluem, mas não estão limitados a: meios para a obtenção da amostra do paciente, por exemplo, uma seringa, um ou mais reagentes necessários para preparação da amostra derivada do paciente, tais como a heparina, Ficoll-Hypaque, tampão de lise, inibidor da protease, e similares; instruções para a realização dos métodos em questão usando os dispositivos em questão, um ou mais reagentes a partir de um ensaio bioquímico adicional que é

usado para detectar a presença ou ausência de anticorpos anti-AgI com fixação de complemento.

[00119] Em algumas modalidades, os dispositivos também serão fornecidos com uma solução adequada para diluir uma amostra biológica. Em geral, uma solução adequada para a diluição de uma amostra biológica vai incluir um tampão, como salina tamponada em fosfato (PBS), e pode incluir itens adicionais, como, por exemplo, um agente de bloqueio não específico, tal como albumina de soro bovino (BSA), um detergente, tal como o Triton-X-100 e semelhantes.

[00120] Em outro exemplo não limitante, o dispositivo geralmente empregará um caminho de fluxo contínuo em uma membrana ou filtro adequado, como uma membrana de nitrocelulose, tendo pelo menos três regiões, uma região de transporte de fluídos, uma região da amostra, e uma região de medição. A região da amostra é impedida de contatar a transferência de fluido com as outras porções do caminho de fluxo antes do recebimento da amostra. Depois que a região da amostra recebe a amostra, a mesma é posta em relação de transferência de fluidos com a região de transporte de fluidos (por exemplo, a região da amostra está em comunicação fluida com a região de transporte de fluidos). A região de transferência de fluidos pode, opcionalmente, ter antígenos de reação cruzada imobilizados para se ligarem aos anticorpos de reação cruzada. Depois que a região de transporte de fluidos recebe a amostra, a mesma é posta em relação à transferência de fluidos com a região de medição (por exemplo, a região de transporte de fluidos está em comunicação fluida com a região de medição). A região de medição pode ter imobilizado na mesma o AgI específico, e os anticorpos anti-C1q marcados de forma detectável são então combinados com a amostra de ensaio e o ensaio é realizado como descrito acima.

[00121] Em outro exemplo não limitante, o dispositivo é uma sonda, cuja superfície é ligada em regiões distintas: (1) AgI específico e, opcionalmente (2) reagente de afinidade de um antígenos de reação cruzada. Em tal dispositivo exemplar, a sonda é inserida diretamente em uma amostra de teste (por exemplo, sangue, soro ou urina) derivada de um sujeito humano em condições adequadas para permitir a ligação dos anticorpos anti-AgI com fixação de complemento com o AgI específico e posterior ligação de C1q (por exemplo, autólogo ou exógeno) para anticorpos anti-AgI com fixação de complemento ligados. A sonda é então retirada da amostra e, se necessário, lavada para remover material não especificamente ligado. A sonda é então inserida em um recipiente

contendo um anticorpo anti-C1q marcado de forma detectável, ou fragmento ou mimético do mesmo, que se liga especificamente a C1q humana. Após a incubação por um tempo suficiente para a ligação do anticorpo anti-C1q ao C1q humano e complexos de AgI - anticorpo anti-AgI com fixação de complemento, a sonda pode ser lavada e a ligação do anticorpo anti-C1q é detectada por meios padrões. Sempre que necessário a detecção do segundo anticorpo, a sonda pode ser inserida em um segundo recipiente que contém um reagente que ativa a marcação detectável no segundo anticorpo. Alternativamente, as modalidades semelhantes podem usar C1q exógeno marcado diretamente ao invés do anticorpo anti-C1q. Em tais modalidades, após a sonda ser retirada da amostra, a sonda pode ser lavada e a ligação do C1q exógeno marcado diretamente pode ser detectada pelos métodos padrões.

EXEMPLOS

[00122] Os exemplos a seguir se apresentam de modo a proporcionar àqueles versados na técnica uma divulgação e descrição completa de como fazer e usar a presente invenção, e não se destina a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção, nem eles são destinados para representar que os experimentos abaixo são todos ou apenas os experimentos realizados. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão em relação aos números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros experimentais e os desvios devem ser contabilizados. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura está em graus centígrados, e a pressão é igual ou próxima a pressão atmosférica.

EXEMPLO

1

Ensaio	de	anticorpo	de	HLA	C1q
--------	----	-----------	----	-----	-----

Materiais e Métodos

[00123] Os seguintes métodos e materiais foram usados nos exemplos abaixo.

Materiais

[00124] O antígeno LABScreen único e kits PRA foram adquiridos da One Lambda (Canoga Park, CA). Conjugados de PE de C1q anti-humano de ovinos foi adquirido de Meridian Life Science, Inc. (Saco, Maine 04.072). IVIG (Gamimmune-N), 10% em glicina 0,2M, pH 4,4; foi fornecido pela Bayer Corporation.

Métodos

1. Citotoxicidade dependente de citotóxicos (CDC)

[00125] prova cruzada de Citotoxicidade 10-S-150 - Células T.

[00126] prova cruzada de Citotoxicidade 10-S-151 - Células B.

2. Inibição de Gamaglobulina Intravenosa (IVIG) In Vitro no CDC

[00127] [00104] prova cruzada de Citotoxicidade 10-S-150 - Células T.

[00128] [00105] prova cruzada de Citotoxicidade 10-S-151 - Células B

3. Luminex IgG (esferas com antígeno único e esferas de PRA):

[00129] Ensaio de esfera de antígeno único tipo LUMINEX IgG 10-S-127

4. Luminex C1q (esferas com antígeno único e esferas de PRA) Procedimento Experimental

[00130] O procedimento a seguir foi usado para o procedimento experimental de Luminex C1q para as esferas com um único antígeno e as esferas PRA:

4.1. Incubar 20 ul de soros com 2,5 ul de HLA de classe I e/ou esferas revestidas com HLA II - Ag (antígeno único / esferas com antígenos mistos) em temperatura ambiente por 20 minutos em um agitador de bandeja;

4.2. Sem lavar, adicionar 10 ul de C1q anti-humano conjugado a PE e continuar a incubar mais 20 minutos em um agitador de bandeja;

4.3. Lavar as esferas com 200 ul de tampão de lavagem Luminex duas vezes e ressuspender em 60 ul de PBS.

4.4. Adquirir a amostra e coletar dados em uma máquina Luminex;

4.5. Proceder à análise de dados usando o software LABScreen.

Ajuste de Corte

[00131] Um de especificidade HLA-AB positivo tem que atender aos dois seguintes critérios:

a. A pontuação deve ser > 4, com base na fórmula prevista em One Lambda, e

b. O sinal de fluorescência da matéria-prima do PE deve ser > 100;

5. Preparação de Amostras para Teste Luminex C1q de Inibição de IVIG In Vitro

[00132] As três amostras seguintes foram usadas no ensaio de inibição de IVIG *in vitro*:

- a. soro puro (da especificidade anti-HLA conhecida);
- b. Soro diluído 1:2 em [10% de albumina humana, Glicina 0,2 M / PBS] tampão; pH 7,4
- c. Soro diluído 1:2 em 10% de IVIG (em tampão de glicina 0,2 M como carreador), pH ~ 4,4.

[00133] Um soro masculino não sensibilizado AB negativo preparado como acima serve como o controle do ensaio de inibição de IVIG.

6. Preparação de Amostras para Teste de Inibição In Vitro por CDC

[00134] Exceto para glicina 0,2 M / tampão PBS (pH 7,4), que foi usado como o diluente, as amostras foram preparadas da mesma maneira que as amostras de Luminex C1q acima. O procedimento acima descrito é o processo de etapa única. Os procedimentos a seguir são procedimentos de múltiplas etapas que também podem ser usados:

- a). Lavar em duas etapas com e sem adição extra de C1q humano
- b). Tratar o soro com DTT antes da realização do ensaio com e sem adição extra de C1q humano.
- c). Usar PE-anti-C3 como anticorpo secundário.
- d). Esferas de Luminex PRA com procedimento de etapa única.
- e). Inativação por calor do soro com e sem adição de C1q.

7. Modelo Experimental de Validação

[00135] Todos os experimentos de validação foram realizados com base no princípio do "Teste Cego". Todas as amostras de validação formal foram testadas simultaneamente pelos ensaios de AHG-CDC, Luminex IgG, e Luminex C1q.

8. Amostras QC para Ensaio Inter-/Intra

[00136] As amostras QC predefinidas seguir foram usadas para monitorar o método QC:

Controle positivo para o QC Inter-ensaio:

- PPS; anticorpo HLA amplamente específico diluído 1:10 em 3% de HBSA (gentilmente cedido pelo Dr. Robert Bray).

Controle positivo para o QC Intraensaio:

- Harbury; puro, com especificidade de anticorpo HLA conhecida (no soro de tipagem

caseira).

Controle Negativo para CQ Inter-ensaio:

- Um único doador do sexo masculino AB negativo, sem história de transfusão de sangue ou transplante.

[00137] Todas as amostras de CQ foram pretestadas e congeladas em pequenas alíquotas. Cada alíquota foi usada apenas para um ensaio de único lote. Para o intraensaio de QC, 10 repetições de soro Harbury foram testadas em um mesmo lote de ensaio, PPS e soro AB QC único foram testados em cada lote de ensaios para o interensaio de CQ. Três grupos de dados em três diferentes níveis de intensidade de fluorescência (representados como números relativos) foram usados para o cálculo do coeficiente de variação (CV%). Cada grupo continha cinco números de intensidade de fluorescência.

9. Recursos de Amostras

[00138] Um total de 91 amostras cegas foi usado no estudo de validação de Luminex-C1q e comparado com os resultados de CDC e/ou Luminex IgG. Todas as amostras de validação foram obtidas a partir das seguintes fontes:

1. Soro de tipagem HLA predefinida (N = 16);
2. Randomização em soros de laboratório (N = 42);
3. Soro de Randomização clínica de Wisconsin (N = 11); e
4. Soro AB do sexo masculino Randomizado (N = 22).

[00139] O teste de inibição de IVIG *in vitro* foi realizado em 30 amostras (em amostras *in vitro*), onze soros Pré-IVIG e Pós-IVIG (*in vivo*) foram coletados e testados por CDC, método LMX-C1q e LMX-IgG.

Resultados

[00140] A Formação de complexo (Ab-Ag) e fixação do complemento C1q são os eventos iniciais da cascata da via clássica e CDC. A quantidade de fixação de C1q se correlaciona diretamente com a morte celular, com a etapa terminal da cascata da via clássica e CDC. Em vez de estimar visualmente o percentual de morte celular sob um microscópio, Luminex-C1q foi designado para detectar a fixação de C1q pelos complexos HLA- (Ab-Ag) usando uma tecnologia Luminex de alta produção.

[00141] Na reação, as esferas de Luminex individualmente revestidas com antígenos HLA únicos foram incubadas com soro para permitir que o HLA-Ab (se houvesse) se ligue às esferas de Ag correspondentes e fixem o complemento C1q do soro, seguido pela adição de C1q anti-humano marcado com fluorescência (PE-antiC1q). Após uma incubação adicional, as esferas foram lavadas e a intensidade de fluorescência-PE sobre cada superfície da esfera foi medida por um aparelho tipo Luminex.

[00142] A intensidade de PE em cada esfera do antígeno HLA único representa a capacidade de fixação do complemento do complexo de HLA (Ac-Ag) correspondente; o que proporcionalmente se correlaciona com o efeito do CDC.

Otimização e Modelagem da Metodologia Luminex-C1q

Procedimento de duas Etapas versus o de única Etapa

[00143] Os procedimentos de única etapa e duas etapas, com ou sem adição extra de C1q humano foram avaliados. Os dados mostraram que o procedimento de única etapa é muito melhor do que o procedimento em duas etapas no que diz respeito ao ruído de fundo, a sensibilidade de detecção e a simplicidade do método (FIG 7).

Efeitos Diluentes da Amostra

[00144] Cinco diferentes diluentes foram avaliados em Luminex-C1q em única etapa:

- a. HBSA 3%;
- b. tampão glicina 0,2 M, pH 4,4;
- c. Glicina 0,2 M em PBS, pH 7,2;
- d. 10% de albumina humana em tampão glicina, pH 4,4, e
- e. 10% de albumina humana em tampão glicina 0,2 M / PBS, pH 7,2.

[00145] É interessante notar que quando o soro foi diluído de 1:2 em cada um dos diluentes acima, somente os diluentes com glicina aumentaram dramaticamente a fixação de C1q em soros positivos predefinidos (aumento de 2-8 vezes em comparação com os resultados de soro puro) no ensaio Luminex-C1q. O aumento da fixação de C1q por tampão de glicina pode resultar de: (a) intensificação direta de fixação de C1q e/ou (b)

intensificação de forma indireta da ligação CFAb, aumentando assim a fixação de C1q. O efeito da glicina, HBSA 3% e PBS na ligação de IgG também foi avaliado no ensaio Luminex-IgG. Em vez de aumentar a ligação de IgG, todos os diluentes diminuíram proporcionalmente a ligação de IgG. Portanto, o tampão glicina intensifica diretamente a fixação de C1q através de um mecanismo ainda desconhecido.

[00146] Com base nos resultados e consideração tanto da sensibilidade de detecção quanto da estabilidade do método, 10% de albumina humana em tampão glicina 0,2 M / PBS (pH 7,2) foi finalmente escolhido como o melhor diluente para ser usado no ensaio de inibição de IVIG por Luminex-C1q.

Fixação de C3

[00147] A fixação de C3 do complemento aos complexos HLA-Abs (Ab-Ag) também foi avaliada usando Abs anti-humano C3conjugado a PE tanto no procedimentos de única etapa quanto no de duas etapas. A fixação de C3 não foi detectável no ensaio. É possível que o PE-anti-C3 não tenha sido otimizado ou que o anticorpo em si tenha tido avidéz insuficiente. Se necessário, mais anticorpos C3 podem ser testados.

Correlação entre o CDC e-Luminex C1q

[00148] Um total de 78 soros foi testado por CDC e Luminex-C1q e os resultados obtidos foram altamente correlacionados entre si (N = 76, 97%; ver anexo "Amostras Regulares - Amostra de validação de LMX-C1q (FIG 16A-N) e amostras IVIG – Validação de LMX-C1q (FIG 17A-J)"). Usando o LMX-IgG para determinar todas os Abs de ligação presentes no soro, existiam 22 soros em que LMX-C1q identificou o Abs CF melhor do que o CDC (N = 22; 28%). Em todas as amostras testadas, o HLA, as especificidades de IgG captadas por CDC também foram positivos por Luminex-C1q. O ensaio de Luminex-C1q geralmente assimila um conjunto limitado de especificidades de CF HLA-Ab adicionais não vistas por CDC. Todos as especificidades "extras" detectadas por Luminex-C1q também foram detectadas no ensaio de Luminex IgG confirmando a maior sensibilidade do ensaio LMX-C1q. Em caso de soros com a especificidade ampla de HLA-Ab, o CDC não poderia apontar qualquer especificidade, entretanto, Luminex-C1q

foi capaz de identificar claramente as especificidades (# 2, # 21, # 36, # 37, # 40, # 42, # 64; N = 7, 9%).

[00149] Outro 5 soros (# 6, # 9, # 18, # 67, # 70; 6,4%) foram chamados de especificidade de HLA-Abs “não clara ou indefinida” por CDC, mas as especificidades claras foram apontadas por Luminex-C1q e Luminex-IgG. As especificidades não identificadas foram apontadas por CDC nas amostras # 7, # 10, # 11, # 27 e # 28 (N = 5; 6,4%) que não foram verificadas em nenhum dos ensaios Luminex (C1q ou IgG).

[00150] Quatro soros (amostras # 2, # 3, # 7 e # 10; N = 4; 5,1%) identificaram algumas especificidades no CDC, que foram negativas no Luminex-C1q. As amostras Cegas foram então testadas novamente por CDC e foram negativas na repetição confirmando os apontamentos errados por CDC. Houve um soro de paciente tratado com Rituxan em que o Luminex-C1q ainda foi capaz de identificar ambas as especificidades de classe I e II, mas nenhuma especificidade pôde ser determinada por CDC, porque todas as células B foram mortas pelo Rituxan citotóxico no soro.

[00151] Foi observado que as especificidades IgM (# 38, # 41, # 64, # 67 e # 76 na FIG 16A-N e # 7 na FIG 17A-J) detectadas no soro tratado com DTT testado por CDC também teve IgG correspondente detectado em Luminex-IgG (apenas # 38, # 41, # 64 e # 67 foram assimilados por Luminex-C1q). Isto sugere que a coexistência de aloanticorpos IgM e IgG para as mesmas especificidades de Ag podem ser um fenômeno comum *in vivo*.

[00152] As especificidades de IgM detectadas por CDC foram negativas no ensaio por Luminex-C1q (# 76 na FIG 16A-N e #7 na FIG 17A-J). [O trabalho subsequente confirmou esta observação]. O C1q pode não ser capaz de se ligar ao complexo de IgM (Ac-Ag), ou o anticorpo anti-C1q pode ficar impossibilitado de acessar C1q no complexo por causa do impedimento estérico.

[00153] Outras duas amostras aparentemente não correlacionadas (N = 2; 2,6%) foram verificadas na validação. A amostra # 13 teve A23, B57, B58 e Ab detectáveis por ambos os testes de CDC e Luminex-IgG, mas não por Luminex-C1q; A amostra # 24 teve B54, 55, 56, 61, 81 detectáveis por CDC e LMX-IgG, mas não por Luminex -C1q. (Note que B61 = erradamente apontado por CDC). Estas duas amostras duvidosas foram repetidas por “pico” com C1Q humano exógeno e a concordância completa foi

observada. Analisados em conjunto, 27% (N = 21) das amostras testadas por CDC foram amplamente apontadas ou erradamente e/ou tiveram especificidades indefinidas. Todas tiveram especificidades claras por Luminex-C1q.

[00154] Embora o Luminex-C1q detecte especificidades adicionais (também observado na LMX-IgG) em comparação com o CDC, a sua correlação de inclusão (LMX-C1q inclui todas as especificidades detectadas por CDC) foi de 100% (78/78).

Correlação entre Luminex-IgG e Luminex-C1q

[00155] Os resultados das amostras validadas mostraram que todas as especificidades HLA-Ab apontadas por Luminex-C1q foram também encontrados por Luminex-IgG. Em todas as amostras testadas, Luminex-IgG sempre definiu mais especificidades do que foram detectadas por CDC e/ou-Luminex C1q. Isto é devido à falta de detecção de Abs sem CF e de IgM, que não são detectáveis por CDC e LMX-C1q, respectivamente. É provável que Luminex-IgG assimile os não-CFabs nas amostras # 1, # 5, # 29, # 30, # 38, # 65, # 71 e # 77 (N = 8; 10%). O LMX-IgG também detectou especificidades em soros de doadores AB negativo do sexo masculino normais não sensibilizados (# 27, # 28 e # 88), que teoricamente deveria ser negativo no ensaio.

[00156] O CDC e Luminex-C1q são baseados no mesmo princípio, ou seja, a detecção de anticorpos de fixação de complemento, muito apreciado para ser clinicamente relevante na resposta imune. No entanto, o Luminex-IgG baseia-se no princípio da ligação de IgG apenas sem levar em esfera os efeitos a jusante dessa ligação. Portanto, as comparações de sensibilidade do método, enquanto informativas, não são uma base para a validação do teste, pois os testes diferem em princípio. O padrão para fazer um julgamento por um melhor sistema de ensaio é ainda claramente identificar os aloanticorpos clinicamente relevantes, que fornecem informações confiáveis para o melhor ajustamento doador / receptor, a previsão de rejeição aguda e monitoramento pós-transplante. Uma vez que o CDC foi bem comprovado em sua significância clínica, a invenção focou principalmente na comparação com o CDC no estudo de validação de Luminex-C1q; e Luminex-IgG foi usado para ser uma referência para confirmar ainda mais os resultados.

Testes de inibição de IVIG In Vitro e Testes de Paciente Tratado com IVIG In Vivo

[00157] Um total de 11 amostras de soro de pacientes foi usado no estudo da inibição de IVIG. As experiências paralelas de Luminex-C1q, CDC e/ou Luminex-IgG foram

realizadas simultaneamente. O teste de inibição da IVIG foi realizado por CDC e Luminex- C1q, mas não por Luminex-IgG, uma vez que este último não é um ensaio adequado para este propósito (ver resultados de “pico” de IVIG; FIGS 8-9).

[00158] Todos os resultados de teste de inibição de IVIG *in vitro* por Luminex-C1q se ajustaram perfeitamente aos efeitos de IVIG *in vivo* vistos nas amostras pós-IVIG, mesmo nas amostras em que IVIG causou uma inibição diferencial de certas especificidades, e não de outras (FIG 10). O acompanhamento das amostras de soros pré e pós-IVIG foram testados por Luminex-C1q em um paciente que foi tratado várias vezes com IVIG. O ensaio de inibição de IVIG *in vitro* exibiu um padrão de inibição diferencial: A24 foi inibido e A2, 68, 69 não foram inibidos. Depois que o paciente recebeu o tratamento com IVIG, as amostras de acompanhamento pós-IVIG foram levadas para o ensaio Luminex-C1q e confirmaram o mesmo padrão de inibição (FIGS. 11-13B). Na maioria dos casos, os resultados de inibição de IVIG por Luminex-C1q também se correlacionaram com, ou foram melhores do que, os resultados do teste de inibição de IVIG por CDC.

[00159] Os dados de validação obtidos a partir do grupo de estudo de IVIG demonstraram claramente as vantagens de Luminex-C1q em comparação com o CDC e Luminex- IgG (FIG 16A-N e FIG 17A-J).

Discussões

[00160] A correta identificação dos aloanticorpos HLA prejudiciais / clinicamente relevantes existentes no soro de um receptor de enxerto (potencial) é uma etapa crítica antes do transplante. É geralmente bem aceito no campo do transplante que os aloanticorpos citotóxicos (CFAbs) podem causar uma rejeição hiperaguda.

[00161] Existem duas grandes categorias de anticorpos HLA (HLA-Ab), que poderiam existir em um soro do receptor com base em suas características de fixação do complemento, por exemplo, CFAbs e não-CFAbs. Só os CFAbs são conhecidos por serem prejudiciais e clinicamente relevantes, mas a real função imunológica dos não-CFAbs não é clara. Os estudos de prova cruzada de fluxo sugerem que alguns anticorpos de ligação são irrelevantes e alguns são prejudiciais. Nenhuma distinção no fluxo foi feita com relação à capacidade de ligar o complemento. Alguns Abs sem-CF podem, na verdade, ser anticorpos benéficos e desempenham um papel importante na manutenção da imuno homeostase normal. Os dados de estudo de IVIG não publicados sugerem que

existem alguns IgGs naturalmente no soro humano normal que podem se ligar especificamente aos HLA-Ags. Em vez de ativar a cascata do CDC para matar as células, eles exercem um efeito protetor e inibem os efeitos de CDC resultantes dos aloanticorpos HLA citotóxicos. O mecanismo ainda está sob investigação. É muito importante diferenciar os dois tipos de anticorpos na prática de transplantes.

[00162] O Complemento C1q é um componente-chave da via clássica do complemento e atua como a primeira molécula de reconhecimento que interage com complexos de antígeno-anticorpo para ativar a cascata do complemento. A ligação de C1 a anticorpo é via C1q e o C1q deve reticular pelo menos duas moléculas de anticorpos antes que sejam firmemente fixadas. O complexo do complemento 1 (C1) composto por três proteínas distintas C1q, C1r e C1s é etapa chave de ativação inicial da via clássica do complemento e desempenha um papel importante na iniciação do processo inflamatório. O complemento C1q é uma molécula de proteína muito estável com uma concentração sérica alta (150 ug/ml). No presente estudo, o mais antigo soro testado foi congelado em 1976 e ainda tinha boa atividade de ligação a C1q. Teoricamente, a detecção de fixação de C1q por aloanticorpos HLA é superior ao uso de outros elementos do complemento a jusante posteriores na cascata da via clássica. O método permite que se saiba que o doador da triagem pode fixar o complemento a complexos de antígeno-anticorpo particulares, dando uma estimativa do risco para ativar as etapas sequenciais da cascata do pós-transplante. No presente método de Luminex-C1q proposto, os dados de desenvolvimento e validação forneceram fortes evidências para a justificativa deste projeto de ensaio.

[00163] Durante o desenvolvimento e otimização da metodologia de Luminex-C1q, diversos projetos experimentais para o procedimento foram avaliados, incluindo o de única etapa, em duas etapas (com e sem adição de C1q humano adicional), tratamento do soro com DTT, e diferentes diluentes. Com base na sensibilidade do método, estabilidade, precisão e simplicidade, um procedimento de única etapa otimizado foi determinado e usado na validação do estudo. Para o ensaio de inibição de IVIG *in vitro* por Luminex-C1q, 10% de albumina humana em Glicina 0,2 M / tampão PBS (pH: 7,4) foi usado como diluente da amostra de controle para controlar o efeito de diluição.

[00164] Este novo Luminex-C1q desenvolvido combina perfeitamente as características de ambos os testes de CDC e Luminex-IgG e, ao mesmo tempo, elimina as principais desvantagens que existem nestes dois ensaios. Por um lado, diferente de LMX-IgG, mas

como CDC, este teste detecta diretamente CFAbs para dar um resultado de teste funcional superior ao CDC através de um sistema de ligação em fase sólida, livre de células. Uma vez que, além disso, tem alta sensibilidade, o Luminex-C1q é capaz de assimilar o baixo nível de anticorpos citotóxicos perdidos por CDC. Por outro lado, como LMX-IgG, mas diferente de CDC, o Luminex-C1q pode facilmente identificar simultaneamente, cerca de 100 diferentes HLA-Abs em uma única reação, devido ao uso do sistema de detecção multiplex de alta produção por Luminex.

[00165] O LMX-C1q realmente pode excluir resultados falso-positivos de Abs não citotóxicos que são frequentemente apontados por Luminex-IgG. Uma vez que o ensaio Luminex-C1q detecta apenas CFabs e não tem interferência de IVIG (isto é, IgG sem CF existente no soro de um paciente tratado com IVIG.), o LMX-C1q pode ser confiavelmente usado para o teste de inibição de IVIG *in vitro*. O ensaio de Luminex-C1q provou a sua confiabilidade na previsão e monitoramento da eficácia de IVIG *in vivo*. (FIG 17A-J e FIGS 10-15). Ao analisar e comparar os resultados dos três métodos, os seguintes padrões foram encontrados e são coerentes com os princípios teóricos de cada sistema de teste:

1. Qualquer especificidade (exceto um, devido à IgM) apontada por CDC é incluída no Luminex-C1q, se não, então o CDC foi interpretado incorretamente e/ou devido à anticorpos não-HLA;
2. Qualquer especificidade apontada por Luminex-C1q também será incluída nas especificidades detectadas por Luminex-IgG, mas não necessariamente por CDC, e
3. Se o Luminex-IgG for negativo, então o Luminex-C1q será negativo e o soro tratado com DTT em CDC também será negativo.

EXEMPLO 2

Ensaio de HLA C1q Diretamente Marcado

[00166] A seguir é fornecido um método exemplar de triagem do soro humano para identificar anticorpos de fixação de complemento HLA (HLA-CFAB) usando a Tecnologia multiplex Luminex / de esfera de antígeno único. No entanto, estes métodos podem ser realizados usando qualquer um dentre citometria de fluxo ou sistema ELISA para identificar qualquer tipo de anticorpos de fixação de complemento com qualquer multiplex ou sistema de antígeno único.

[00167] Os soros serem testados foram incubados com esferas Luminex (LMX) revestidas com o antígeno HLA único, como a mistura de esferas de antígenos únicos tipo LABScreen de classe I e LABScreen de classe II (One Lambda, Canoga Park, CA) e C1q marcado com biotina. O soro A foi conhecido por ter a capacidade de fixação do complemento por citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e por ensaio de C1q indireto (anti-C1q). Há um conjunto limitado de especificidades dos anticorpos HLA. O Soro B foi um soro de controle positivo conhecido por ter a capacidade de fixação do complementar por CDC e ensaio de C1q indiretos (anti-C1q). Há um conjunto muito amplo de especificidades dos anticorpos HLA. O controle negativo foi um soro AB negativo de paciente do sexo masculino não transfundido (tipo do grupo sanguíneo ABO / Rh) que foi conhecido por não fixar o complemento em qualquer ensaio. Todos os soros foram desativados por calor para a "descomplementação" antes do teste.

[00168] Como exemplificado na FIG 18, os anticorpos HLA no soro de teste (1) se ligam aos antígenos HLA nas esferas correspondentes e (2) C1q (Bio-C1q) marcado com biotina fixa a HLA-CFAB ligado (3) forma um complexo de HLA-CFAB/Ag/Bio-hC1q. A estreptavidina conjugada a R-ficoeritrina (SA-PE) presente na reação, então se ligou ao Bio-hC1q do complexo. Após lavagens com tampão de lavagem LABScreen, as esferas foram adquiridas em uma máquina Luminex. A intensidade de PE em cada esfera de antígeno HLA único representou a capacidade de fixação do complemento do complexo HLA-Ab/Ag correspondente, que proporcionalmente se correlacionou com o efeito da citotoxicidade dependente do complemento (CDC) dos anticorpos.

[00169] O padrão de reação do soro de teste foi então comparado com a planilha de matriz do antígeno associado com a mistura de esferas de antígeno usada no ensaio, e o programa de análise que acompanha forneceu dados para o cálculo de anticorpos reativos ao painel (CPRA) e definição da especificidade do anticorpo anti-HLA com fixação de complemento.

[00170] A especificidade da detecção de HLA usando o C1q marcado diretamente no ensaio de LMX-C1q foi comparada com a especificidade da realização do ensaio de LMX-C1q usando o C1q marcado indiretamente (anticorpo anti-C1q), conforme descrito nos exemplos anteriores. Como mostrado na FIG 19A, a detecção com o C1q diretamente marcado resultou em um aumento do número de verdadeiros positivos. A FIG 19B exhibe um subconjunto de soro B, que incluiu apenas os anticorpos positivos detectados pelo C1q marcado diretamente e este subconjunto é organizado por força das

reações de C1q indiretamente marcadas. O eixo *X*, em cada caso representa as especificidades das esferas de antígeno único (isto é, cada barra é um antígeno único diferente de todas as outras barras). O eixo *Y* representa a IMF (intensidade média de fluorescência) e é uma indicação da força da reação.

[00171] O ensaio de inibição de IVIG *in vitro* foi também realizado com esse método para demonstrar a correlação e reprodutibilidade da realização do ensaio com o anticorpo anti-C1q (FIG 20A) e C1q diretamente marcado (FIG 20B). O ensaio de IVIG foi realizado como descrito acima. Como mostrado na FIG 20B, o C1q diretamente marcado foi igualmente eficaz como o anticorpo anti-C1q no ensaio de inibição de IVIG. No entanto, os ensaios realizados com C1q diretamente marcado foram mais sensíveis que os ensaios realizados com o método anti-C1q.

[00172] Os resultados acima demonstraram com sucesso que este ensaio recentemente desenvolvido é um método simples, confiável, sensível, objetivo, específico, com alta produção de aloanticorpo HLA multiplex. Esse método será um substituto para os ensaios de CDC clássicos. O princípio deste ensaio pode ser uma plataforma técnica universal para ser usada para qualquer detecção de anticorpos citotóxicos.

[00173] O exposto anteriormente meramente ilustra os princípios da invenção. Será apreciado que aqueles versados na técnica serão capazes de elaborar diferentes arranjos que, embora não explicitamente descritos ou mostrados aqui, incorporam os princípios da invenção e estão incluídos dentro de seu espírito e escopo. Além disso, todos os exemplos e linguagens condicionais recitados aqui são principalmente destinados a auxiliar o leitor na compreensão dos princípios da invenção e dos conceitos contribuídos pelos inventores para a promoção da arte, e devem ser interpretados como sendo sem limitações a tais exemplos e condições especificamente recitados. Além disso, todas as afirmações, princípios aqui recitados, aspectos e modalidades da invenção, bem como exemplos específicos da mesma, se destinam a abranger tanto equivalentes estruturais quanto funcionais da mesma. Além disso, pretende-se que tais equivalentes incluam tanto os equivalentes atualmente conhecidos quanto os equivalentes desenvolvidos no futuro, ou seja, quaisquer elementos desenvolvidos que desempenhem a mesma função, independentemente da estrutura. O escopo da presente invenção, portanto, não se destina a limitar-se às modalidades exemplares mostradas e descritas aqui. Pelo contrário, o escopo e o espírito da presente invenção são incorporados pelas reivindicações apensas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento, em uma amostra biológica de um sujeito, que se ligam especificamente a antígenos leucocitários humanos (HLAs) de interesse, **caracterizado** pelo fato de que
5 compreende:

(a) incubar uma amostra biológica de um sujeito com uma coleção de micropartículas de diferentes subtipos e fator de complemento C1q, em que cada micropartícula é revestida com um subtipo de HLA diferente purificado, em que o subtipo de HLA diferente purificado é derivado de uma população de células que apresenta o subtipo HLA, e em que a incubação é por
10 um tempo suficiente para permitir que os anticorpos de fixação de complemento anti-HLA na amostra biológica se liguem aos HLAs e permitir que o fator de complemento C1q se ligue aos anticorpos de fixação de complemento anti-HLA na amostra biológica;

(b) sem lavar, incubar as micropartículas com um anticorpo marcado de forma detectável capaz de se ligar especificamente ao fator de complemento C1q ligado aos anticorpos de fixação
15 de complemento anti-HLA ligados aos HLAs, e

(c) detectar a presença ou ausência do anticorpo marcado de forma detectável ligado ao fator de complemento C1q para determinar a presença ou ausência de anticorpos de fixação de complemento.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o fator de
20 complemento C1q é um fator de complemento autólogo C1q.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o fator de complemento C1q é um fator de complemento exógeno C1q.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o fator de complemento C1q é uma combinação do fator de complemento autólogo C1q e do fator de
25 complemento exógeno C1q.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a micropartícula é uma esfera de poliestireno.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a micropartícula é uma esfera de látex.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a micropartícula é uma esfera magnética.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a amostra biológica é soro, sangue, saliva, plasma ou urina.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a marcação é um fluorocromo, um cromóforo, uma enzima, uma molécula ligante, uma molécula de biotina, um doador de elétrons, um receptor de elétrons, um corante, um metal ou um radionuclídeo.

5 10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a micropartícula é uma esfera de agarose.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a detecção é por citometria de fluxo.

10 12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a amostra biológica de um indivíduo e a coleção de micropartículas são incubados em temperatura ambiente.

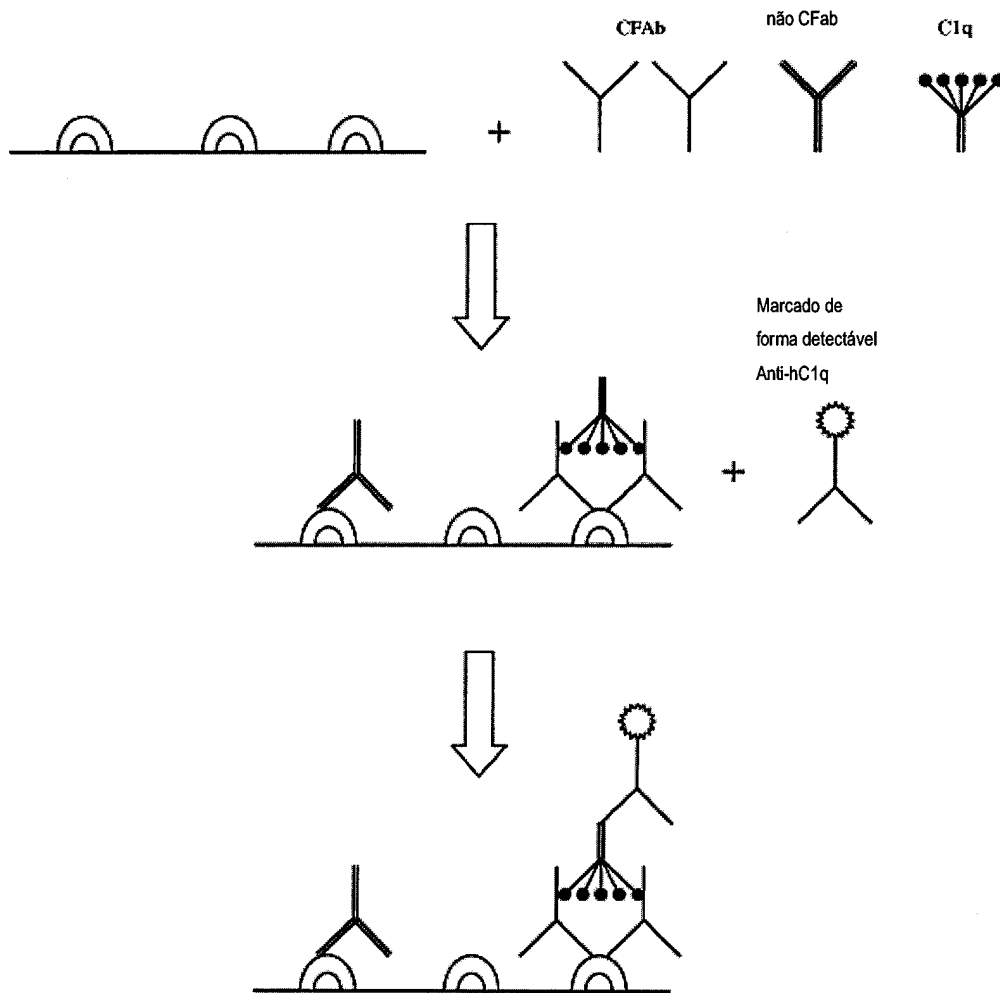


FIG 1

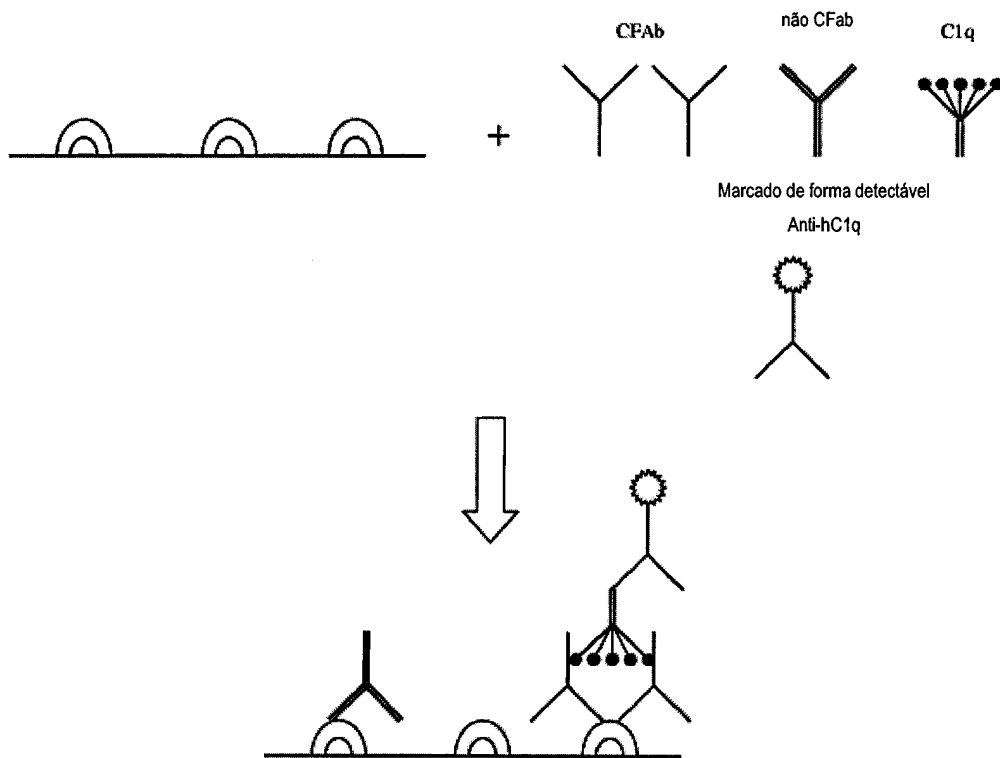


FIG 2

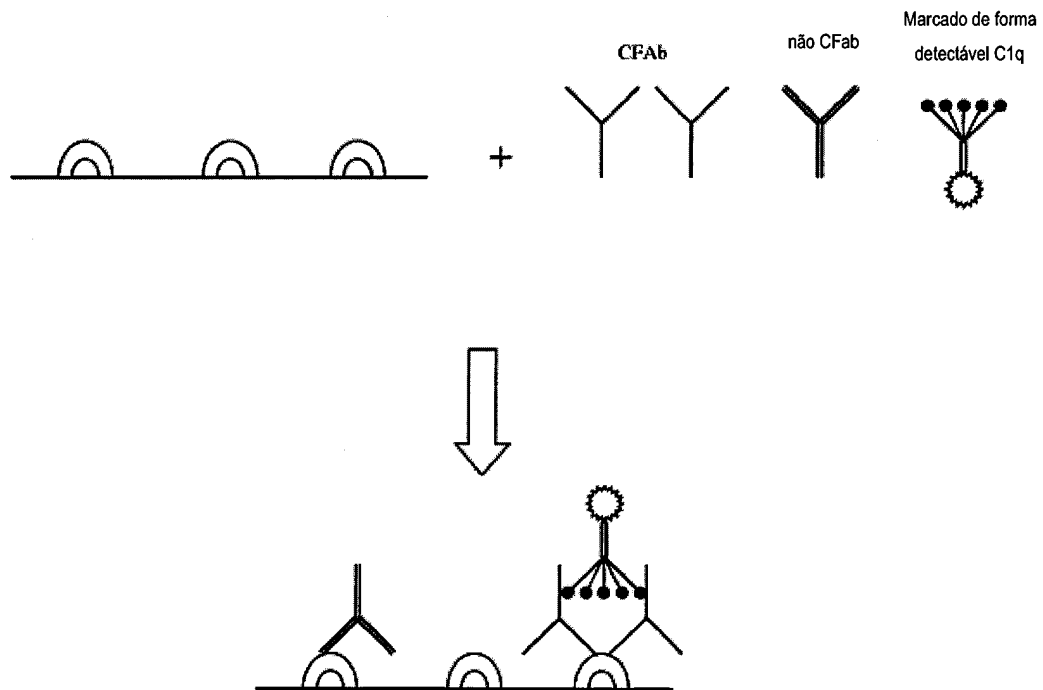


FIG 3

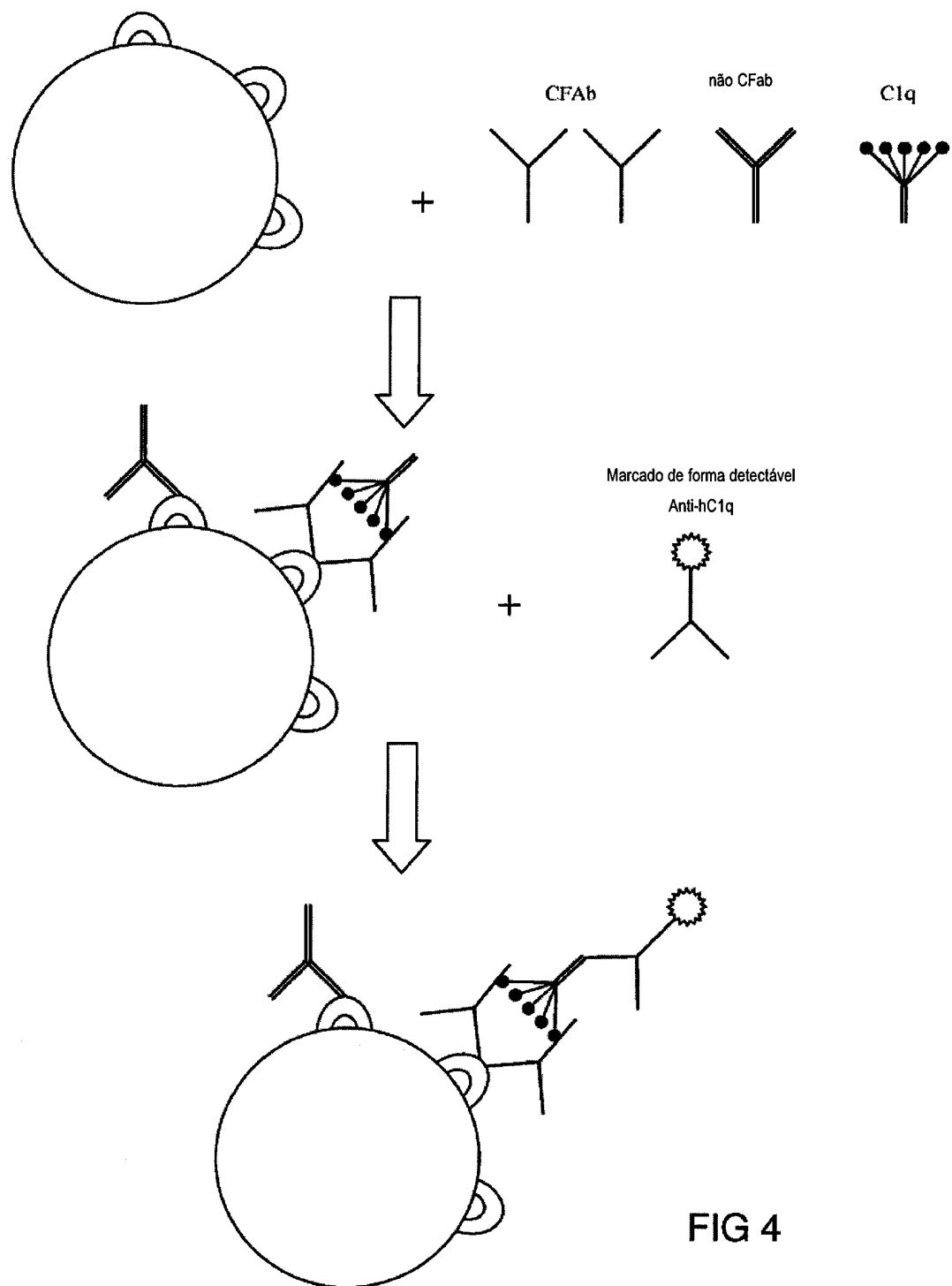
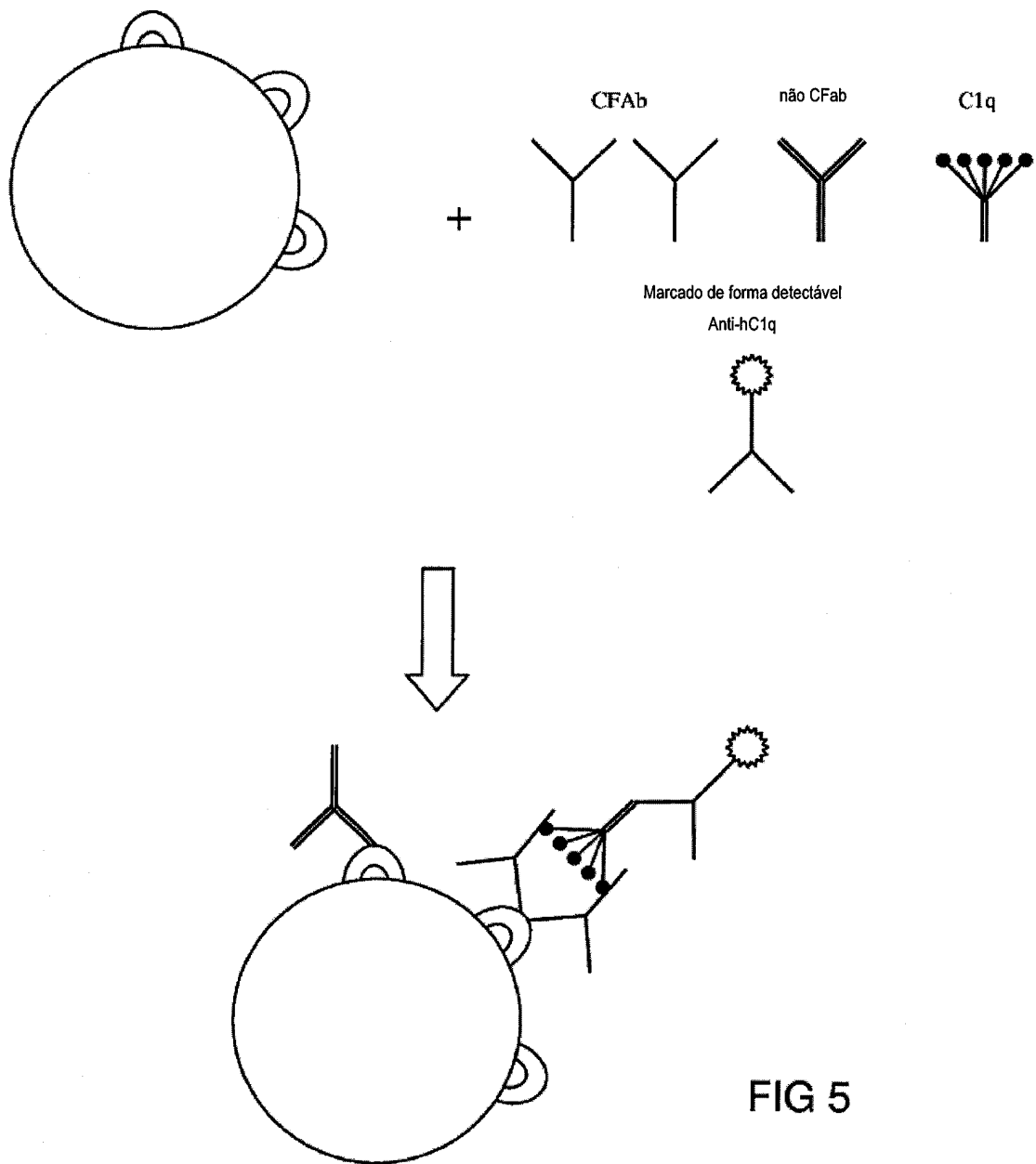


FIG 4



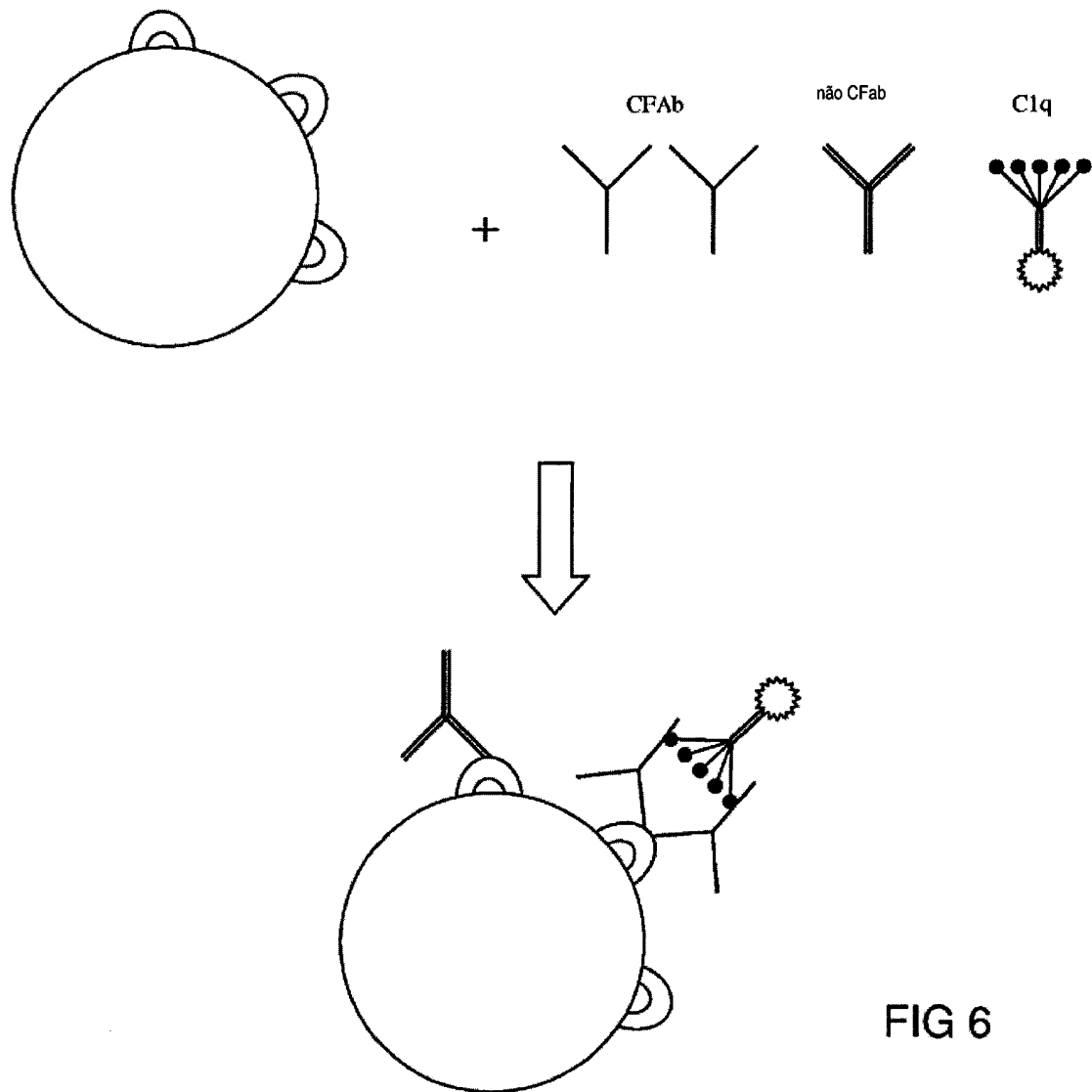


FIG 6

COMPARAÇÃO DE LUMINEX-C1q DE UMA E DUAS ETAPAS
Observado/Esperado

SORO	Chamado HLA-Abs	
	DUAS ETAPAS	UMA ETAPA
POSITIVO	47/50	50/50
B8,59	0/2	2/2

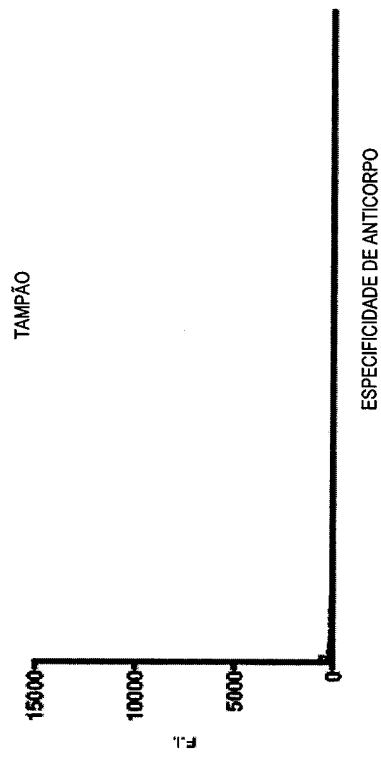
FIG 7

Luminex-IgG

ENSAIO DE PICO DE IV-Ig (ABO01878)

ABGR01878- 5%A/G/PBS

ABGR01878(+5%IVIG)



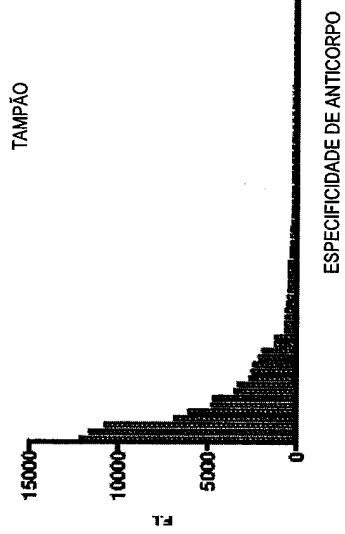
CONTROLE NEGATIVO

FIG 8

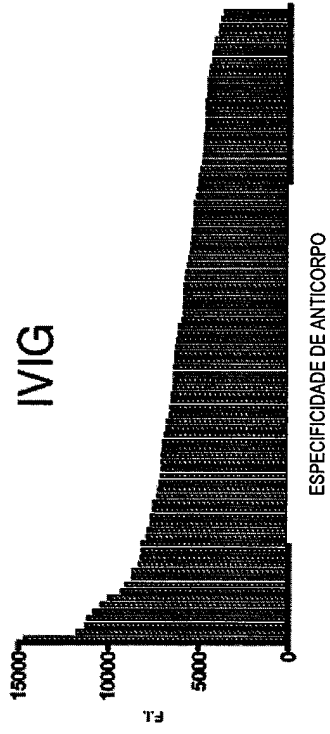
Luminex-IgG

ENSAIO DE PICO DE IV-Ig (RINS PEDIÁTRICO #2)

8/2/07 (5%A/G/PBS)



8/2/07 (+5%IVIG)

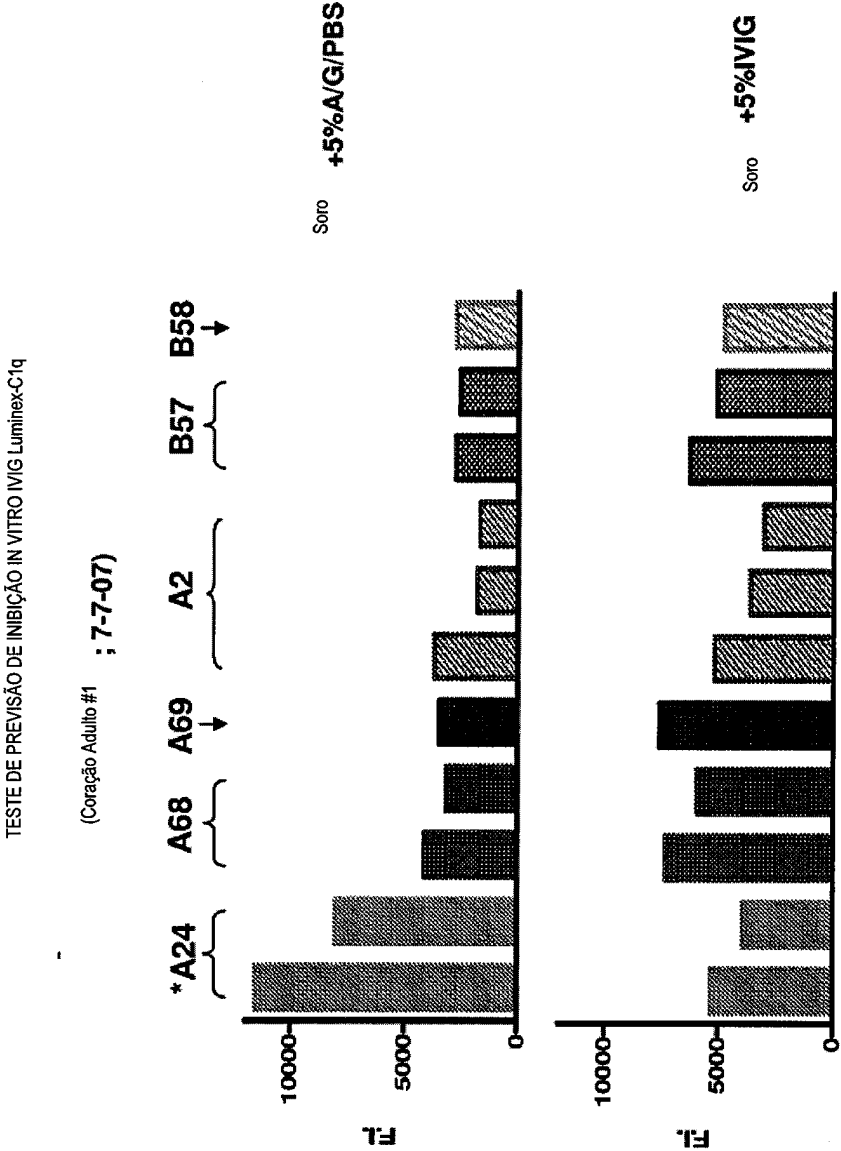


SORO DE PACIENTE

FIG 9

FIG. 10

SUMÁRIO DE ENSAIO DE INIBIÇÃO CDC/LUMINEXC1q IVIG										* Inibição Diferencial		
N.º	AMOSTRA	CDC		Correlação in vitro/in vivo	Luminex-C1q		Correlação in vitro/in vivo					
		Previsão Pre IVIG	Pós IV IG		Previsão Pre IVIG	Pós IV IG						
1		Não claro	Inibição	?	Inibição	Inibição						Sim
2		negativo	ND	ND	C-II Inibição	C-II Inibição						Sim
3		c/ Rituxina C II não claro	C-I Inibição	Sim	Inibição	Inibição						Sim
4		Não claro	C-I Inibição	ND	Inibição	Inibição						Sim
5		negativo	ND	ND	Negativo	ND						Sim
6		D. inibição	D Inibição	Sim	D Inibição	D Inibição						Sim
7		negativo	ND	ND	Inibição	Inibição						Sim
8		* C I negativo C II Inibição	C-II Inibição?	Sim	Inibição	Inibição						Sim
9		IgM-Abs	ND	ND	Inibição	Inibição						Sim
10		IgM-Abs indefinido	Negativo	ND	Sem inibição	Sem inibição						Sim
11		Reatividade não específica	ND	ND	Negativo	Negativo						Sim
12		C I Negativo C II Fraco Rx	ND	ND	Inibição	Inibição						Sim
13		ND	ND	ND	Inibição	Inibição						Sim
14		M. Inibição	INIBIÇÃO	Sim	Sem inibição	Sem inibição						Sim



CDC: Soro de 07-07-07 mostrou que apenas A2, A68, A69; ivig não inibe A2, mas A68 e A69.
Soro de 07-22-07 mostrou que A2 não foi inibido, A68 se perdeu e A69 não foi inibido.
* A24: Anticorpo Específico do Doador (DAS)

FIG 11

MONITORAMENTO IN VIVO DE TRATAMENTO IVIG

Luminex-C1q-DSA

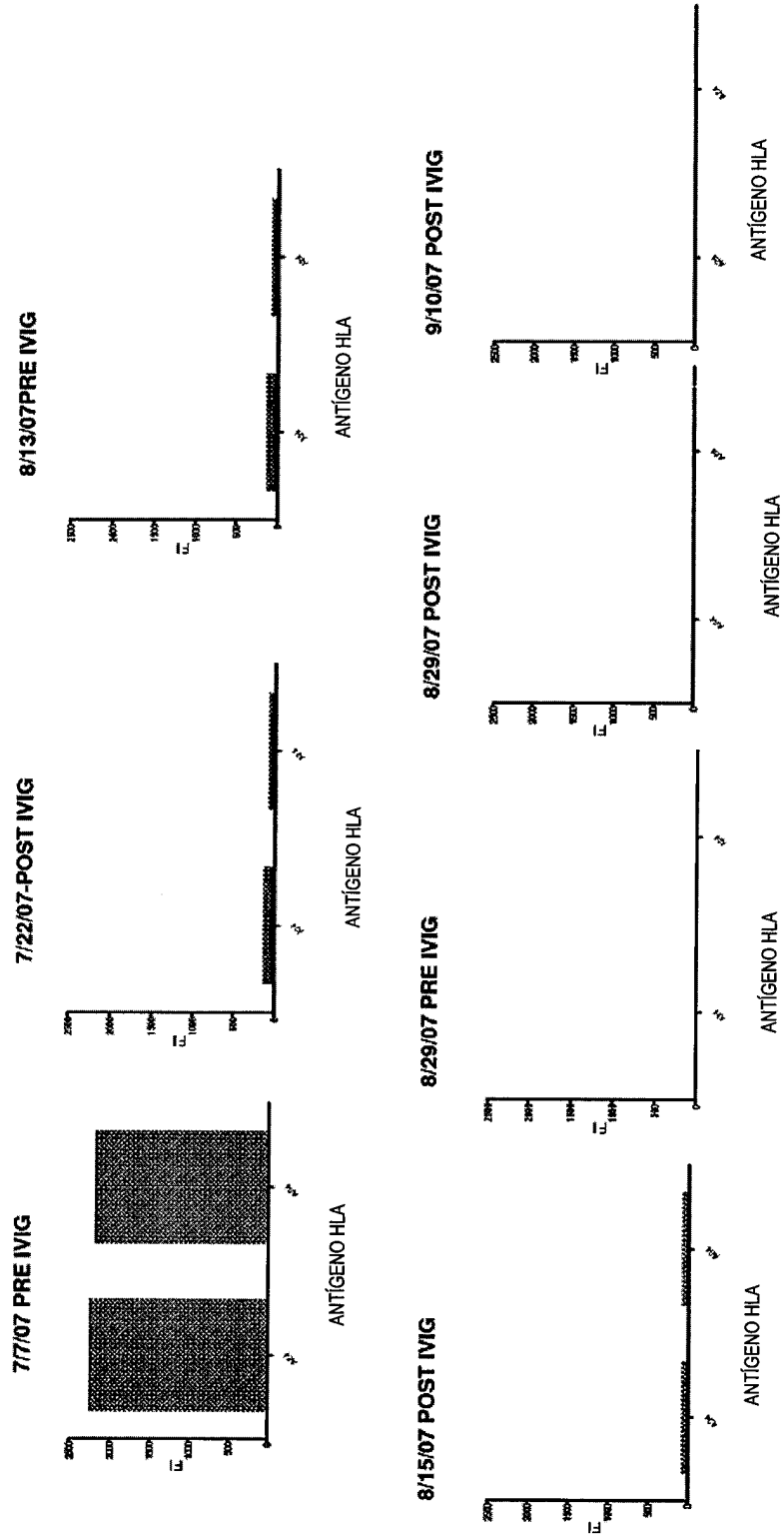


FIG 12A

MONITORAMENTO IN VIVO DE TRATAMENTO IVIG

Luminex-IgG-DSA

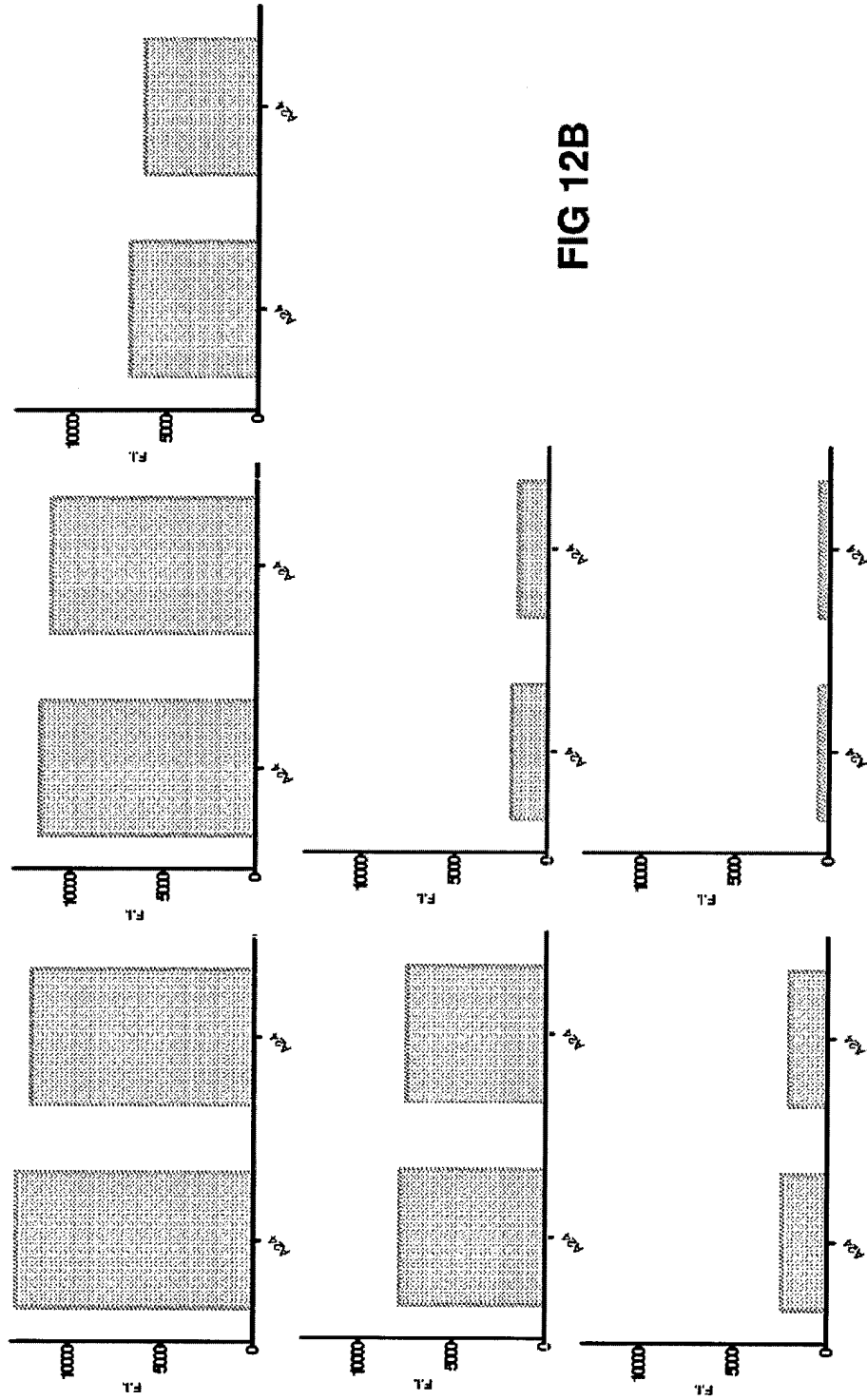


FIG 12B

MONITORAMENTO IN VIVO DE TRATAMENTO IVIG

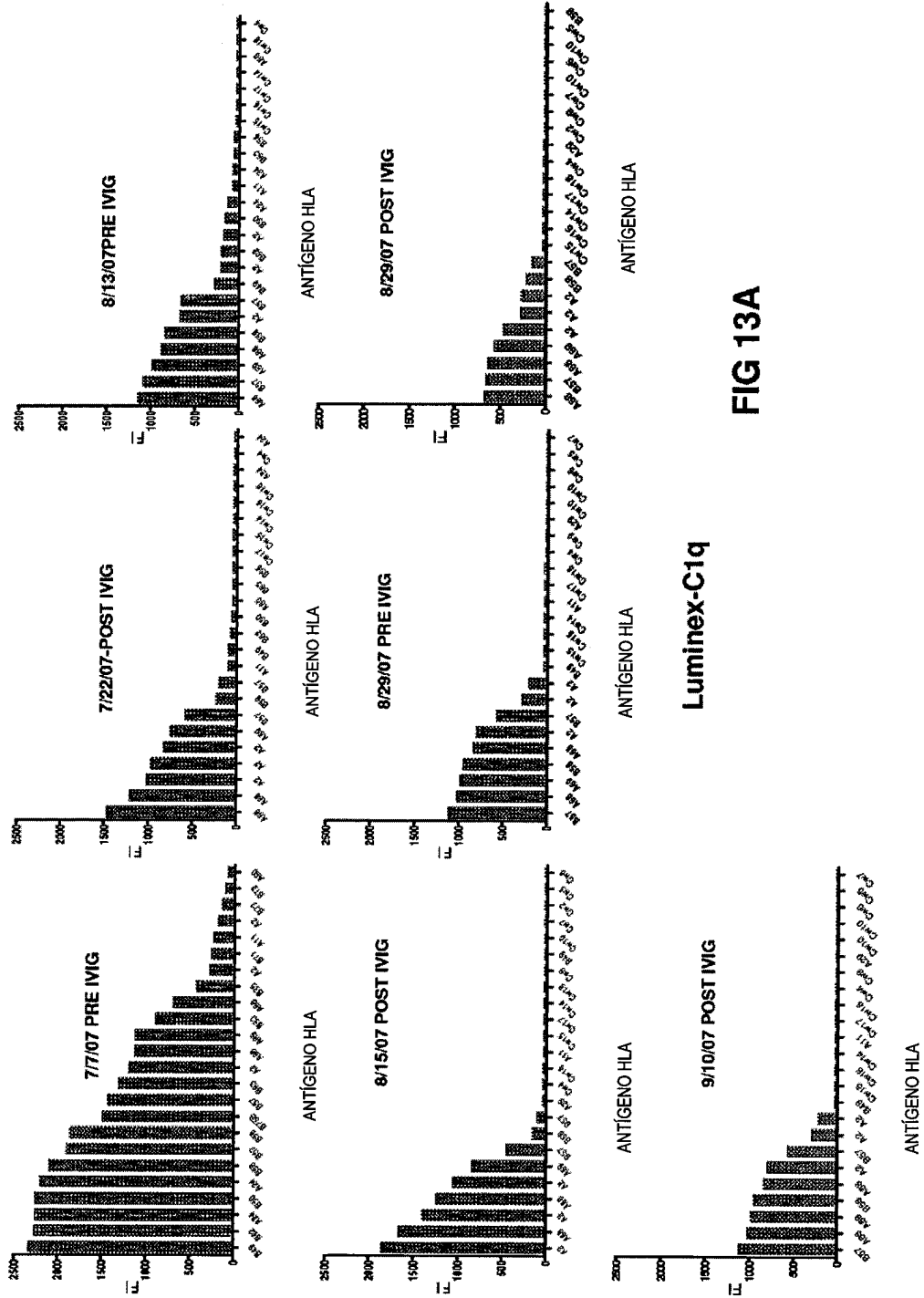


FIG 13A

Luminex-C1q

MONITORAMENTO IN VIVO DE TRATAMENTO IVIG

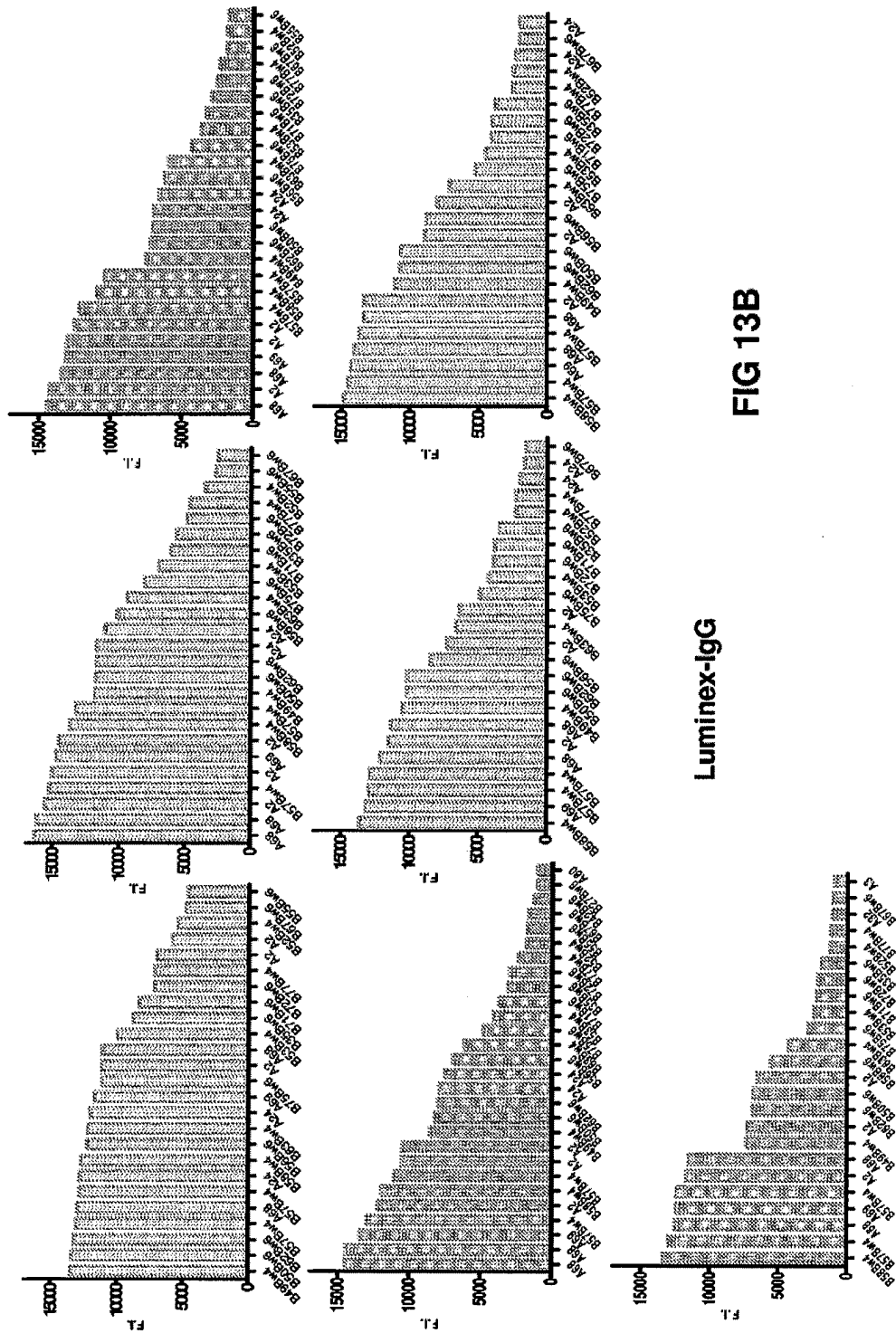
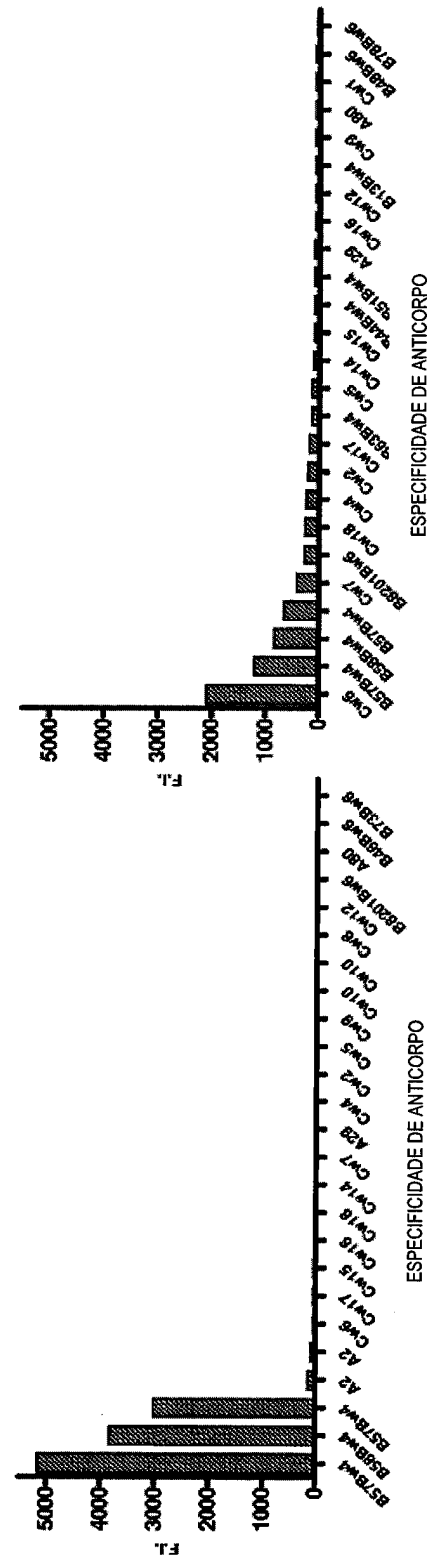


FIG 13B

Luminex-IgG

ENSAIO DE PICO DE IV-IG (RINS PEDIÁTRICO #2)

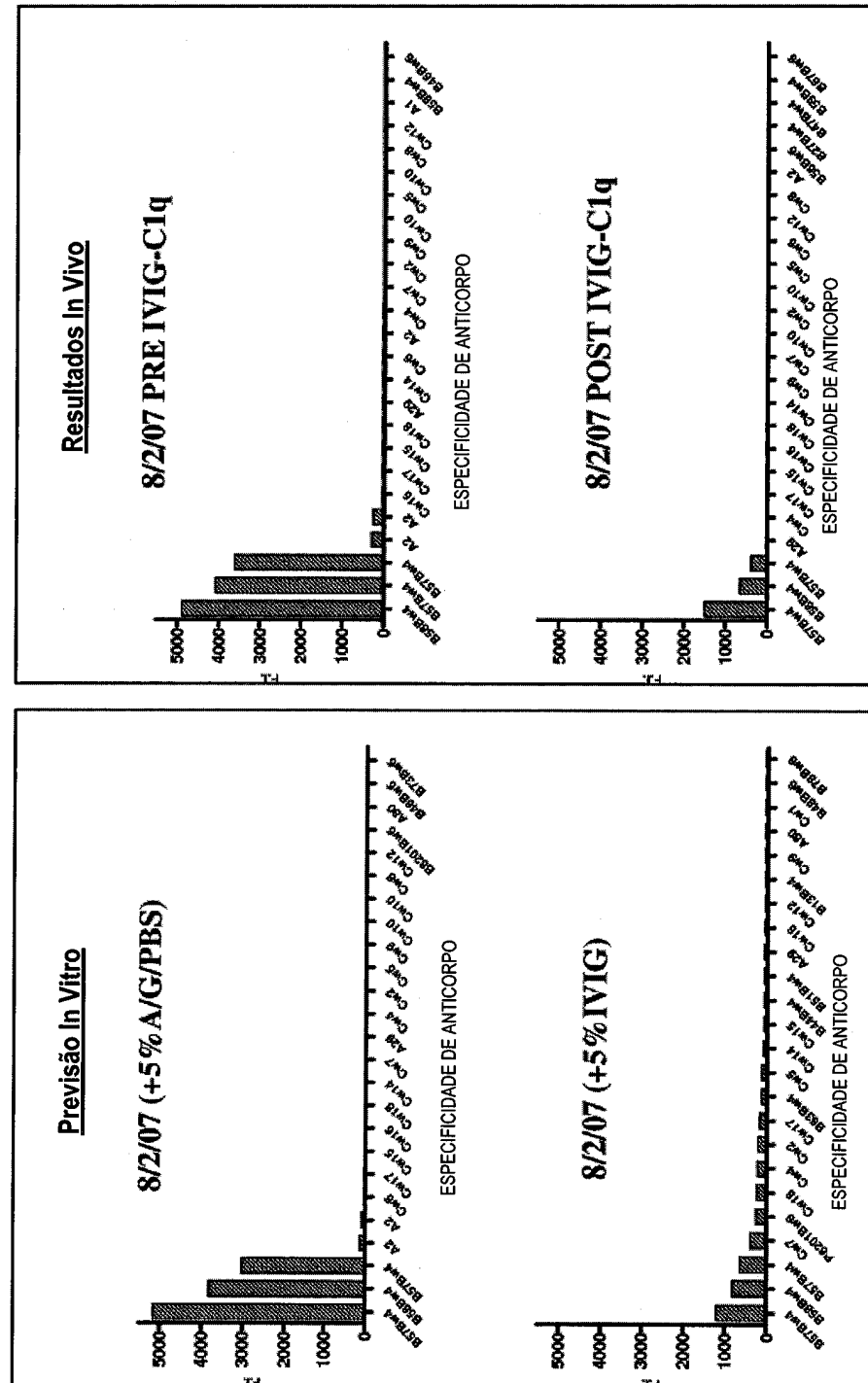
8/2/07+5%IVIG



* CDC não pode chamar as especificidades por causa do tratamento com

FIG 14

TESTE DE INIBIÇÃO IVIG Luminex-C1q
(RINS PEDIÁTRICO #2)



Resultados de Experimento de Validação Luminex-C1Q

PACIENTE N.º	PRA-CDC	PRA-IgG	CDC	LUMINEX-C1q		LUMINEX-IgG
				LIMPO	1:2	
1		CI-20 CII-45	NEG.	DQ7	mesmo	B53,63,51,52,78,49,54 DR51,16 DQ4,7.
2	CI-91	CI-89 CII-89	A1,9,10,11,32 BW4 RPT AMPLO	A24,32,23,25,11,66 BW4, B76,45,82 DR4,53. DQ7,8,9,DP	mesmo	A1,9,10,11,32,80 BW4,12,4005,56,76,82 AMPLO
3	CI-29 CII-0	CI-54 CII-0	B7,27,42,54 (Test date?) RPT-negativo 10/25/07	NEGATIVO	mesmo	B7,27,22,42,51,54,55, 56,67,73,75,78,81,82. A24,CW1,14.
4	CI-49 CII-81	CI-68 CII-96	A2 DR1,4,8,13,DQ7,8,9.	A2, wk68 DR1,4,wk11,DQ7	mesmo DR11.	A2,68,69,B15,18,57,62,63 75,76,77. DR1,0103,2,4,8,9,10,11,12 13,14,15,16,51,DQ4,5,6,7, 8,9.
5	CI-0 CII-0	CI-58 CII-7	CI-NEGATIVO MATOU TODAS AS CÉLULAS B	NEGATIVO	mesmo	B12,13,21,37,40,41,42, 44,45,47,48,49,50,52,60 61,62,72,75,76,77,DQ8.
6		CI-67 CII-59	ESPEC. NÃO CLARAS	B57,58 DQ7,8,9.	mesmo	A1,2,36, B57,58 DQ7,8,9.
7	CI-49 CII-20	CI-55 CII-39	A2, DR7 RPT-negativo	NEGATIVO	mesmo	A2,B57,58. DR1,7,9,10.
8	CI-62	CI-71 CII-14	B5,12,15,17,18,21, 35,70,78 RPT-B5,49,-10/25/07 CII- NEG.	A30, wk25,B5,15,17, 21,35,53,56. CII- NEG.	B78 intensificado	A2,9,25,28,30,32, BW4 B50,78,62,56,75,35,71,72, 45,46,18,64,54,76,CW6,17, 10,18,9,2,16,14,1,4,5,15 DR7,12,9,53 DQ4,9.

FIG 16A

9	CI-100	CI-100	A29,66 B7,27 42,55, 60,61,73. CII não pode dizer	A29,30,66,74,33,34,31 32,23,43,26 B76,27,7, 12,47,60,61,73,81,82, 13,55,56,42,67. DR7,53,1,4,9,DQ2,7,8, DQ9	mesmo	AMPLO
10	CI-30	CI-31 CII-99	A25,26,30,31,32,68 RPT Negativo	NEGATIVO DUAS VEZES Sem. DQ5,6	mesmo	A10,29,31,32,34,43,66 B46,63,75 DQ4,5,6,7,8,9.
11	CI-0 CII-68	CI-1 CII-86	DR4,17,DQ7,8,9 Rpt-1/16/08MM DR4	CW17,18,5,15,2,6 DR4	mesmo	CW5,2,6,15,17,18 DR4,15,16,11,13,17 DQ7,8,9.
12	CI-84	CI-78 CII-74	B5,15,18,35,53,70	B53,51,35,75,18,78 NT (não suficiente)		A28,33, B5,14,18,35,53, 75,78. DR3,6,9.
13	CI-56	CI-84 CII-71	A2,68,69,23,24 B57,58 CII-NEG (sem soro) A23,B57,B58 em 9/8/07 Mas não em 10/8/07	A2,24,68,69 CII-NT	Mesmo + B57,58	A2,23,24,68,69 B8,12,57,58,37,41,42,45 DR1,9,10,103,51 DQ4,5,6
14	CI-0 CII-63	CI-0 CII-63	DQ1,5,6	DQ1,5,6	mesmo	DR1,4,103 DQ1,5,6,2,8.
15	CI-46 CII-43	CI-98 CII-79	A23,24, B44,57	A23,24,32,25, B45,76, 57,58,75,53,82,44,62 63 DR8,11,13,17 DQ2.		A1,2,23,24,25,28,32,33 B8,14,18,35,39,45,67,62,73 75,76,78,82, BW4 DR3,5,6,7,8,9,11,12,13,14 17,18, DQ2
16	CI-21 CII-0	CI-76 CII-0	A23,24,25,32,Bw4	A23,24,25,32, Bw4	mesmo	A23,24,25,30,32, B50,62,BW4.
17	CI-84	CI-88 CII-34	A2,28 B17,35,49,50 53,62,63,71,72.	A2,68,69,24,B49,56,63 B57,58,49,62,50,75,71 CW10,12,15	mesmo +	A2,9,11,28, B17,21,35,49 50,53,56,63,70,75,77,62.

FIG 16B

and

and

26				NEG		NEG	NT		NEG
27				A24,25,26,32,66,74		NEG	NT		A30.
28				A1,2,3,11,29,32,68 ?34,?74.		NEG	NT		DR4
29				CI NT (sem soro)		CI NEG.	mesmo		A10,28,29,30,33, 34,43,66 B16,42, 55,67. DR1,4,10,103,DQ5
30				CI NT (sem soro) DR15.		CI NEG. DR15,16.	mesmo		B7,81 DR 15,16.
31				B8		B8,63. CI-I-Negativo	mesmo		B8,B18,B14,B37,B59, B46,B42,B54,A33,A34 ?DQ2.
32				B51,52,59.		A25,32. B51,63,49,57,53,78,7, 58,67,52,38,77,18, 59,8201,42,13,39,56,8 DQ7,8,9.	mesmo + A2, B81		A25,A32,A9,A33,A30,A1, B51,B63,B17,B49,B78,B53, B5,18,77,67,59,16,8201,13, 42,14,35,7,8,22,75,81,40,73 46,80.
33				BW4 XTRA RXNS		A32,66,34,26,68,25,43 24,23,29,66,69,11,33, 2,31,30 BW4,CW7,17. DR53,1,4,DQ7,8,9.	mesmo		A25,A9,A32,A10,A28,11,19,2 BW4,B73,B67,B39 CW7,CW17 DQ3,DR53,DR4,DR1,DR103 DQ8,2,4,DR10,11,7,51,9,6,8, DR2 DP17.
34				B57 fraco		A2,11,80,1,69,29,25,3 24,30,36,66,23,43,68, 26 B57,58,63,73. CW6,17,16,7,9,2,15, 14,10 DQ6,7	mesmo + mais espec. bec.de mais		Alto BG

FIG 16D

35			A30,31,B13	A30,31 B13,75,62,76. Mesmo + B47 Mesmo + DP9	A30,31,25,34,32,29,66,33,74 26,43. B13,62,75,76,47,49, 45,50,63,77,57,44,60,61,41,46. DR7,9,12,11,4,17,13,53,52 DQ2,9,4,7 DP17,3,10,1,5,19 14,2,9,13,11,4.
36	CI-98	CI-99 CII-83	IgG AMPLO	A1,2,3,11,25,26,29,30, 31,33,34,43,66,68,69 74,80,B7,8,13,18,27, 35,41,44,45,47,48,49, 50,51,53,56,57,58,60 61,62,63,67,73,76,78 81,8201 CII-NT	NT AMPLO CI CII-DR1,13,17,14,8,18,52 DQ2,5,6,7,4,DP10,17,3,2,14, 9,4.
37	CI-76	CI-99 CII-75	IgG AMPLO	A29,B18,27,35,44,45, 49,50,56,62,71,75,76, 78,8201,67. CII-NT	NT A2,9,29,30,31,33,34,43,66, 68,69,74,BW6,49,44,63,52, 47,13,51,27. DQ5,6,4,8.
38	CI-62	CI-98 CII-96	IgM-A2,68,69 IgG-wk68	A2,25,26,33,34,68,69 B64 CII-NT	NT A2,11,25,26,29,30,31,32, 33,34,36,43,66,68,69,74 B7,8,13,18,27,42,47,48,49 51,55,60,61,63,64,65 73,81,CW7,17. DR7,17,11,18,13,8,14,12,16. DQ2,7,4,9,4,5 DP3,19,1,17,5, 13,11,10,14,9,4.
39	CI-72	CI-98 CII-80	A2,3,11,36,68. RPT-A2,3,11,36 B1,7,2 A36 errado chamado!	A2,3,11,68,69 B57,58 CII-NT	NT A68,11,69,3,11,2,24,30,36,1, 32,24,74,80,31,29, B57,58 CW18,5,17,2,15,6,4, 8. DR1,4,7 DQ5,6,7,4,8.
40	CI-74	CI-96 CII-86	IgG AMPLO	A32,25,24,23, BW4,62 45,75,76,50,60,61, NT	A24,32,23,25,30,BW4,62,75, 76,45,60,61,50,46,35,27,41, 54,39,48,56,73,67,72,8201 81,18.

FIG 16E

					CII-NT	DR9,12,7,10,53,52 DQ2,5,9,5,4.
41	CI-56	CI-99	A2,68,69, B7,42,55 IgM-B57,58.	A2,68,69, B7,42,55,56 57,58,67,81,8201. CII-NT ₁ sem soro	NT	AMPLO C I CII-NT
42	CI-95	CI-95	IgG AMPLO CII-NT	A1,3,11,24,25,26,29, 30,31,32,33,34,36,43 66,74,B -ALL except 46,51,57,58,59,63,65. DR11 DQ5,4 DP2, 17,3,10,9,14.	mesmo	A24,1,32,11,29,31,74,36,3, 30,34,33,80,66,33,26,25,43, 68, BW6,B44,47,27,49,13, 53,77,37,51,38,52,59,63. DR11,4,1,103,13 DQ5,6,4,8 2 DP17,3,10,2,14,9,1,5,19, 13,4,11.
43	CI-63	CI-97	A1,3,11,23,24,25,36. B44 CII-NT	A1,25,36,74,80. B44,45,76,8201. Rpt-A11 pos.1/17/08 CII-Negativo	mesmo + A29,3857	A1,2,3,11,25,29,30,31,32 33,36,74,80, B44,45,49,50, 52,56,57,58,63,76,8201. DP17,19,1,5,3,10,13,14,9,11.
44	CI-20		B62,75 Indefinido IVIG inibição	BW6, CW9,10 IVIG inibição DR11, DQ5,6 DP2,19	mesmo	A34,80, BW6, B57,63,77,13 49, CW2,6,9,10. DR11,7,15,16,53 DQ5,6,4 DP19,1,4,5,2,10,13,3,11,4.
45	CI-29	CI-99 CII-98	A1,36 A1 sem inibição Resto inibido	A1,11,23,24,25,26,29 36,43,66,80,B60,70, CW9,10. A1 sem inibição Resto inibido em C1q	mesmo +A30	A1,11,23,24,25,26,29,30,31 32,33,34,36,43,66,68,74,80 B7,8,13,18,35,38,39,41,42, 44,45,46,47,48,49,50,51,52 53,56,59,60,61,62,63,64,71 72,73,75,76,77,78,81,8201. Cw1,7,8,9,10,12,14,15,16,17 Ser date-6/19/07
46	CI-50	CI-92 CII-89	A1,3,11,36? B51 A1,27 Inibidos A11,36 provavelmente não inibidos	A1,3,11,25,36. B18,35,51,53,78. A3,11 sem inibição Resto inibido	mesmo	A1,3,11,23,24,25,26,29,30, 31,33,34,36,43,66,68,74,80 B18,35,37,38,39,51,52,53, 64,75,76,77,78.
47			B57,62.	B46,50,56,58,49,77, mesmo	mesmo	A1,3,11,23,24,25,26,29,32,

FIG 16F

					35,76,63,53,57,78,51 71,75,72,62. CW9,10.	34,36,43,66. B56,58,50,35, 49,78,46,71,51,53,72,77,57 76,63,52,13,45,75,62,44,67 55,42,8201,59,38,64,18,41, 39,54. CW9,10,7,18,15,2,5 6. DR1,4,52DQ4,5,6,8,9 DP17, 19,1,5,3,10,13,14,9,11.
48			A25,26,34.		A25,66,26,43,34,66 68,33. B45,76,8201. mesmo	A26,66,25,43,34,68,66,33, 69,1,11,33,36,29,30,24,23 30,80. B45,76,8201,44,50 49,62. DR7,119,10,12,4,17,53,52 DQ2,4,7,8,9
49			A25,26,34.		A26,66,43,25,34,68, 30,11,68,29,33,23,29, 69,32,24. BW4 DR4,53 DQ7,8,9,4.	A26,66,34,25,68,43,11,23,33 69,32,30,24,66,29,2,31,74 BW4, B39. DR4,1,7,9,11,103,53 DQ7,8, 9,2,4.
50			B7		B67,27,81,7,42,8201, 27,56,55,60,73,61,54 48,38,57,46,8,62, CI-Negativo	A66,32,24,23,74,25. B67,56,8201,27,42,81,7,27, 55,60,73,61,48,8,54,47,57, 13,63,41,62,78,51,75,58,64 46,71,39,76,37,59,35,52,53 77,38,65. CI-Negativo
51			A1		A1,29,36,26,80,43,24 B76. CI-Negativo	A1,29,36,26,80,43,24,23,30 B76,45,44,8201,27. DR1,103.
52			A2,68,69. CII-Negativo		A2,24,69,68,25,34,66, 33,26,29,30,23,31,30. CI-Negativo	A69,2,34,68,24,25,33,34,66 26,66,29,30,33,31,43,23,32, 11,74,36. B55,67,46,42,63. CI-Negativo

FIG 16G

53				A32 (POSS A25) B51,52,59. B51,B52,B18,B49,B63,B7 B77	A25,32,24, B53,63,49 51,78,57,67,58,52,38, 77,18,59,8201,42,39 13,56,8. DQ7,8,9.	NT	A25,32,24,23,33 B51,63,57 49,53,78,58,52,77,18,67,59, 38,8201,13,42,35,64,7,39,8, 56,65,75,81,61,55,60,46,73 54. DR7,15,16 DQ7,8,9,2,4
54				B57,62.	B76,57,63,75,62,77,46 50,49,56,13,53,35. CW9,10. DR4,53 DQ7,8,9.	mesmo	A23,24,68,69,2 B76,57,75,63 62,57,77,49,50,56,46,13,35, 53,7,81,8201,71,72,27,67,58 78,27,42,51,55,52,73,60,45. CW9,10,8.
55				A26	A26,66,34,11,25,43,1, 36,80,30,29,66. DR7	mesmo	A26,25,11,1,43,34,66,36,30, 80,29,24,66,3,33,68,23,68, 69,31. B76,62,75,45,8201, 44,77,46,50,63,57,49,72,53 35,71,56,58,78,47,13. DR7,11 DQ2,9 DP10,2,17.
56				B13	B13,27,81 CW18,17,2,6,15,5. DR7.	NT	A66,30. B13,27,81,60,7,47, 61,53,73,35,75,48,49,50,77. CW18,17,5,6,2,15,4. DR7,9,53,52 DQ2,4,9.
57				A1. B62	A1,24,3,11,30,80,36, 29,34,25,29,32,23 B77,46,63,50,57,49,56 76,53,35,75,62,58,71, 78,72,45,51 CII-Negativo	mesmo	Todos exceto A2,66,69, B7,8 48,41,61,60,73,81,42. CW9,10 DR8
58	CI-0 CII-0	CI-26 CII-9		NEGATIVO	NEGATIVO	mesmo	A203 B7,22,42,54,55,56,67, 81,8201 DQ4
59	CI-0 CII-0	CI-71 CII-0		NEGATIVO	NEGATIVO	mesmo	A25,26,34,66,2,68,69,29,32, 43,74, B63

FIG 16H

60	CI-0 CII-0	CI-0 CII-0	CI. II NEGATIVO	CI. II NEGATIVO	mesmo	CI. II NEGATIVO
61	CI-0 CII-0	CI-0 CII-51	CI-Negativo Reatividade fraca a CII	CI-Negativo DR53	mesmo	CI-Negativo DR53
62	CI-48 CII-55	CI-95 CII-88	IgM Indefinido DQ2,6, Indefinido	NEGATIVO DQ2,5,6	A2,25. mesmo	A2,26,50,1,10,11,25,28,30,34 43,66,68,69 B17,21,35,44,49 53,56,57,58,62,63,75. DR7,DQ2,6,4,5,9.
63	CI-34 CII-58	CI-98 CII-91	A24,68,69 inibição in vitro DR15,51,DQ1,5,6.	A24,2,68,69,11,3,34, 36,80. DR51, DQ5,6.	mesmo	A1,2,3,11,24,29,31,33,34,36 66,68,69,80.-Ser.D-3/5/07 DR1,2,9,10,15,16,103,51,53, DQ5,6,8,9.
64	CI-17 CII-40	CI-99 CII-96	IgM, IgG de especific. Ampla para CI e CII. Inibição moderada	A30,31,34 B49,50,45, 62,75,44,76,13,57,58, 47,60,63,61,53,64,41, 8,8201,27,65,56. DR13,11,17,14,13,12, 8,18,7,15,52 DQ5,6,4	same 66,3,33,11 67,7,71,59,35,81,5 72,37. mesmo	A1,11,26,28,30,31,32,33,34 36,43,66,74,80. B7,8,12,13, 14,15,16,17,21,27,35,40,41, 42,47,48,52,53,55,56,59,67 70,81,2708,4006,8201. DR7,8,11,12,13,14,15,17,18 52 DQ1,4,5,6.
65	CI-0 CII-0	CI-70 CII-67	NEGATIVO	A30 CII NEGATIVO	mesmo	A1,80. B7,8,22,35,42,50,53, 55,56,62,67,75,76,78,81, 2708,8201 DR8,11,12,13,14,17,18.
66	CI-0 CII-0	CI-0 CII-999	NEGATIVO	A11 CII NEGATIVO	mesmo	Teste inválido. Alto BG.
67	CI-78 CII-93	CI-99 CII-88	IgG, IgM, A1, 3, 11, CII não claros. Inibição significativa.	A24,1,3,36,80,34,23,11 25,66,33,30,43,68 B7,81,27,56,67,42,76, 60,73,53,78,55,35,78, 8,62,51,48,75,13,47,61. DR17,11,13,8,14,18 DQ7,2,9,6,DQA1*ST456	mesmo	A24,1,3,36,80,34,23,11,26,69 25,66,33,30,43,68,31,32, B7,81,27,56,67,42,76, 60,73,53,78,55,35,78, 8,62,51,48,75,13,47,61. DR17,11,13,8,14,18,7,9,12,52 DQ7,2,9,6,8,9, DQA1*ST456

FIG 16I

68	CI-0 CII-0	CI-3 CII-0	NEGATIVO	NEGATIVO CII-NT	mesmo	B58 CII-NT
69	CI-33 CII-75	CI-0 CII-0	Todas células lisadas	B8 CII NEGATIVO	mesmo	B8 CII NEGATIVO
70	CI-9 CII-32	CI-99 CII-56	IgM, IgG de especific. Indefinida para CI e CII mas inibidos	B57,58 DQ2	mesmo + A1, 11, 24	A24,11,23,25,1,32,80,36,68 23,69,33,29 B57,58,49,53,77 63,51,27,38,52,59,47,37,44 13,76. DQ2,6,9.
71	CI-0 CII-0	CI-12 CII-63	Nenhum anticorpo IgG especifico	NEGATIVO Possível com DQ5	mesmo	A30,31 DQ5,6,4.
72	CI-0 CII-0	CI-25 CII-0	NEGATIVO	NEGATIVO	mesmo	A23,24,80.
73	CI-0	CI-0 CII-70	NEGATIVO NEGATIVO	CI-Negativo DR53	Alto fundo mesmo	CI-Negativo DR1,9,10,17,53 DQ8,9.
74	CI-64 CII-80	CI-99 CII-52	A3,23,24,11 Inibição significativa CII? Rituxan	A24,11,3,80,1,36, 23,32,30,25,B82, 56,67,42,55,7,76 81,54. DR53,DQ7,8,9 ?DQA3	mesmo NT	A1,3,23,24,11,25,26, 29,30,31,32,33,34,36 66,68,69,74,80, B44, 7,8,12,14,17,18,22,27 35,37,42,45,51,53,59 63,67,76,78,81,8201. DR53,DQ7,8,9. ?DQA3
75	CI-0 CII-100	CI-0 CII-69	CI-NEGATIVO CII-?RITUXMAB	CI NEG. DQ5	mesmo DQ5,6,4	CI NEG. DR15 DQ6,4,5.
76	CI-22 CII-85	CI-23 CII-96	IgM-A11 por Long i. DQ1,5,6 RPT-NEGATIVO POR AHG RPT-DQ2,5,6	NEGATIVO DR53 Rpt+DQ2,6	mesmo	A11,29,25,6601 DR15,51,53 DQ2,6,5,8. Data do soro 10/8/07

FIG 16J

77	CI-0 CII-0	CI-91 CII-20	NEGATIVO	NEGATIVO	mesmo	A23,24,25,26,66,11,30,31,43 BW6 CII- NEG.
78	CI-0 CII-7	CI-13 CII-0	NEGATIVO	NEGATIVO	mesmo	B51,75,78. CII NEGATIVO
79			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
80			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
81			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
82			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
83			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
84			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
85			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
86			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
87			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
88			NT	NEGATIVO	NT	CI-B27
89			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
90			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
91			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
92			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO
93			NT	NEGATIVO	NT	NEGATIVO

FIG 16K

94				NT				NEGATIVO		NT		NEGATIVO	
95				NT				NEGATIVO		NT		NEGATIVO	
96				NT				NEGATIVO		NT		NEGATIVO	
97				NT				NEGATIVO		NT		NEGATIVO	
98	CI-12 CII-4	CI-33 CII-0	Especificidade IgM? Inibição não pode dizer					Negativo CII-Negativo		CI-Wk B78		A24,2403,9,23B51,78	
99				NEGATIVO			A26,34,66,43,25 DR4					A26,34,66,43,25,68,33 DR4,7,9,53,52,DO4	
100				B18,65			B18,64,65. DR1,17,103,9,51 DO5,6,4.					A3,33 B18,64,65,8,78 51,54,35,56,8201,27, 53,67,7,81,42,37,55. DR1,103,9,17,8,12,15, 16,10,13,11,18,7,14,51 52, DO5,6,4,8.	
101				NEGATIVO			A11,25,66,43,1 DR7,11					A11,25,66,1,43,26,34, 36,80,3,30,24,32,30 B73 DR7,11,9,DP10,17,2 3,14,9,4,1,19.	
102				NEGATIVO			A25,32 B51,53,78,49,63 52,35,57,58. CII NEGATIVO					A32,25,23,24 B51,78 53,49,63,52,35,51,18 57,59,75,58,77,67,37 92011 12 32 24	
103	CI-0 CII-33	CI-31 CII-53		NEGATIVO				NEGATIVO		mesmo		A28,33,34,28 B8 DR7,10,53.	
104	CI-0 CII-29	CI-32 CII-56		CI NEGATIVO DR11,13-IgM				NEGATIVO		mesmo		A23,24,25,32 DR11,13,14,17,18.	
105	CI-100	CI-98		BROAD CI, CII			A69,33,23,80,68,24,29,			mesmo		A1,3,23,24,25,26,29,30,31,32,	

FIG 16L

	CII-100	CII-96		31,34,36,66,74,43,26,1, 32,3 B76,56,8201,47,55 60,8,27,67,61,46,7,57,58 81,42,13,73,54,63,48,41 CW9,10,8,18,14,16,1,7,6 DR11,17,7,13,52 DQ5,6	33,34,36,43,66,68,69,74,80 B7,8,13,27,37,41,42,44,45,46 47,48,49,50,54,55,56,57,58, 60,61,62,63,64,67,73,75,76, 81,2708,8201,CW1,2,3,9,10,6, 14,16,17,18,6,7,8,12, DR7,8,9,11,12,13,14,17,18 DQ5,6,DR62-		
106	CI-0 CII-0	CI-21 CII-0	NEGATIVO	NEGATIVO	mesmo	A24 CII NEGATIVO	Possível
107		CI-92 CII-60	B44,45	A1 B76	MESMO+BB201,44	A1,23,24,25,29,32,36,60,2403 B7,13,27,37,41,42,44,45,47, 48,49,50,54,55,56,57,58,60, 61,62,63,67,75,76,77,81,2708 8201,CW1,4,5,14,18, DR7,8,11,12,13,16,103	
108			A29, B44 B-44 reverificado chamado errado por Tami Rpt1/15/08-sem B44	A29,43 B7	mesmo	A3,11,23,25,26,29,30,31,32, 33,34,43,66,68,74,B7,8,13,27 42,44,45,47,48,54,55,56,60,61 67,73,76,81,2708,8201,CW2,3 9,10,5,6,15,16,17,18,1 DR8, DQ4	
109	CI-0 CII-0	CI-55 CII-64	CI-Negativo	CI NEGATIVO		A2 B52,57,58 DQ8,4,7,9	
110	CI-98 CII-96		A1,36	A1,34,68,33,36,25,69,34 66,26,33,30,3,11,29, BW6			
111	CI-21 CII-0	CI-1 CII-0	A3-IgM	CI, CII NEGATIVO	mesmo	CI, CII NEGATIVO	
112	CI-0 CII-30		CI NEGATIVO IdM NÃO CLARO	CI NEGATIVO	mesmo	DR4	
113	CI-2		CI NEGATIVO	CI NEGATIVO	mesmo	CI NEGATIVO	

FIG 16M

	CII-88	CII-DR53, BROAD	DR53 DQ7,8,9	DR53 DQ7,8,9,2,4
114	CI-0 CII-0	CI-66 CII-71	CI NEGATIVO CI NEGATIVO VE	A2,203 B7,17,81 DR1,4,DQ3,7,8,9
			mesmo	
115	CI-57 CII-38	CDCXM B-DTT NEG CDCXM B-POS	CI NEGATIVO CI NEGATIVO	A2,203,210,68,69 B75 DR15,51 DQ6
			mesmo	
	CI-0 CII-0	CDCXM B-DTT NEG CDCXM B-POS	CI NEGATIVO CI NEGATIVO	CI, CII- NEGATIVO
			mesmo	

TOTAL: 991 ESPEC. TOTAL: 1034 ESPEC.
75 AMOSTRAS POSITIVAS

FIG 16N

SUMÁRIO DE VALIDAÇÃO LUMINEX C1Q – AMOSTRAS IVIG

NO.	SORO D	RESULTADO CDC	RESULTADO C1Q			LUMINEX IgG
			LIPO	5% A/G/PBS	5% IVIG	
1	8/2/2007	NT	wk A2, B57,58 CII-NT	mesmo	Mesmo inibido	A1,2,36 B57,58. DQ7,8,9.
	8/2/07PRE	SPEC NÃO CLARO	B57,58	mesmo		
	8/2/07POST	CII- Rituxan Diminuído	DQ7,8,9 B57 only CII NEG	somente mesmo		A1,2,36 B57,58. DQ7,8,9.
	8/2/07PRE	NT	B57,58	mesmo		
	8/30/07POST	NT	DQ7,8,9 B57 somente CII NEG	mesmo		A1,2,36 B57,58,63 CW2,5,6,15,17,18. DQ7,8,9.
	8/30/07PRE	NT	B57,58	mesmo		A1,2,36 B57,58,63 CW2,5,6,15,17,18 DQ8,7,9
	8/30/07POST	NT	DQ7,8,9 B57 only CII NEG	somente mesmo		Mesmo que acima
	8/30/07PRE	NT	B57,58	mesmo		Mesmo que acima
	9/5/07POST	SPEC NÃO CLARO	DQ7,8,9 B57,58 DQ7	mesmo		Mesmo que acima
	10/25/2007PRE	NT	B57,58	mesmo		A1,2,36 B57,58 CW2,5,6,15,17,18 DQ7,8,9
	10/25/07POST	NT	NEGATIVO	mesmo		Mesmo que acima
	11/19/07PRE	NT	NEGATIVO	mesmo		A1,2,203 B57,58 CW6,17,18 DQ7,8,9

FIG 17A

11/19/07POST		NEGATIVO		mesmo		Mesmo que acima	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	LIMPO	5% A/G/PBS	5% IVIG	LUMINEX IgG	
2	1/15/2007 ALSO PRE	NT	NEGATIVO	ALTO BG INVALIDO	NEGATIVO	CH-Negativo	
	8/21/07POST	NT	DR53	mesmo	DR53 inibição parcial	DR1,9,10,17,53 DQ8,9.	
			CI-Negativo DR53	CI-Negativo mesmo		CH-Negativo	DR1,9,10,17,53 DQ8,9.
RESULTADO C1Q		RESULTADO C1Q		RESULTADO C1Q		LUMINEX IgG	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	LIMPO	5% A/G/PBS	5% IVIG	LUMINEX IgG	
3	7/20/07PRE	A3,23,24,11	A24,11,3,80,1,36, 23,32,30,25,B82, 56,67,42,55,7,76 81,54.	mesmo	Inibição marcada	A1,3,23,24,11,25,26, 29,30,31,32,33,34,36 66,68,69,74,80, B44, 7,8,12,14,17,18,22,27 35,37,42,45,51,53,59 63,67,76,78,81,8201. DR53,DQ7,8,9. ?DQA3	
	8/10/07POST	CI- ?Rituxan	DR53,DQ7,8,9 ?DQA3	NT	NT	A1,3,11,23,24,25,29, 30,32,34,36,68,80. B7,8,17,18,22,27,37, 42,63,64,67,76,81,82. DR53,DQ7,8,9.	
		CI-diminuido	A3,11,24	NT	NT		
	11/6/2007PRE	CI- ?Rituxan	DR53,DQ8	NT	NT		
	11/7/2007POST		A24,11,3,80,1,36 DR53 DQ7,8 A24,11,3. DR53 DQ8	mesmo	mesmo		
	12/18/07PRE		A24,11,3,1,80,36	mesmo	mesmo		

FIG 17B

	12/18/07POST		B59,38,46,54, DR53 DQ7,8 A24 ONLY DR53 ONLY	mesmo	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	RESULTADO C1Q	5%A/G/PBS	LUMINEX IgG
4	8/9/2007	A2,68,69,23,24 B57,58. resultados CDC confusos	LIPO	5%A/G/PBS Mesmo + A24	A2,23,24,68,69 B8,12 17,37,41,42,45, DR1,9,10,103 DQ4,5,6. A2,23,24,68,69 B42,37,44,41,8,57,58 45 DR1,10,103,51 DQ5,6 A2,203,210,68,69,23 24,2403 DR1,10,103,51 DQ5,6.
	8/10/07PRE	A2,68,69 CII-NEG	CII-NT A2,68,69,24 B57	NT	
	8/12/07POST	A2,69 A68 v. fraco	DR1 A2,68,69 DR1	NT Inibição marcada in vivo	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	RESULTADO C1Q	5%A/G/PBS	LUMINEX IgG
5	8/16/07PRE	adeguando CDC	LIPO	5%A/G/PBS mesmo	B51,75,78. C-II-Negativo
	8/16/07POST	NT	NEGATIVO I NEGATIVO	mesmo mesmo	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	RESULTADO C1Q	5%A/G/PBS	LUMINEX IgG
6	7/7/2007 TAMBÉM PRE	A2,68,69. Longa incubação	LIPO A24,2,68,69,11 B49,56,63,50,75, 62,57,58,53,35, 77,71,72.	5%A/G/PBS Mesmo A11 B77,72	A2,11,23,24,68,69. B17,21,35,49,50,53, 56,62,63,70,71,72,75, 77

FIG 17C

8/29/07PRE	NT	CI NEG. DQ5,4	DQ5,6,4	A2 B49,17. DR15,8,11,13,17 DQ6,4,5,DQA1-ST456 A2 B49,17. DR15,8,11,13,17 DQ6,4,5
8/30/07POST	NT	CI NEG. DQ5,4	DQ5,6,4	
10/3/07PRE	IgM-A2 B57,58 CII-NT	CI NEG. DR11,13 DQ5,6,7	mesmo +DQ2, 4,DR17.	A2 B57,58,49 DR13,17,11,8,14,103, 15,12,18,52 DQ7,4 6,5.,DQA1-ST456
10/5/074:00 POST	CI-NT (s/ soro suffic.) DR15,DQ2,5,6	CI NEG.	mesmo	A2,25,69 B57,58,49, 63,27,7,51CW17,5,18,2 DR13,11,8,17,14,103, 15,12,18,16,7,52,51 DQ7,6,2,5,4,8,DQA1-ST456
10/5/0716:00 POST	CI-NT (s/ soro suffic.) DR15,DQ5,6	CI NEG.	mesmo	A2,25,69,32,24,68,34 B57,58,49,63,51,27,7 47,27,8201CW17,5,18,2 DR13,11,8,17,14,103, 15,12,18,16,7,52,51,1 DQ7,6,5,4,8,DQA1-ST456
10/5/074:00 PRE	NT	CI NEG.	mesmo	A2,25 B57,58,49,63 CW17.
10/13/07POST	NT	CII NEG. DR11,13 DQ5,6,7.	DR11,13 DQ5,6,7.	DR13,11,8,17,14,103, 15,12,18,16,7,52,51,1 DQ7,6,2,5,4,8,DQA1-ST456
		CI NEG.	mesmo	A2,25 B57,58,49,63 CW17.
		DR11,13DQ5,6,4	+DQ2,7.	DR13,11,8,17,14,103, 15,12,18,16,7,52,51,1 DQ7,6,5,4,8.DP19 DQA1-ST456

FIG 17E

10/15/07POST	NT	CI NEG.	A29.		A2,25,32 B59,57,58 63,51,53 CW17. DR13,11,8,17,14,103, 15,12,18,16,7,52,51. DQ7,6,5,4,8. DQA1-ST456
RESULTADO C1Q					
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	LIMPO		LUMINEX IgG
			5%A/G/PBS	5%VIG	
8	9/4/2007	CI NEG DQ5,6 inibição parcial	B37,63,65,48 CW7,17,8,1,10. mesmo + B81 CW12,15 mesmo	B63,37 CW7, Cw 6.17 inibido. Resto negati. DQ inibição parcial	A23,24 B7,53,37,48, 63,65,73,81. CW7,8 1,10,12,15,16,17,18. DR9,13,52,1,2,7,11,12 14,17,18,103,51, DQ2,5,6.
	9/24/07PRE	NT	wk CW7	mesmo	B53,37,48,63,65,73,81 CW1,7,8,10,12,15,16 17
	9/24/07POST	NT	DQ5,6 CI NEG DQ5,6	mesmo mesmo mesmo	DR13 DQ2,5,6. Mesmo que acima
	10/30/07PRE	NT	B63,37 CW7	mesmo	A23,24 B53,7,37,48,63 65,73,81 CW7,17,1,10 12,15,16,18,8
	10/30/07POST	NT	Negativo	DQ5,6,2	DR13,9,1,7,12,17,18,103 51 DQ2,6,5 Mesmo que acima
	11/19/07PRE	NT	B63,37 CW7 DQ5,6	mesmo	CI- SAME AS ABOVE CII-SAME+DR10,11,14, 15,16.
	11/19/07POST	NT	B63,37 CW7 DQ5,6	mesmo	Mesmo que acima

FIG 17F

NO.	SORO D	RESULTADO CDC	I IMPO	RESULTADO C1Q		LUMINEX IgG	
				5%A/G/PBS	5%IVIG		
9	8/17/2007	IgM-A11 DQ1.5.6.	NEGATIVO	mesmo	DR53 inibido	A11,29,25,6601 DR15.51.53 DQ2.6.5.8.	
	9/11/07PRE 9/12/07POST	doses duplas – chamado errado NT	DR53			Data soro 10/8/07	
			NEGATIVO	mesmo		A11,29,25 CW7 DR15,51,53,1,10 DQ2,6,5,8,9.	
			NEGATIVO	mesmo		A11,29,25 CW7,10,17 DR15,51.	
RESULTADO C1Q							
10	10/3/2007	IgM Indefinido DQ2,6 indefinido Inibição parcial	LIMPO	RESULTADO C1Q		LUMINEX IgG	
				5%A/G/PBS	5%IVIG		
				mesmo	A25 não inibido		A2,26,50,1,10,11,25, 28,30,3443,66,68,69 B17,21,35,44,49
				mesmo	DQ2,5,6.		53,56,57,58,62,63,75. DR7,DQ2,6,4,5,9.
10/12/07PRE 10/13/2007	NT NT	Negativo DQ2,5,6 Negative DQ2,5,6	mesmo	mesmo	A2,25,26,66 B57,58, 50,49. DQ2,5,6,4,9. A2,25,26,66 B57,58, 50,49,63,44,62. DR1,7.DQ2,5,6,4,9. DP19.		
RESULTADO C1Q							
11	8/6/2007	IgG não específico	LIMPO	RESULTADO C1Q		LUMINEX IgG	
				5%A/G/PBS	5%IVIG		
				mesmo	NEGATIVO		A30,31

FIG 17G

	10/11/07PRE 10/12/07POST	antígeno NT NT	NEGATIVO NEGATIVO	mesmo mesmo		DQ5,6,4. A30,31 DQ5,6 A30,31 B76,63,8201, 45 CW7,17,10. DR12,4,1,53,52 DQ5,6 DP19.
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	LIMPO	RESULTADO C1Q	LUMINEX IgG	
12	9/19/2007 Post 3XPPs 9/27/07PRE 9/28/07POST	CI NEGATIVO CII FRACA REATIV.	LIMPO CI NEGATIVO DR53 NEGATIVO NEGATIVO	5%A/G/PBS mesmo mesmo mesmo 5%IVIG DR53 inibido	LUMINEX IgG CI NEGATIVO DR53 CI NEGATIVO DR53 CI NEGATIVO DR53	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	LIMPO	RESULTADO C1Q	LUMINEX IgG	
13	11/5/2007 11/5/2007PRE 11/5/07POST		LIMPO CI NEGATIVO DR53 DQ7,8,9 CI NEGATIVO DR53 DQ7,8,9 CI NEGATIVO DR53 DQ7,8,9	5%A/G/PBS mesmo mesmo mesmo 5%IVIG Inibição parcial	LUMINEX IgG CI NEGATIVO DR53 DQ7,8,9,2,4 CI NEGATIVO DR53 DQ7,8,9 CI NEGATIVO DR53 DQ7,8,9,2,4	
NO.	SORO D	RESULTADO CDC	LIMPO	RESULTADO C1Q	LUMINEX IgG	
14	11/7/2007	A29 B44 B44 Errado chamado A29 SEM INIBIÇÃO	LIMPO A29,43 B/	5%A/G/PBS mesmo 5%IVIG A29 Sem inibição	LUMINEX IgG A29,30,29,43,32,33, 74,31,66,34,23,1,25 26,68 B7,81,27,76,45 27,60,44,61,42,47,82 48,13,67,73,56,55,8,54 CW2,10,16,17,9,18,5	

FIG 17H

		LIMPO	5%A/G/PBS	5%IVIG	
16	12/5/2007	A2,68,69,3 B78, 51,53 DR1	mesmo	A2 sem inibição Rest inibido	A2,3,9,25,28,2403 B5, 14,18,35,53,71,75,77 78,8201 DR1,4,9,10,14,15,16 17,103,51 DQ5

FIG 17J

FIG 18

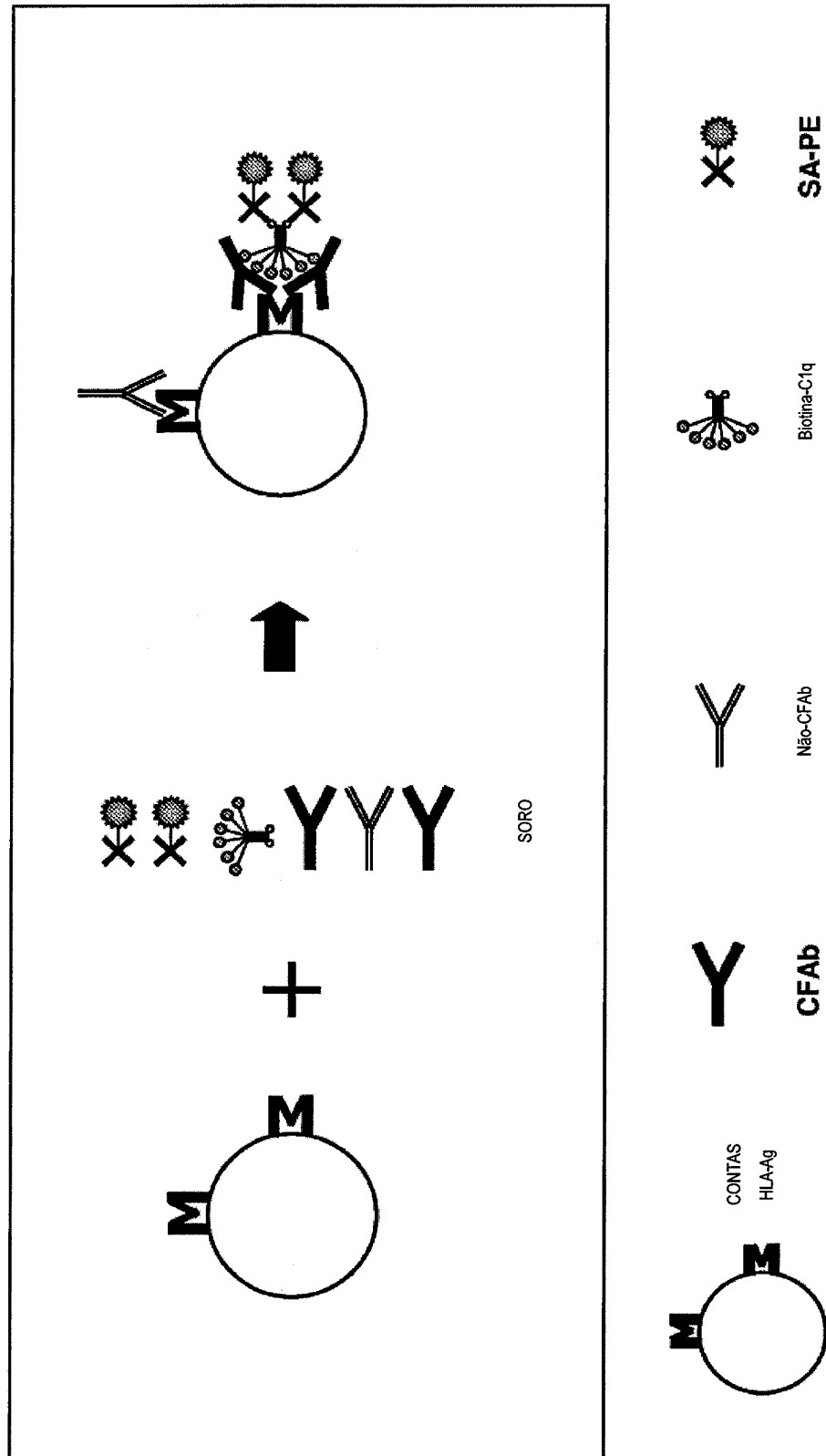
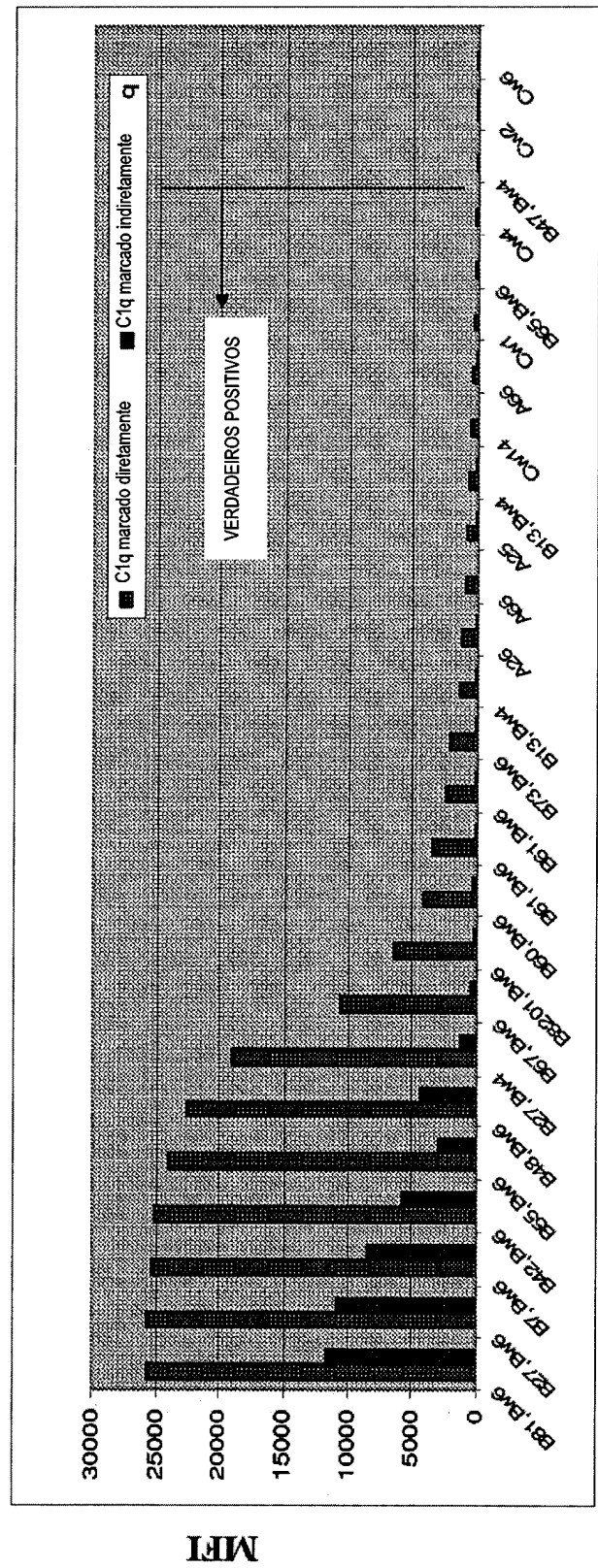


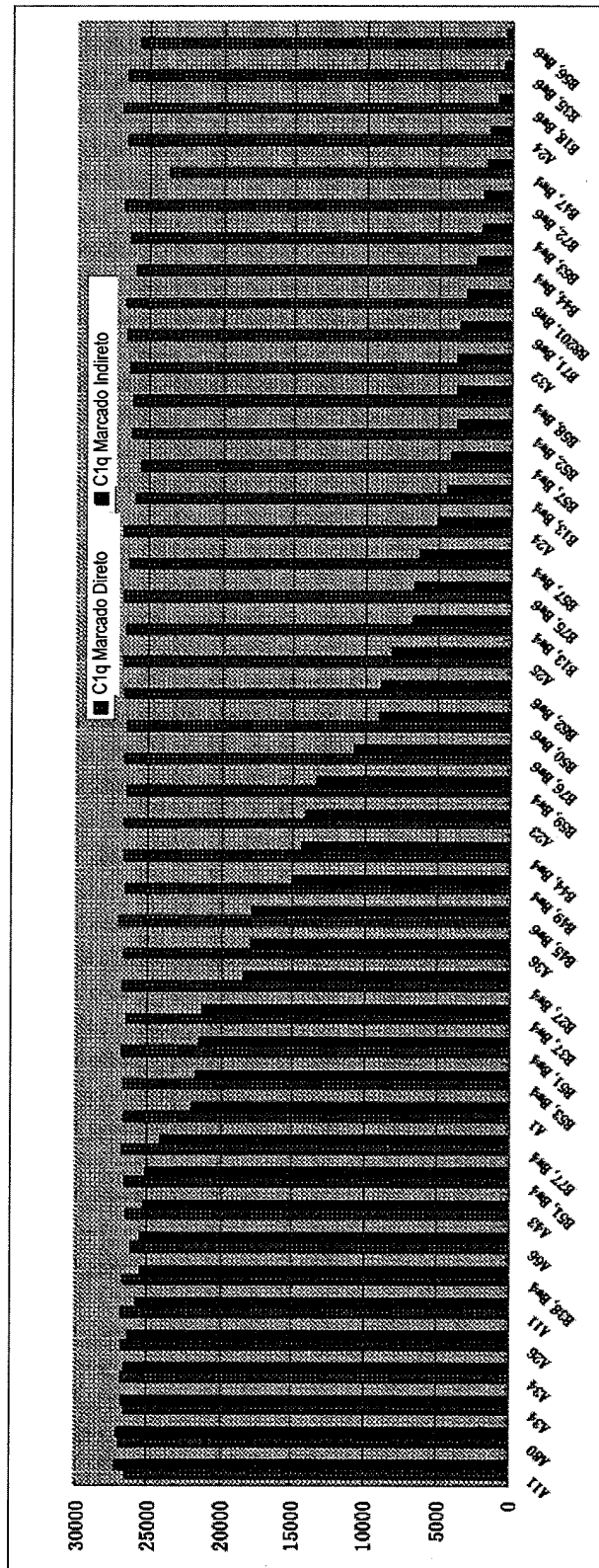
FIG 19A
COMPARAÇÃO DE MARCAÇÃO DIRETA E INDIRETA DE C1q EM ENSAIO LMX-C1q



Especificidade HLA

Sensibilidade elevada usando C1q diretamente marcado comparado com detecção indireta usando anticorpo anti-C1q. Soro A.

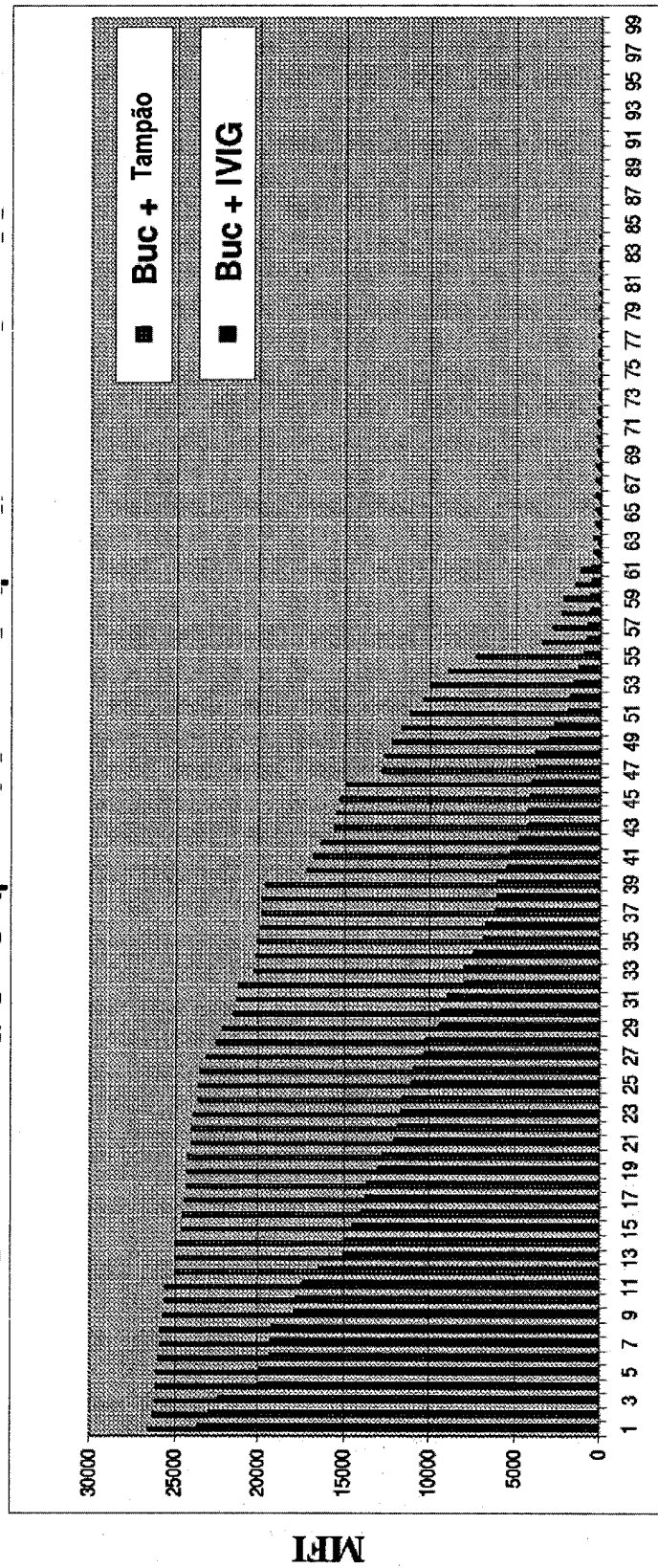
FIG 19B



Subconjunto apenas de anticorpos positivos detectados por C1q diretamente marcados (do slide 2) dispostos por resistência de reações C1q marcadas indiretamente. Soro B.

FIG 20A

MARCAÇÃO INDIRETA DE ENSAIO DE INIBIÇÃO IVIG C1q IN VITRO LMX-C1q

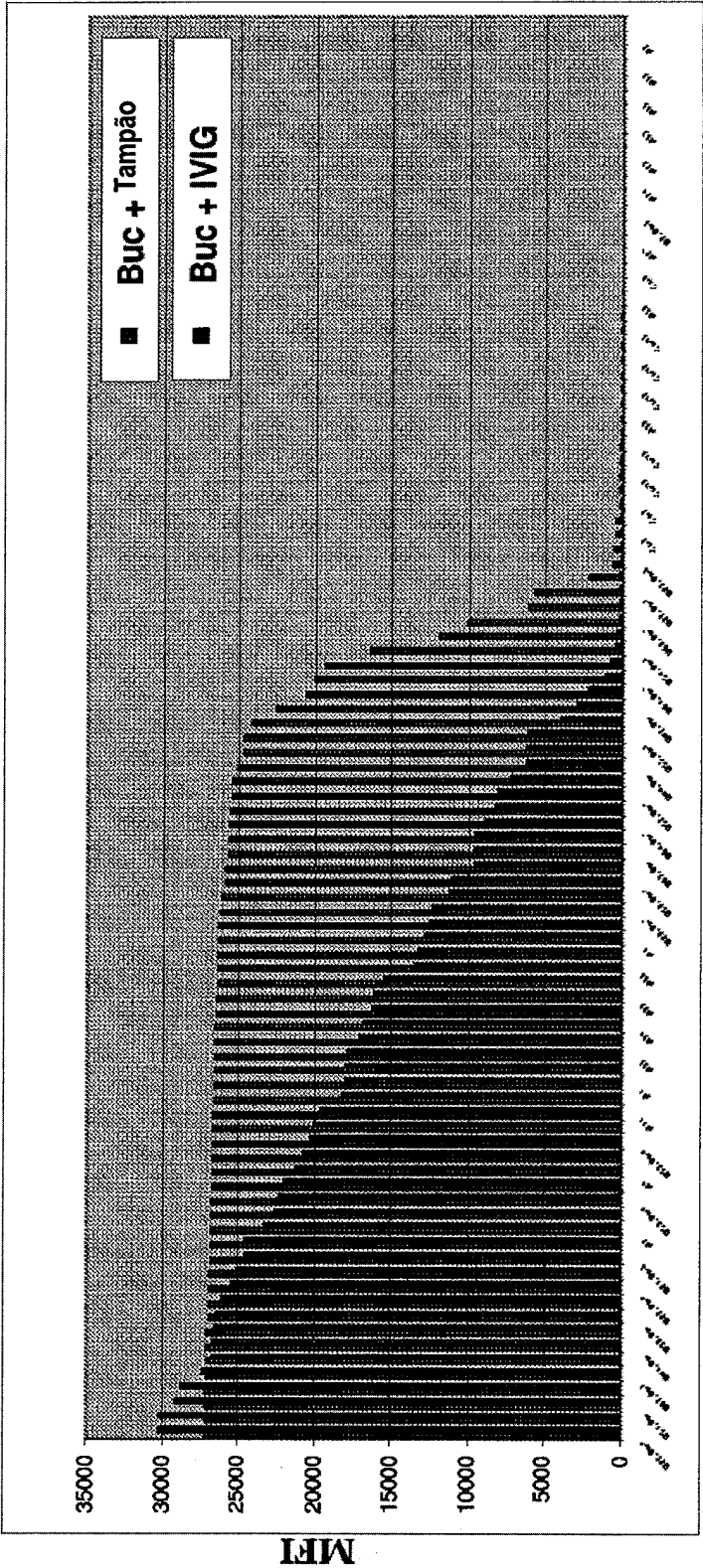


Especificidade HLA

Ensaio de inibição in vitro IVIG mostrando inibição pelo método C1q indireto original usando anticorpo anti-C1q

FIG 20B

MARCAÇÃO DIRETA DE ENSAIO DE INIBIÇÃO IVIG C1q IN VITRO LMX-C1q



Especificidade HLA

Ensaio de inibição in vitro IVIG (como no slide 4) feito com C1q diretamente marcado mostrando inibição similar, mas sensibilidade mais alta