

(11) Número de Publicação: **PT 1151087 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 9/12 (2007.10) **G01N 33/535** (2007.10)

C12Q 1/48 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.02.03**

(30) Prioridade(s): **1999.02.05 GB 9902659**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.11.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.07**
156/2008

(73) Titular(es):

HEALTH PROTECTION AGENCY

PORTON DOWN SALISBURY WILTSHIRE SP4

0JG

GB

(72) Inventor(es):

NEIL DAVID HAMMOND RAVEN

GB

MATTHEW PATRICK WICTOME

GB

(74) Mandatário:

LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO

PRACETA FERNANDO NAMORA, N.º 7, 3.º ESQ. 2820-598

CHARNECA DA CAPARICA

PT

(54) Epígrafe: **TESTE COM RUÍDO DE FUNDO REDUZIDO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

TESTE COM RUÍDO DE FUNDO REDUZIDO

A presente invenção refere-se a um teste com um ruído de fundo reduzido, um método para análise de um analito, um método para reduzir o ruído de fundo num teste e equipamento, num *kit* de teste particular, para levar a cabo tal teste.

A bioluminescência de ATP tornou-se rapidamente no método de escolha para a monitorização de higiene e limpeza devido à combinação da sua sensibilidade e facilidade de teste. O teste de luciferina-luciferase permite detectar tão poucas quanto 10^{-15} moles de ATP. Uma vez que uma célula microbiana média contém aproximadamente 10^{-18} moles de ATP, isto origina um método de detecção de apenas 10^3 células.mL⁻¹.

Para a maioria das operações este nível de detecção é suficiente, no entanto existem aplicações em que é necessária uma sensibilidade ainda mais elevada, mesmo até ao nível de uma única célula microbiana. GB-A-2304892 descreve um teste deste tipo utilizando a enzima adenilato cinase (AK) formadora de ATP. Uma célula média contém várias centenas de ordens de grandeza menos moléculas de AK do que moléculas de ATP, no entanto, numa incubação de 10 minutos, consegue-se uma amplificação típica de 400000 vezes através da detecção da AK através do ATP que produz. Tal corresponde ao nível de detecção de uma única célula, apesar de na prática se conseguir mais facilmente 10 células.mL⁻¹ devido ao ruído de fundo devido á contaminação

por AK e ATP. Corresponde também a um nível de detecção que baixa até pelo menos 10^{-20} moles de AK.

A utilização comercial desta sensibilidade extrema está, por isso, sob investigação. Existem, no entanto, alguns problemas com a utilização mais disseminada deste teste conhecido com base na AK. Um destes reside no facto de apesar do teste detectar a presença de microrganismos, não diferencia entre um organismo e outro. Isto foi parcialmente ultrapassado através da utilização de bacteriófagos para libertar AK de bactérias específicas (Blasco R, Murphy MJ, Sanders MF e Squirrell DJ (1998) Specific assays for bacteria using phage mediated release of adenylate kinase. J. Appl. Microbiol. 84: 661-666).

No entanto, cada microrganismo necessita de um fago específico e contém uma AK com necessidades de tampão diferentes, além de diferentes óptimos de temperatura e pH. O segundo problema é mais fundamental e é um problema para a sua utilização como uma enzima repórter generalizado. Enquanto na monitorização de higiene e limpeza a ubiquidade do ATP e da AK é benéfica, num teste com enzima repórter qualquer actividade de fundo indesejável é prejudicial. Tal é especialmente importante quando a amostra se encontra bastante concentrada para maximizar a potencial detecção.

Outro problema suplementar é que o teste conhecido é apenas eficaz para microrganismos que contêm AK; o teste conhecido não funcionará com outro material biológico, tais como vírus ou outros analitos, incluindo outro material biológico que não contenha AK.

WO 94/06933 descreve a preparação de um conjugado para a detecção de um composto biológico.

EP 0 304 934 descreve a preparação de sondas moleculares acopladas a um enzima transferase ou ligase.

US 4 584 272 descreve uma adenilato cinase resistente ao calor e um processo para a sua produção.

WO 97/10505 descreve antibióticos específicos para a proteína priónica, métodos para a obtenção daqueles anticorpos, e a sua utilização na detecção da proteína priónica numa amostra.

Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs) é o termo dado a uma variedade de doenças associadas a um agente transmissível não convencional. O agente apresenta várias características semelhantes às dos vírus, tais como variação e mutação da estirpe, mas difere de vírus convencionais por ser excepcionalmente resistente ao calor, radiação ultravioleta e a desinfetantes químicos. As TSEs são um grupo heterogêneo de distúrbios neurodegenerativos fatais que ocorrem em humanos, martas, gatos e herbívoros ruminantes. A ocorrência endêmica da TSE "scrapie" em muitas populações de ovelhas e mais raramente as TSEs humanas, tais como a doença de Creutzfeld-Jakob (CJD) é conhecida desde há bastante tempo. No entanto, a ocorrência de novas TSEs em populações selvagens de veado-mula e de alce nos Estados Unidos e um surto de "Encefalopatia Espongiforme Bovina" (BSE) no gado no Reino Unido e na Europa colocou ênfase na necessidade existente para testes de diagnóstico e sistemas de detecção sensíveis

e fiáveis para estas doenças. No entanto, mais recentemente tornou-se visível que a BSE atravessou a barreira de espécies para a população humana, originando uma nova variante de TSE, geralmente conhecida pela "nova variante CJD" (nvCJD) ou "variante CJD" (vCJD).

As concentrações nativas mais elevadas de potencial infeccioso TSE são encontradas no cérebro de hamster infectado por "scrapie" 263K em que os teores frequentemente apresentados são tão elevados quanto 10^{10} unidades infecciosas por grama de tecido.

Os testes imunológicos actuais dão sinais positivos para PrP^{Sc} de quantidades tão pequenas quanto 1-10 g de tecido de cérebro infectado por TSE, por exemplo por "Western blotting" ou ELISA. No entanto, o teste ELISA é consideravelmente mais adequado do que "Western blotting" para o desenvolvimento de um sistema de detecção de PrP rápido e prático (PrP^C + PrP^{Sc}). Este nível de detecção é de aproximadamente 10^{-14} moles de PrP^{Sc} mas insuficiente para detectar a presença de quantidades de PrP^{Sc} ainda infecciosas. Quando também está incluído PrP^C, o diferencial entre o nível actual e necessário de sensibilidade é significativamente reduzido. Isto coloca os testes imunológicos actuais potencialmente na gama adequada, mas com uma margem de segurança inadequada.

Existe actualmente uma elevada incerteza relativamente aos números de indivíduos no Reino Unido potencialmente ou de facto infectados com a nova variante da Doença de Creutzfeld-Jakob (nvCJD). Como resultado houve apelos para que, por precaução, todos os procedimentos cirúrgicos

deveriam ser levados a cabo utilizando instrumentos descartáveis. A implementação tem um custo e implicações de procedimento significativas, consequentemente um meio alternativo de validar a descontaminação seria extremamente benéfico, e seria benéfico ainda para outro tipo de equipamento tal como o equipamento de processamento de carne. Assim, permanece um problema proporcionar um teste alternativo para o material biológico, especialmente proteína priónica, preferentemente de sensibilidade acrescida.

A presente invenção pretende abordar e ultrapassar ou pelo menos modificar estes problemas. Outro objecto das realizações específicas da presente invenção é desenvolver um método rápido e sensível para testar material biológico, em particular para a detecção de proteína priónica PrP (PrP^C e PrP^{Sc}) - uma vez que a presença de qualquer uma das isoformas numa amostra é indicativa da presença de tecido residual que expressa PrP e de potencial infeccioso transmissível. É ainda outro objecto da presente invenção proporcionar um método para testar proteínas priónicas que podem ser utilizadas no rastreio de protocolos de limpeza para determinar a sua adequação à remoção de agentes TSE de superfícies e proporcionar o material recuperado para testes imunológicos.

Deste modo, um primeiro aspecto da invenção proporciona um teste para um analito, compreendendo especificamente a associação do analito com uma cinase repórter termoestável, adicionando ADP e testando para a formação de ATP em que, antes da adição de ADP, cinases para além da cinase repórter são substancialmente removidas através de lavagem

e a cinase endógena residual no analito é inactivada pelo calor.

Assim, utilizando um teste da presente invenção, uma adenilato cinase repórter é especificamente associada com o analito de tal modo que a quantidade de adenilato cinase está substancialmente em proporção à quantidade de analito presente. Na ausência do analito não existirá qualquer adenilato cinase associada e nenhum sinal será gerado. Através da remoção substancial de adenilato cinase diferente da adenilato cinase repórter, a presente invenção tem a vantagem de que o sinal obtido não é contaminado ou de outro modo adversamente afectado por qualquer adenilato cinase endógena que poderia ter estado presente numa amostra a ser testada. Pela referência à remoção de remoção de adenilato cinase, pretende-se referir a remoção de actividade de adenilato cinase, tal como por remoção da adenilato cinase, ou sua desnaturação ou outro tipo de inactivação in situ. Além disso, através da adição de adenilato cinase repórter, o teste é de aplicação para a detecção de substancialmente qualquer analito e, ao invés de técnica anterior, não se limita à detecção de analitos que compreendem a sua própria adenilato cinase.

Numa realização da invenção proporciona-se um método para a determinação da presença e/ou da quantidade de um analito numa amostra, compreendendo:

a exposição da amostra a uma adenilato cinase repórter termoestável acoplada a um agente de ligação específico para o analito, de modo que a adenilato cinase repórter é

especificamente associada com qualquer analito presente na amostra;

a remoção da adenilato cinase repórter não especificamente associada com o analito;

exposição da adenilato cinase repórter especificamente associada com o analito a ADP; e

aferir a formação de ATP,

em que antes da adição de ADP adenilato cinase residual para além da adenilato cinase repórter é substancialmente removida por aquecimento.

Tipicamente, a adenilato cinase repórter é acoplada a um anticorpo que se liga especificamente ao analito sob investigação. O anticorpo pode ser obtido utilizando técnicas convencionais para a identificação e o isolamento de anticorpos específicos, e o teste da presente invenção é assim de aplicação a substancialmente todos os analitos contra os quais um anticorpo possa ser utilizado. Tal confere a vantagem que a presente invenção é de aplicação consideravelmente mais alargada em comparação com os ensaios conhecidos baseados em AK/ATP, uma vez que os testes anteriores se restringiam aos analitos alvo que continham a sua própria adenilato cinase.

A adenilato cinase repórter é adequadamente acoplada ao agente de ligação específico através de técnicas convencionais. Por exemplo, existem numerosos métodos para marcar biomoléculas imunorreactivas com enzimas

(conjugação). Os anticorpos, a maioria dos antigénios e enzimas são todas proteínas, pelo que os métodos gerais de reticulação covalente de proteínas podem ser aplicados à produção de reagentes de testes imunológicos. A preparação de conjugados anticorpo-enzima requer condições suaves para assegurar a retenção tanto das propriedades imunológicas do anticorpo e das propriedades catalíticas da enzima. Métodos comuns incluem o acoplamento com glutaraldeído, a oxidação com periodato de glicoproteínas para gerar dialdeídos capazes de formar ligações de base de Schiff com grupos amino livres ou outras moléculas proteicas, e a utilização de reagentes heterobifuncionais, por exemplo succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC).

A adenilato cinase endógena presente no analito é substancialmente removida ou destruída ou inactivada de outro modo antes de se realizar o teste de formação de ATP. O passo de remoção pode ser convenientemente realizado por aquecimento da adenilato cinase endógena a uma temperatura à qual é desnaturada. Alternativamente, outros tratamentos podem ser apropriados para destruir a actividade da adenilato cinase endógena, tal como a utilização de ultrassons ou extremos de pH ou de concentração salina. Numa realização da invenção, a adenilato cinase repórter é uma enzima termoestável e remove-se a adenilato cinase por aquecimento. Numa realização específica da invenção descrita abaixo em maior detalhe, este passo de desnaturação é levado a cabo a cerca de 90°C durante um período de cerca de 10 minutos, apesar de serem apropriadas outras temperaturas e durações desde que a adenilato cinase endógena se torne incapaz de catalisar a formação de ATP e a adenilato cinase repórter mantém a sua actividade.

Constitui um passo suplementar, preferido, no teste da presente invenção a remoção de qualquer ATP presente antes da adição de ADP, diminuindo assim ainda mais o ruído de fundo no teste. A remoção de ATP endógeno pode ser conseguida através da adição de uma ATPase e incubação antes da adição de ADP. Mais preferentemente, é utilizada uma ATPase termolábil para remover o ATP e depois essa ATPase termolábil é destruída através da utilização de temperatura elevada de modo a evitar a presença de ATPase que adversamente influenciaria o sinal obtido utilizando a adenilato cinase repórter termoestável.

A ordem precisa com a qual se levam a cabo estes passos da presente invenção não é crítica, desde que a adenilato cinase endógena seja destruída antes da adição de ADP e do teste para a formação de ATP. Assim, o método da presente invenção pode ser levado a cabo através do tratamento da amostra para destruir a sua adenilato cinase endógena, adicionando adenilato cinase repórter acoplada a um anticorpo específico para o analito, isolando a adenilato cinase repórter que está especificamente associada ao analito e depois adicionando ADP e testando a formação de ATP. Alternativamente, o teste pode ser levado a cabo através da adição a uma amostra de uma adenilato cinase repórter acoplada a um anticorpo específico para o analito, do isolamento da adenilato cinase repórter que está especificamente associada com o analito, da destruição de qualquer adenilato cinase endógena que possa estar presente e depois da adição de ADP e do teste para a formação de ATP. Outra alternativa é adicionar a adenilato cinase repórter acoplada a um anticorpo específico para o analito

à amostra, tratar a amostra para destruir a adenilato cinase endógena, isolar a adenilato cinase repórter especificamente associada ao analito e depois adicionar ADP e testar para a formação de ATP.

Numa realização específica da invenção descrita abaixo em mais detalhe, um teste é levado a cabo através dos seguintes passos:

1. Um anticorpo específico para o analito é imobilizado numa fase sólida.
2. A amostra é combinada com a fase sólida de modo que o analito presente na amostra possa se ligar ao anticorpo.
3. A fase sólida é lavada, removendo assim os componentes da amostra e retendo na fase sólida apenas qualquer analito que se tenha ligado ao anticorpo imobilizado.
4. Adiciona-se uma composição repórter à fase sólida, compreendendo a composição repórter um anticorpo que é específico para o analito e que está ligado a uma adenilato cinase termoestável.
5. A fase sólida é lavada, removendo-se assim componentes não ligados da composição repórter e retendo a composição repórter que se ligou especificamente ao analito, estando o próprio analito ligado ao anticorpo imobilizado.
6. A fase sólida é aquecida para desnaturar qualquer adenilato cinase endógena que possa estar presente mas sem desnaturar a adenilato cinase termoestável.

7. Opcionalmente, adiciona-se uma ATPase termolábil à fase sólida para remover qualquer ATP endógeno.

8. Opcionalmente a fase sólida é aquecida para destruir a ATPase termolábil do passo 7.

9. Adiciona-se ADP à fase sólida a qual é depois testada para a presença e/ou quantidade de ATP.

10. Se for detectado ATP, tal indica que a adenilato cinase na composição repórter estava ligada à fase sólida, ou seja, o analito estava presente na amostra.

A fase sólida é adequadamente seleccionada de fases sólidas convencionais utilizadas em testes imunológicos, e pode por exemplo ser um poço de microplacas, uma coluna, uma vareta ou uma esfera, tal como uma esfera de látex ou magnética. Exemplos de outros suportes sólidos adequados são a nitrocelulose, cloreto de polivinilo, poliestireno, papel diazotado, esferas activadas com uma gama de agentes reticulantes apropriados e esferas de proteína A de *S. aureus*. Mais suportes termoestáveis são proporcionados por plásticos tais como polipropileno, policarbonato, óxido de polivenilenina polimetilpenteno e fluoropolímeros (por exemplo PTFE, PFA, FEP e EFTE). O suporte sólido pode ter várias formas dependendo do tipo de suporte e das condições necessárias. Geralmente serão microplacas, em que cada poço individual serve como uma câmara de incubação independente. De modo semelhante, podem ser utilizadas membranas ou folhas limitando a difusão lateral. Alternativamente, podem ser utilizadas esferas, as quais permitem a realização de

reacções separadas em tubos diferentes sob condições diferentes. Estes materiais de matriz individuais podem ser adquiridos numa variedade de formas, adequadas para o tipo particular de teste.

A luciferina de pirilampo catalisa a oxidação de D(-)luciferina na presença de ATP-Mg²⁺ e O₂ para gerar oxiluciferina e luz. O rendimento quântico desta reacção (0,88) é o mais elevado conhecido para reacções bioluminescentes (Gould e Subramini, 1988). No entanto, a luciferase de pirilampo é relativamente instável e por isso verificou-se não ser adaptável como uma marcação para teste imunológico (Krick, 1993). Em contraste, na presente invenção, a enzima luciferase pode ser operada nas suas condições óptimas e não é exposta a tratamentos rigorosos tais como acoplamento a anticorpos.

Foram já caracterizadas diversas adenilato cinases termoestáveis (Ki e Takahisa, 1988; Lacher e Schäfer 1993; Rusnak *et al.*, 1995) e são adequadas para utilização na presente invenção. Uma foi clonada e sobre-expressa em *E. coli* (Bonisch *et al.*, 1996) e dispõe-se já das sequências completas de uma gama de outras como resultado de programas de sequenciação de genomas. Dispõe-se assim de um esquema de purificação rápido e simples para produzir adenilato cinase homogénea. Inicialmente, pode-se utilizar um passo de desnaturação térmica para desnaturar o globo das proteínas de *E. coli* (~90-95%) enquanto se retém a actividade termoestável em solução.

Este procedimento foi utilizado com sucesso em realizações da presente invenção com vários enzimas termoestáveis

recombinantes. Subsequentemente, pode ser utilizado um procedimento de purificação por afinidade geralmente aplicável para se obter a enzima purificada. Tal envolve a ligação do enzima a uma matriz corada mimética e a desorção selectiva com o inibidor da adenilato cinase P^1 , P^5 -de (adenosina-5') pentafofato (Rusnak *et al.*, 1995). A utilização de enzimas estáveis permite ultrapassar problemas associados com a inactivação aquando da ligação com anticorpos, e proporciona também outros benefícios. Uma vez que a actividade é extremamente termoestável, uma vez ocorrida a ligação do substrato e a remoção de componentes que não se ligaram, a temperatura pode ser aumentada até, por exemplo, 70-90°C, desnaturando e inactivando qualquer adenilato cinase mesofílica contaminante. Adicionalmente, através de arrefecimento, pode-se adicionar uma ATPase mesofílica (ou apirase) para remover qualquer ATP residual. Isto garante que não está presente qualquer ruído de fundo provocado pela presença de ATP ou AK. Uma incubação suplementar pelo calor inactiva a ATPase mesofílica e adiciona-se ADP de modo a gerar ATP derivado exclusivamente da adenilato cinase termoestável. Este ATP está então disponível para detecção convencional por bioluminescência de luciferina-luciferase. Um sinal de ATP potencialmente contaminante é agora apenas possível de três fontes: AK termoestável não ligada especificamente, ADP contaminado com ATP e luciferase contaminada com AK. Estas duas últimas podem ser eliminadas através da utilização de reagentes de elevada pureza e através de manuseamento cuidado. No entanto, em cada caso, a contaminação resultaria num sinal positivo, ou seja uma amostra não contendo PrP poderia ser determinada como tendo PrP, mas o inverso não ocorreria.

Uma adenilato cinase termoe estável conhecida *Methanococcus jannaschii* tem uma actividade muito específica, nomeadamente $89 \mu\text{mol de ATP mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Isto corresponde a uma produção superior a 2000 min^{-1} e o potencial para produzir mais que $1,2 \times 10^5$ moléculas de ATP por molécula de AK numa hora de incubação. Uma vez que 6×10^8 de ATP são detectáveis por bioluminescência de ATP, seria detectável um número tão baixo como 5×10^3 moléculas de PrP. Isto é 40 vezes mais baixo do que o número mínimo de moléculas PrP^{Sc} identificadas como constituindo uma única unidade infecciosa. Uma margem de segurança adicional é proporcionada pela presença de quantidades muito mais elevadas de PrP^C em relação a PrP^{Sc} indicando que a presente invenção excede a sensibilidade necessária em várias ordens de grandeza.

Como utilização alternativa do anticorpo específico ao analito para imobilizar o analito na fase sólida, a fase sólida pode ser proporcionada com o analito nela directamente imobilizado sem a presença do primeiro anticorpo. Por exemplo, a fase sólida pode ela própria ser um substrato potencialmente contaminado por uma quantidade, tipicamente uma quantidade vestigial, de analito. É este o caso relativamente a equipamento médico potencialmente contaminado por quantidades muito pequenas de proteína priónica que estão efectivamente imobilizadas à superfície do equipamento. O teste é útil para o teste da presença do analito por exemplo após a limpeza do equipamento. O analito pode também ser imobilizado de forma não específica.

O método da presente invenção pode ser levado a cabo utilizando equipamento relativamente pouco dispendioso num laboratório convencional. A utilização de um método da presente invenção para determinar quando o nível de proteína priónica foi reduzido abaixo do detectável e, por extrapolação, podem ser utilizados níveis infecciosos para confirmar a descontaminação de instrumentos, equipamento e outros itens potencialmente expostos a agentes infecciosos de TSE, permitindo a sua utilização segura.

Na utilização de uma realização específica da invenção, pode-se repetir um primeiro passo de lavagem diversas vezes, da acordo com a prática convencional neste campo, sendo o objectivo remover da fase sólida todos os componentes da amostra que não se ligaram especificamente ao anticorpo imobilizado. Assim, se não houver qualquer analito presente na amostra então o passo de lavagem irá remover a totalidade da amostra e o teste não dará qualquer sinal, indicando que não estava presente qualquer analito. O anticorpo na composição repórter liga-se ao mesmo analito que o anticorpo imobilizado na fase sólida. O anticorpo e a composição repórter podem de facto possuir as mesmas propriedades de ligação que o anticorpo imobilizado, apesar de constituir uma alternativa o anticorpo repórter se ligar a um local diferente no mesmo analito. O anticorpo repórter é preferentemente seleccionado de tal modo que a quantidade de composição repórter que se liga ao analito é substancialmente proporcional à quantidade de analito presente. O segundo passo de lavagem pode, em linha com o primeiro, ser repetido por diversas vezes de acordo com prática convencional, sendo o objectivo do segundo passo de lavagem a remoção de todos os componentes da composição

repórter que não se ligaram especificamente ao analito, o qual se ligou especificamente ao anticorpo imobilizado. Assim, se não estiver presente qualquer analito na fase sólida o segundo passo de lavagem removerá toda a composição repórter, levando finalmente a que nenhum sinal seja gerado no teste, indicando que nenhum analito estava presente na amostra em investigação.

Esta última realização representa a utilização dos princípios da invenção num teste de captura com dois anticorpos, muitas vezes referido como um teste sanduíche. A invenção tem igualmente aplicação em testes de captura por antigénios e testes de captura por anticorpos.

Assim, ainda noutra realização da invenção, um teste para um analito compreende especificamente a associação de um analito com uma adenilato cinase repórter, em que o analito está ligado a uma fase sólida. Esta realização pode ser referida como sendo do tipo captura por anticorpo. A ligação do analito à fase sólida e depois o tratamento da fase sólida para evitar a ligação não específica - deste modo, diversos componentes de uma amostra ligam-se à fase sólida, componentes esses que incluem o analito de interesse se presente na amostra e o tratamento subsequente assegura que quando o anticorpo é adicionado para detectar o analito aquele anticorpo se ligará apenas à fase sólida se o analito estiver presente.

A utilização de calor para desnaturar qualquer cinase endógena que possa estar presente foi levada a cabo numa realização acima como o passo 6., apesar de como mencionado este passo poder ser levado a cabo em circunstâncias

diferentes no teste desde que seja levado a cabo antes da adição de ADP. Além disso, o ADP pode ser adicionado antes da adição da ATPase desde que a ATPase não tenha actividade de ADPase. A temperatura e duração adoptadas são escolhidas de modo a serem suficientes para desnaturar a adenilato cinase endógena deixando intacta a adenilato cinase repórter, sendo esta adenilato cinase preferentemente uma enzima termoestável. Numa realização específica descrita abaixo, verificou-se ser eficaz aquecer a uma temperatura de cerca de 90°C durante cerca de 10 minutos. Adenilato cinases suficientemente termoestáveis podem ser encontradas em diversos géneros de bactérias e archaea. Nas Bactérias, podem por exemplo ser produzidas pelos membros dos géneros *Alicyclobacillus*, *Ammonifex*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Caldariella*, *Calderobacterium*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldocellum*, *Caloramator*, *Carboxydotherrmus*, *Chloroflexus*, *Clostridium*, *Coprothermobacter*, *Dictyoglomus*, *Fervidobacterium*, *Geotoga*, *Hydrogenobacter*, *Hydrogenothermophilus*, *Meiothermus*, *Petrotoga*, *Rhodothermus*, *Rubrobacter*, *Thermoactinomyces*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobium*, *Thermobacterium*, *Thermobacteroides*, *Thermobifida*, *Thermobispora*, *Thermobrachium*, *Thermochromatium*, *Thermocrispum*, *Thermodesulfobacterium*, *Thermodesulforhabdus*, *Thermodesulfovibrio*, *Thermohydrogenium*, *Thermomicrobium*, *Thermomonospora*, *Thermonema*, *Thermonospora*, *Thermopolyspora*, *Thermosipho*, *Thermosphaera*, *Thermosyntropha*, *Thermoterrabacterium*, *Thermotoga* e *Thermus*. Entre as archaea, podem por exemplo ser produzidas por membros dos géneros *Acidianus*, *Aeropyrum*, *Archaeoglobus*, *Desulfurococcus*, *Desulfurolobus*, *Ferroglobus*, *Hyperthermus*, *Metallosphaera*,

Methanobacterium, *Methanococcus*, *Methanopyrus*,
Methanothermus, *Picrophilus*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*,
Pyrodictium, *Pyrolobus*, *Staphylothermus*, *Stetteria*,
Stygiolobus, *Sulfolobus*, *Sulfophobococcus*, *Thermococcus*,
Thermofilum, *Thermoplasma* e *Thermoproteus*.

É preferido, apesar de opcional, também levar a cabo um passo de remoção de ATP endógeno da amostra utilizando uma ATPase termolábil e subsequentemente destruir esta enzima, de novo utilizando convenientemente calor. Numa realização específica da invenção descrita abaixo, uma incubação de cerca de 10 minutos foi eficaz utilizando ATPase termolábil e esta enzima foi depois desnaturado através de temperaturas de cerca de 90°C durante 5 minutos. O ATP pode ser libertado das células ou outros componentes celulares após aquecimento. Assim, prefere-se que o passo de remoção de ATP seja levado a cabo após um aquecimento inicial da amostra, por exemplo após o passo de utilização do calor para destruir a adenilato cinase endógena.

É ainda preferido utilizar ADP ultra-pura, sem ATP, de modo a evitar o risco de ruído de fundo devido a ATP contaminante. Como alternativa para a utilização de uma forma ultra-pura de ADP pré-purificada, pode-se gerar ADP livre de ADP *in situ* através da adição de uma cinase mesofílica essencialmente irreversível e estritamente dependente em ATP e do seu substrato, por exemplo, hexocinase de levedura e glucose. O ATP presente é convertido em ADP e a cinase é inactivada por aquecimento antes da incubação com a adenilato cinase termoestável. Do mesmo modo, é também preferido utilizar outros reagentes sem contaminação de cinase ou ATP. A luciferina e a

luciferase podem conter contaminação com adenilato cinase e é então preferido utilizar formas purificadas daquelas, ou formas recombinantes de luciferase. A luciferina é preferentemente o isómero D dado que o isómero L pode inibir a reacção de luminescência.

A invenção é de particular aplicação à detecção de doenças tais como vCJD, a qual até Dezembro de 1999 tinha resultado em aproximadamente 50 mortos no Reino Unido, com registos de mais casos em França e na Irlanda. Devido ao período de incubação longo e variável para esta nova doença, existe no entanto correntemente uma elevada incerteza relativamente ao número total de indivíduos no Reino Unido potencialmente ou já infectados com vCJD. Os indivíduos afectados apresentarão frequentemente sintomas que requerem um exame neurológico ou podem meramente ser submetidos a procedimentos cirúrgicos comuns tais como amigdalectomia e apendicectomia em conjunto com a população em geral. Verificou-se que uma grande variedade de tecidos, incluindo as amígdalas e o apêndice, albergava potencial infeccioso de vCJD além do cérebro e da corda espinal. Isto resulta num potencial de transmissão da infecção significativo por exposição a instrumentos cirúrgicos contaminados, uma vez que a eliminação completa do potencial infeccioso não é conseguida através de procedimentos de esterilização convencionais.

Apesar da natureza do agente responsável não ser totalmente compreendida, o seu carácter infeccioso parece estar muito proximamente associado com a conformação anormal (PrP^{Sc}) de uma proteína normal do sistema nervoso central (PrP^{C}), designada a proteína "priónica". Apesar do prião não ser

universalmente aceite como sendo apenas responsável pelo carácter infeccioso, existe uma concordância geral relativamente à sua íntima associação à infecção. A detecção da proteína priónica é, deste modo, considerada como uma excelente medição da potencial presença de potencial infeccioso de TSE. Os priões têm uma tendência para formar agregados insolúveis e são altamente hidrofóbicos. Existe, deste modo, dúvida considerável relativamente à possibilidade de desprendê-los de forma fiável de superfícies e solubilizá-los para detecção por um teste imunológico de ligação a enzima convencional. Isto é particularmente importante para itens tais como instrumentos cirúrgicos, nos quais a presença de uma quantidade muito pequena de material residual após descontaminação tentada, poderia originar transmissão iatrogénica da infecção por vCJD. Numa realização específica, a invenção descreve um teste que permite a detecção *in situ* da proteína priónica (Prion ELISA 1-3).

Dado que a presença de qualquer resíduo contendo ou PrP^C ou PrP^{Sc} indica que o item testado não está completamente limpo, o anticorpo seleccionado não precisa de discriminar entre os diferentes conformémeros. Isto aumenta grandemente a gama de anticorpos disponível. A conformação PrP^{Sc} é, no entanto, consideravelmente mais persistente e em geral é a forma associada com o potencial infeccioso que será detectada.

A hormona estimuladora da tiróide (TSH) é secretada pela pituitária anterior do cérebro. Esta hormona actua na tiróide, estimulando a produção das hormonas T3 e T4. O nível de TSH é controlado através de um sistema de

retroacção negativo que mantém um nível constante de TSH livre. O hipertiroidismo é uma doença causada por níveis reduzidos de TSH em circulação.

Os testes de diagnóstico para o diagnóstico de hipertiroidismo devem ser capazes de distinguir entre hipertiroidismo e níveis normais de hormona em circulação. Os testes deverão ser capazes de monitorizar um sinal muito baixo sem interferência. Além disso, os testes para a medição de TSH em circulação deverão ter uma gama dinâmica alargada. Uma realização específica da invenção, descrita abaixo, proporciona um teste para uma hormona do sangue.

Os testes para consumo de drogas são rotineiramente realizados em laboratórios clínicos, clínicas de reabilitação da toxicodependência, técnicos de saúde e unidades clínicas da justiça. Os dados obtidos são frequentemente utilizados para suportar requerimentos envolvendo a custódia de crianças. A decisão de renovação da custódia de uma criança assenta frequentemente nos resultados de análises a drogas em urina demonstrando a abstinência prolongada de consumo de drogas pelo progenitor. Em muitos países, é obrigatória a análise aleatória à urina em unidades governamentais sensíveis, nas forças armadas e nas indústrias de transportes. Existe uma necessidade para testes mais sensíveis e rápidos para drogas.

O principal agente produzido por *Cannabis sativa* é δ -tetra-hidrocanabinol (THC). Apenas uma pequena quantidade de THC é excretada na urina e a maioria dos testes são desenhados para detectar o principal produto de oxidação inactivo,

ácido 11-nor- δ -tetra-hidrocanabinol-9carboxílico (11-COOH.THC). Uma realização específica da invenção, descrita em maior detalhe abaixo, proporciona um teste para o metabolito da cannabis.

A urina é um meio complexo, o qual exacerba o problema de se distinguir um sinal daquele do ruído de fundo de um instrumento. Tal é ultrapassado em testes comerciais atribuindo uma concentração limite, acima da qual a amostra é considerada positiva, que excede em várias ordens de grandeza o limite de detecção. Na prática tal resulta num número de amostras positivas serem consideradas como negativas uma vez que os respectivos sinais se situam abaixo do limite definido. Testes mais sensíveis tornam mais fácil a discriminação entre amostras positivas e negativas.

Muitos dos testes comerciais actuais envolvem o teste "enzyme multiplied immunoassay" (EMIT). Este teste ELISA envolve a competição entre a droga na amostra em teste e a droga marcada com glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). O conjugado droga G6PH é inactivo quando imobilizado numa fase sólida compreendendo um anticorpo específico para droga de interesse. Ao se remover o conjugado droga-G6PH livre este é detectado através da alteração da densidade óptica a 340 nm, à medida que o NAD^+ é reduzido a NADH e o substrato glucose-6-fosfato é oxidado. Outra realização específica da invenção proporciona um teste para metabolitos de cocaína na urina.

Sabe-se que a infecção do vírus do papiloma humano (HPV) +e um pré-requisito para a oncogénese de várias formas de

cancro cervical. Actualmente faz-se o rastreio da presença de infecção viral em esfregaços cervicais como precursor de previsão da oncogénese. Outra realização específica da invenção é o rastreio rápido da presença de infecção viral das células cervicais.

As bibliotecas combinatoriais são ferramentas poderosas para descoberta de novos fármacos. A sensibilidade do método de rastreio é um limite importante ao número de combinações que podem ser rastreadas numa biblioteca combinatorial. A biblioteca compreendendo todas as combinações de um hexa-péptido é composta por 20^6 combinações possíveis. Ensaio mais sensíveis para a detecção de sequências-alvo permitiriam o rastreio de bibliotecas mais extensas. Ainda noutra realização específica da invenção utiliza-se uma AK termossensível para fazer o rastreio numa biblioteca de péptidos combinatorial de uma sequência que se liga a ligando específico de interesse. Este ligando pode ser um receptor ou uma enzima.

As toxinas botulínicas são produzidas pela espécie bacteriana *Clostridium botulinum* e são agentes causadores de botulismo alimentar. O método aceite mais sensível para a detecção de toxinas botulínicas é o teste de letalidade em ratos. Poucos testes com base na técnica de ELISA utilizando metodologia de amplificação convencional têm a sensibilidade necessária. Ainda outra realização da invenção descreve um teste com base ELISA para a detecção da neurotoxina botulínica em alimentos.

A presente invenção proporciona também, num segundo aspecto, um conjunto com reagentes para a determinação da presença e/ou quantidade de analito numa amostra, compreendendo:

uma fase sólida na qual está imobilizado o analito ou um anticorpo específico para o analito;

uma composição repórter compreendendo uma adenilato cinase termoestável acoplada a um anticorpo específico para o analito; e

ADP mais, opcionalmente, reagentes associados para a conversão de ADP em ATP através de adenilato cinase termoestável.

Um componente opcional adicional do dispositivo é ATPase termolábil.

Os componentes do dispositivo podem ser combinados num conjunto de teste para a determinação da presença e/ou a quantidade de uma analito numa amostra.

O teste para a formação de ATP pode ser levado a cabo utilizando diversos meios convencionais, incluindo a formação de cor. Prefere-se particularmente a utilização de reagentes luciferina/luciferase em combinação com curvas de calibração para determinar tanto a presença como a quantidade de analito. A presença de iões magnésio é geralmente necessária para a formação de ATP, e são fornecidos detalhes suplementares na publicação de técnica anterior GB-A-2304892, cujo conteúdo está aqui incorporado por referência.

A presente invenção foi descrita em relação à utilização de cinases, em particular adenilato cinase termoestável. Mais geralmente, a invenção proporciona ainda, num terceiro aspecto, um teste para a determinação da presença e/ou quantidade de uma analito numa amostra, compreendendo:

a exposição da amostra a uma composição de detecção, a composição de detecção compreendendo um anticorpo específico para o analito acoplado a um enzima termoestável;

o isolamento (i) da composição de detecção que se ligou especificamente ao analito da (ii) composição de detecção que não se ligou especificamente ao analito;

a determinação da presença e/ou da quantidade de composição de detecção que se ligou ao analito através da adição de um substrato para o enzima termoestável;

em que antes de se adicionar o substrato se destroem as enzimas não termoestáveis através da aplicação do calor.

A enzima termoestável é adequadamente uma cinase e pode ser seleccionada de piruvato cinase, adenilato cinase e acetil cinase. Todas estas catalisam a formação de ATP a partir de ADP e podem ser utilizadas com um reagente tal como luciferina/luciferase.

Prefere-se que antes da adição do substrato se remove produto de fundo, o que ajuda a limitar ou reduzir o ruído de fundo no teste. O produto de fundo é adequadamente

removido através da acção de enzima ou por inactivação térmica.

Também se descreve um equipamento para determinar a presença e/ou a quantidade de analito numa amostra, compreendendo:

uma fase sólida na qual está imobilizado o analito ou um anticorpo específico para o analito;

uma composição repórter compreendendo uma enzima termoestável acoplada a um anticorpo específico para o analito; e

um substrato para o enzima termoestável.

Este dispositivo confere a vantagem de que o sinal obtido para a enzima termoestável é substancialmente não contaminado por quaisquer sinais de fundo ou ruído de fundo que podem de outro modo ser obtidos através da acção de enzimas não termoestáveis do substrato.

Sinais de fundo e/ou ruído de fundo são assim reduzidos e possivelmente mesmo inteiramente removidos. Na utilização de um método do terceiro aspecto da presente invenção, um analito é imobilizado numa fase sólida, uma amostra é combinada com a fase sólida e então a fase sólida é lavada, a fase sólida é exposta a uma composição detectora incluindo um anticorpo específico ao analito acoplado a um enzima termoestável, a fase sólida é então de novo lavada, a fase sólida é então aquecida para desnaturar enzimas não termoestáveis mas não de modo a desnaturar a enzima

termoestável da composição detectora, e a quantidade da enzima termoestável especificamente ligado ao analito o qual por sua vez está especificamente ligado à fase sólida é determinada através da adição de um substrato para a enzima termoestável e determinando quanto produto então se obtém. A imobilização do analito pode ser levada a cabo através da utilização de um anticorpo específico para o analito imobilizado na fase sólida, ou através de ligação directa do analito à fase sólida.

Ainda outro aspecto da invenção proporciona um conjugado compreendendo um anticorpo conjugado a uma adenilato cinase termoestável para utilização no teste de qualquer aspecto precedente da invenção. O anticorpo pode adequadamente ligar-se a um analito seleccionado de uma proteína, um microrganismo, um péptido, uma toxina, uma hormona e um metabolito. Numa realização específica, o anticorpo liga-se a uma proteína priónica.

Ainda outro aspecto da invenção refere-se à utilização do conjunto de reagentes da invenção ou do conjugado da invenção num teste para um analito. A presente invenção é assim adequadamente empregue para investigar a efectividade de uma gama de agentes com potencial para limpeza de superfície de superfícies contaminadas para remover material celular e PrP. As superfícies de aço, vidro e plástico podem todas ser investigadas para determinar se qualquer uma é particularmente recalcitrante à limpeza, e pode-se utilizar PTFE como superfície de controlo para efeitos comparativos.

As adenilato cinases termoestáveis podem ser purificadas de diversos microrganismos termofílicos e hipertermofílicos utilizando uma combinação de cromatografia de permuta iónica, filtração em gel e cromatografia por afinidade. As adenilato cinases podem ser clonadas e expressas em *E. coli* em bibliotecas de plasmídeos ou fagos. Pode-se realizar o rastreio da expressão directa (após plaqueamento de réplicas) através do exame das colónias recolhidas relativamente à actividade de adenilato cinase termoestável por incubação com ADP, seguida de um ensaio de bioluminescência de ATP.

Está disponível uma gama de reagentes de acoplamento comercialmente disponíveis para conjugação anticorpo-adenilato cinase. Tanto o anticorpo e a adenilato cinase podem voltar a ser purificados por cromatografia por afinidade.

Em certas utilizações da invenção, tais como no caso em que não existe adenilato cinase endógena ou nenhuma contaminação microbiana da amostra ou se o risco de tal contaminação é removido, é opcional dispensar o passo de remoção da adenilato cinase endógena. O método da invenção compreende então a associação específica do analito com uma adenilato cinase repórter, adicionando ADP e testando a formação de ATP. Preferentemente, antes da adição de ADP, o ATP é substancialmente removido, por exemplo através da utilização de uma ATPase.

Descrevem-se agora realizações específicas da invenção.

O teste da presente invenção pode envolver a utilização de reagentes e equipamento convencional necessários para os testes conhecidos de bioluminescência ATP/AK, suplementado por um termociclador (disseminado e disponível a baixo custo para PCR), mais duas enzimas específicas, uma ATPase termolábil e uma adenilato cinase termoestável.

Exemplo 1: Teste para a proteína priônica

ELISA para prião - 1

(Faz-se referência aos desenhos em anexo)

1. Bloqueio

Um item convencional de equipamento potencialmente infeccioso apresenta uma larga gama de material biológico ligado à superfície. Este inclui tanto ATP e adenilato cinases mesofílicas (mAK) celular e livre. Secciona-se uma pequena área à superfície para formar uma câmara (não apresentado, volume de ~ 1 mL) na qual podem ser adicionados ou removidos reagentes. Para evitar a ligação não específica do conjugado anticorpo-adenilato cinase termoestável, as superfícies expostas, incluindo a área inclusa do instrumento cirúrgico, são "bloqueadas" por incubação na presença de tampão contendo, por exemplo, o detergente não iónico Tween 20 (1% v/v) em PBS a 10 mM e pH 7 durante 1 hora. A câmara é então lavada duas vezes com Tween 20 a 0,05% em PBS a 10 mM e pH 7 antes da ligação ao conjugado anticorpo-adenilato cinase termoestável.

2. Ligação do Anticorpo

A adenilato cinase termoestável de *Bacillus stearothermophilus* liga-se a um anticorpo policlonal purificado por afinidade através de um agente reticulante heterobifuncional passível de ser clivado nos grupos tiol, N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP). O anticorpo é utilizado através de procedimentos convencionais contra um péptido sintético correspondendo a uma região conservada da proteína priónica, acoplado a hemocianina de lapa activada por maleimida. O conjugado activo (50 µL) é adicionado ao tampão na câmara e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente.

3. Lavagem

Uma câmara é lavada manualmente ou através da utilização de um dispositivo da lavagem automática com seis mudanças de tampão contendo 0,2 M de NaCl, 0,05% de Tween 20 em 10 mM de PBS, pH 7. Estes servem para remover o conjugado não ligado e qualquer material biológico apenas fracamente ligado à superfície.

4. Clivagem do Agente de Ligação

Adiciona-se ditiotreitol a pelo menos à última lavagem a uma concentração final de 25 mM e incubação à temperatura ambiente é continuada durante 30 minutos. Isto cliva a unidade adenilato cinase termoestável do anticorpo ligado proporcionando uma molécula sinal livre em solução proporcional à quantidade original da proteína priónica presente.

ELISA para prião 2

5. Recuperação/transferência

Nesta fase, a solução contendo adenilato cinase termoestável é aspirada com uma pipeta e transferida para os poços de uma microplaca termoestável de um luminômetro. A transferência de ATP e de adenilato cinase mesofílica não específicos de fundo também ocorre, dando o potencial de estimativa por excesso da proteína priônica presente na superfície original do instrumento.

6. Inativação Térmica

A adenilato cinase utilizada é termoestável. A temperatura é, deste modo, aumentada a 80°C e mantida a esta temperatura durante 10 minutos num termociclador de microplaca. Este procedimento desnatura termicamente e inativa qualquer adenilato cinase mesofílica contaminante residual deixando uma preparação contendo apenas a adenilato cinase termoestável específica proporcional ao teor em proteína priônica da amostra.

7. Hidrólise de ATP

A placa é então arrefecida e adicionam-se 0,05 unidades mL⁻¹ de adenosina desaminase e apirase de *Solanum tuberosum* adicionada antes da incubação a 30°C durante 30 minutos. Esta enzima remove qualquer ATP residual transportado da amostra original.

8. Inativação Térmica

A combinação dos passos 6 & 7 assegura que não esteja agora presente qualquer fundo de ATP e AK. É então utilizada mais uma incubação com calor tal como no passo 6 para inactivar a apirase mesofílica.

ELISA para prião 3

9. Geração de ATP

Adiciona-se ADP ultra-puro (0,1 mM) e livre de ATP em conjunto com iões de magnésio (10 mM) de modo a gerar ATP derivado exclusivamente da adenilato cinase termoestável. A incubação é levada a cabo a 80°C durante 30 minutos. O ATP fica então disponível para a detecção por D-luciferina-luciferase.

10. Bioluminescência de ATP

Os poços contendo ATP foram arrefecidos a 25°C e adicionou-se D-luciferina ultra-pura sintética e luciferase livre de adenilato cinase a uma concentração de, respectivamente 40 μM e 1 mg.L^{-1} . A bioluminescência dependente de ATP é lida independentemente em cada poço numa luminómetro de microplacas e os resultados são registados. A quantidade de luz gerada correlaciona-se directamente com a quantidade original de proteína priónica na amostra.

Exemplo 2: Um teste para um microrganismo

Um microrganismo é imobilizado numa superfície sólida por componentes da amostra que não se ligam especificamente incluindo o microrganismo à fase sólida, tratando a fase

sólida para evitar mais ligação não específica a essa superfície e lavando (utiliza-se um poço de microplacas neste caso mas quaisquer outras fases sólidas conhecidas são adequadas, tais como uma esfera de látex ou uma esfera magnética). Um anticorpo específico para o microrganismo e acoplada a uma adenilato cinase termoestável é introduzida e permite-se ligar, antes de mais ligação/recuperação.

No teste com AK conhecido, a sensibilidade estaria limitada pelo nível da concentração de amostra possível antes que os níveis de ATP de fundo e de AK não específica ocultassem qualquer sinal.

A amostra é agora aquecida a cerca de 90°C durante cerca de 10 minutos no tampão de extracção celular (num termociclador) para desnaturar qualquer AK presente e libertar qualquer ATP que possa estar no interior do microrganismo. A amostra é então arrefecida a 37°C e é adicionada uma ATPase termolábil. A amostra é incubada durante cerca de 10 minutos para remover o ATP de fundo, então a temperatura é aumentada a cerca 90°C para desnaturar a ATPase termolábil.

De seguida, o ADP é adicionado e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP e o ATP. Esta incubação gera ATP exclusivamente através da adenilato cinase termoestável. O ATP assim gerado é então analisado por bioluminescência de ATP convencional e é directamente proporcional à concentração do alvo presente.

Exemplo 3: Um teste para um microrganismo

Um microrganismo é capturado através de uma técnica de captura convencional, utilizando um anticorpo específico imobilizado numa superfície sólida (utiliza-se um poço de microplacas neste caso mas são adequadas outras fases sólidas conhecidas, tais como uma esfera de látex ou uma esfera magnética). Após lavar/recuperar, introduz-se um segundo anticorpo específico para o microrganismo e acoplado à adenilato cinase termoestável e permite-se a ligação antes de nova lavagem/recuperação.

Assim, o método do Exemplo 1 é repetido mas utilizando um microrganismo imobilizado utilizando o anticorpo.

Exemplo 4: Um teste para hormona no sangue

Um anticorpo específico para a subunidade alfa de TSH é imobilizado numa superfície sólida. A superfície sólida é tratada para evitar mais ligação não específica. A fase sólida é lavada com tampão de lavagem, opcionalmente contendo detergente. É adicionada uma amostra de soro sanguíneo para teste.

A amostra é então incubada, por exemplo: 37°C durante 60 min, permitindo à TSH livre na amostra ligar-se ao anticorpo de captura. A fase sólida é então lavada para remover material ligado não especificamente e adiciona-se um anticorpo específico para a subunidade beta de TSH, ao qual foi conjugada a enzima repórter adenilato cinase termoestável. O conjugado foi então incubado a 37°C durante 60 minutos, ou equivalente.

O material não ligado é então removido por lavagem e qualquer ATP endógeno presente na fase sólida é removido através da adição de adenosina-5'-trifosfatase (a apirase é uma alternativa). A amostra é então aquecida a 90°C, ou equivalente, para desnaturar e inactivar qualquer adenilato cinase mesofílica que possa estar presente.

Adiciona-se adenosina difosfato (ADP) e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP a ATP. Esta incubação gera ATP exclusivamente proveniente da adenilato cinase. O ATP gerado é então medido por tecnologia de bioluminescência de ATP convencional utilizando a reacção de luciferina/luciferase. O sinal da adenilato cinase contaminante nos reagentes luciferina/luciferase pode ser eliminado através da adição de um inibidor enzimático específico. A bioluminescência de ATP medida é directamente proporcional à concentração da TSH na amostra original testada.

Não obstante a fase sólida utilizada acima ser uma microplaca, são adequadas outras fases sólidas, tais como uma esfera de látex ou magnética. A amostra testada pode ser sangue completo ou outro fluido corporal, em vez de sangue, e o anticorpo pode ser um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal.

Exemplo 5: Um teste para metabolitos da cocaína na urina

Utiliza-se G6PDH termoestável como enzima repórter. Um anticorpo de teste específico para esta classe de droga de interesse é imobilizada numa microplaca como fase sólida. A

fase sólida é tratada de modo a evitar mais ligações não específicas. A fase sólida é lavada com tampão de lavagem, o qual pode ou não conter detergente. Uma amostra de urina a testar é adicionada em conjunto com o conjugado droga-G6PDH. A droga-G6PDH é termoestável e não é activa quando ligada ao anticorpo imobilizado na fase sólida.

A amostra é então incubada, a 37°C durante 60 mins. O conteúdo da microplaca é então removida e aquecida a 90°C para inactivar qualquer G6PDH mesofílico presente. A temperatura é então mantida a 90°C e adiciona-se o substrato glucose-6-fosfato e o co-factor NAD^+ no tampão apropriado. A velocidade de alteração da absorvância a 340 nm é medida e é directamente proporcional ao teor de metabolito da droga na amostra testada.

Outro repórter para este teste é uma adenilato cinase termoestável. O anticorpo de teste específico para a classe de droga de interesse é imobilizado numa fase sólida. A fase sólida é tratada para evitar mais ligação não específica. A fase sólida é lavada com tampão de lavagem, a qual pode ou não conter detergente. A amostra de urina testada é adicionada em conjunto com o conjugado droga-adenilato cinase (AK). O conjugado droga-AK é termoestável e não é activo quando ligado ao anticorpo imobilizado na fase sólida.

A amostra é então incubada, por exemplo: 37°C durante 60 min. O conteúdo do poço da microplaca é então removido e o ATP endógeno é removido através da adição de adenosina-5'-trifosfatase ou apirase e incubação a 37°C. A amostra é

então aquecida a 90°C para inactivar qualquer adenilato cinase mesofílica presente.

Adiciona-se adenosina difosfato (ADP) e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP a ATP. Esta incubação gera ATP exclusivamente proveniente da adenilato cinase. O ATP gerado é então medido por bioluminescência de ATP convencional utilizando um sistema luciferina/luciferase. O sinal da adenilato cinase contaminante na luciferina/luciferase pode ser eliminado através da adição de um inibidor enzimático específico. A bioluminescência de ATP medida é directamente proporcional à concentração do metabolito da droga na amostra original testada.

Outras fases sólidas são adequadas, tais como uma esfera de látex ou magnética, e a amostra testada pode ser soro ou outro fluido corporal.

Exemplo 6: Testes para a detecção de ADN do vírus do papiloma humano

Teste A: Recolhem-se células cervicais e ressuspendem-se em tampão fosfato salino. A amplificação por PCR do HPV16, ou de sequência equivalente, é levada a cabo tal como descrito em Lambropoulous et al. (1994) Journal of Medical Virology: 43, 228-230 utilizando os iniciadores de consenso MY11 e MY09 e 30 ciclos de amplificação.

Os produtos de PCR são então transferidos e imobilizados numa microplaca revestida a nylon não carregado ou equivalente. É então adicionada e incubada uma sonda

oligonucleotídica específica para HPV16 (MY14) conjugada a uma adenilato cinase termoestável. O conjugado oligonucleótido-AK é preparado através de um método idêntico descrito para a síntese de conjugados ADN-anticorpo. O complexo compreende uma AK biotinilada e um complexo avidina-ADN biotinalado gerado utilizando metodologia disponível: Ruzicka et al. Science 1993, 260, 698-699.

O material não ligado é então removido através da lavagem e qualquer ATP endógeno presente na fase sólida é removido através da adição de adenosina-5'trifosfatase ou apirase. A fase sólida é então lavada e a amostra é aquecida a 90°C, ou equivalente, para desnaturar e inactivar qualquer adenilato cinase mesofílica que possa estar presente.

Adiciona-se adenosina difosfato (ADP) e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP a ATP. Esta incubação gera ATP exclusivamente proveniente da adenilato cinase. O ATP gerado é então medido por bioluminescência de ATP convencional utilizando uma reacção luciferina/luciferase. Um sinal positivo é indicador de infecção por HPV.

Teste B: Recolhem-se células cervicais e fixam-se a uma superfície sólida, uma membrana de nylon não carregada contida numa microplaca. As células são lisadas e o ATP endógeno presente na fase sólida é removido através da adição de adenosina-5'trifosfatase ou apirase. É então adicionada uma sonda oligonucleotídica específica para HPV16 (MY14: 5'CATACACCTCCAGCACCTAA3') conjugada a uma adenilato cinase termoestável. O conjugado oligonucleótido-

AK é preparado através de um método idêntico descrito para a síntese de conjugados ADN-anticorpo. O complexo compreende uma AK biotinilada e um complexo avidina-ADN biotinalado gerado utilizando metodologia disponível: Ruzicka et al. Science 1993, 260, 698-699.

Após incubação, 37°C durante 60 min, a amostra é aquecida a 90°C, ou equivalente, para desnaturar e inactivar qualquer adenilato cinase mesofílica que possa estar presente. Adiciona-se ADP e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP a ATP. Esta incubação gera ATP exclusivamente proveniente da adenilato cinase. O ATP gerado é então medido por bioluminescência de ATP convencional utilizando uma reacção luciferina/luciferase. Um sinal positivo é indicador de infecção por HPV.

Exemplo 7: Um teste para rastreio de bibliotecas combinatórias de péptidos

Os péptidos são sintetizados em pequenas esferas (100 µm-200 µm) utilizando metodologia convencional de síntese de péptidos em fase sólida. A sequência corresponde a uma biblioteca combinatória de péptidos gerada como descreveu Lam. et al. (1991) Nature (UK). 354, 82-84.

As esferas são divididas em 20 porções e um aminoácido separado é acoplado a cada porção. As esferas são então recombinadas, aleatorizadas, e divididas em 20 para adição do aminoácido seguinte. Este processo é repetido para construir uma biblioteca de péptidos com todas as combinações possíveis de aminoácidos. Em teoria, cada

esfera deveria ter a ela ligada uma sequência peptídica diferente. Após a síntese as esferas são lavadas e qualquer ATP endógeno é removido por adição de adenosina-5'-trifosfato ou apirase. Adiciona-se um conjugado ligando-AK termoestável e a amostra é aquecida a 90°C, ou equivalente, para desnaturar e inativar qualquer adenilato cinase que possa estar presente.

Adiciona-se adenosina difosfato (ADP) e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP a ATP. As esferas são então separadas em porções e procede-se ao rastreio da produção de luz gerada por uma reacção luciferina/luciferase utilizando um leitor de luminescência convencional. As porções que geram um sinal positivo são divididas em mais porções e voltam a ser rastreadas. Este processo é continuado utilizando um microscópio equipado com uma câmara de dispositivos de acoplamento de carga, até que seja identificado o sinal de uma única esfera. A esfera é então removida e a sequência do péptido é então determinada utilizando metodologia convencional de micro-sequenciação.

Exemplo 8: Um teste para a toxina botulínica

É imobilizado um anticorpo específico para a toxina botulínica numa fase sólida. A fase sólida pode ser uma microplaca mas outras fases sólidas são adequadas, tais como uma esfera de látex ou magnética. A fase sólida é tratada para evitar qualquer ligação não específica adicional. A fase sólida é lavada com tampão de lavagem, o qual pode ou não conter detergente. Adiciona-se uma amostra a testar. A amostra a testar é uma amostra alimentar, mas

pode ser sangue completo ou fluidos corporais. A amostra é então incubada, por exemplo: 37°C durante 60 min, permitindo a ligação da toxina livre na amostra ao anticorpo de captura. A fase sólida é então lavada para remover material não especificamente ligado e adiciona-se um anticorpo específico para a toxina butolínica ao qual foi conjugada uma enzima repórter adenilato cinase. Este anticorpo pode ser um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal. O conjugado é então incubado a 37°C durante 60 minutos, ou equivalente.

O material não ligado é então removido por lavagem e qualquer ATP endógeno presente na fase sólida é removido através da adição de adenosina-5'trifosfatase ou apirase. A fase sólida é lavada e a amostra aquecida a 90°C, ou equivalente, para desnaturar e inactivar qualquer adenilato cinase mesofílica que possa estar presente.

Adiciona-se adenosina difosfato (ADP) e a temperatura é mantida a 90°C de modo que a adenilato cinase termoestável possa converter o ADP a ATP. Esta incubação gera ATP exclusivamente proveniente da adenilato cinase termoestável. O ATP gerado é então medido por bioluminescência de ATP convencional utilizando uma reacção luciferina/luciferase. O sinal de adenilato cinase contaminante na luciferina/luciferase pode ser eliminado através da adição de um inibidor enzimático específico. A bioluminescência de ATP medida é directamente proporcional à concentração da toxina na amostra original testada.

A invenção proporciona assim um método e um conjunto para um teste sensível do tipo captura.

Referências

Gould SJ e Subramini S (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175: 5-13.

Kricka LJ (1993) Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin. Biochem.* 26: 325-331.

Ki W-K e Takahisa O (1988) Purification and characterisation of adenylate kinase from extreme thermophile *Thermus caldophilus* GK24. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 393-397.

Lacher K e Schäfer G (1993) Archaeobacterial adenylate kinase from the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius*: purification, characterization and partial sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 391-397.

Rusnak P, Haney P e Konisky J (1995) The adenylate kinases from a mesophilic and three thermophilic methanogenic members of the archaea. *J. Bacteriol.* 177: 2977-2981.

Bonisch H, Backmann J, Kath T, Naumann D e Schäfer G (1996) Adenylate kinase from *Sulfolobus acidocaldarius*: expression in *Escherichia coli* and characterization by Fourier transform infrared spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 333: 75-84.

REIVINDICAÇÕES

1. Um teste para um analito, compreendendo a associação específica do analito com uma cinase repórter termoestável, a adição de ADP e o teste para a formação de ATP em que, antes da adição de ADP, qualquer cinase diferente da cinase repórter é substancialmente removida através de lavagem e a cinase endógena residual no analito é inativada por aquecimento.

2. Teste de acordo com a Reivindicação 1, em que a cinase repórter termoestável é adenilato cinase e a quantidade de adenilato cinase repórter especificamente associada é substancialmente proporcional à quantidade do analito.

3. Teste de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 ou 2 em que a formação de ATP é medida utilizando luciferina/luciferase.

4. Teste de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1-3 para a determinação da presença e/ou da quantidade de um analito numa amostra, compreendendo:

a exposição da amostra a uma adenilato cinase repórter termoestável acoplada a um agente de ligação específico para o analito, de modo que a adenilato cinase repórter é especificamente associada com qualquer analito presente na amostra;

a remoção da adenilato cinase repórter não especificamente associada com o analito;

exposição da adenilato cinase repórter especificamente associada com o analito a ADP; e

aferir a formação de ATP,

em que antes da adição de ADP adenilato cinase residual para além da adenilato cinase repórter é substancialmente removida por aquecimento.

5. Um teste de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4 compreendendo a adição de uma ATPase ao analito e a remoção da ATPase do analito antes da adição de ADP.

6. Um teste de acordo com a Reivindicação 5 em que a ATPase é inactivada por aquecimento da ATPase.

7. Um conjunto de reagentes para a determinação da presença e/ou da quantidade de analito numa amostra compreendendo:

uma fase sólida na qual está imobilizado o analito ou um anticorpo específico para o analito;

uma composição repórter compreendendo uma enzima termoestável acoplada a um anticorpo específico para o analito; e

ADP e reagentes associados para a conversão de ADP em ATP pela adenilato cinase termoestável.

8. Um conjunto de acordo com a Reivindicação 7 compreendendo ainda ATPase.

9. Um teste para a determinação da presença e/ou da quantidade de um analito numa amostra compreendendo:

a exposição da amostra a uma composição de detecção, a composição de detecção compreendendo um anticorpo específico para o analito acoplado a um enzima termoestável;

o isolamento (i) da composição de detecção que se ligou especificamente ao analito da (ii) composição de detecção que não se ligou especificamente ao analito;

a determinação da presença e/ou da quantidade de composição de detecção que se ligou ao analito através da adição de um substrato para o enzima termoestável;

em que antes de se adicionar o substrato se destroem as enzimas não termoestáveis através da aplicação do calor.

10. Um teste de acordo com a Reivindicação 9, em que o substrato é convertido em produto pela enzima termoestável e antes da adição do substrato se remove o composto de fundo idêntico ao produto.

11. Um teste de acordo com a Reivindicação 10 em que o composto de fundo idêntico ao produto é removido pela acção da enzima ou por inactivação térmica.

12. Um conjugado compreendendo um anticorpo conjugado a uma adenilato cinase termoestável para utilização no teste para qualquer uma das Reivindicações 1-6 e 9-11.

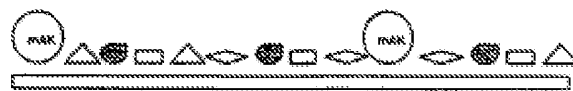
13. Um conjugado de acordo com a Reivindicação 12 em que o anticorpo se liga a um analito seleccionado de uma proteína, um microrganismo, um péptido, uma toxina, uma hormona e um metabolito.

14. Um conjugado de acordo com a Reivindicação 13 em que o anticorpo se liga a uma proteína priónica.

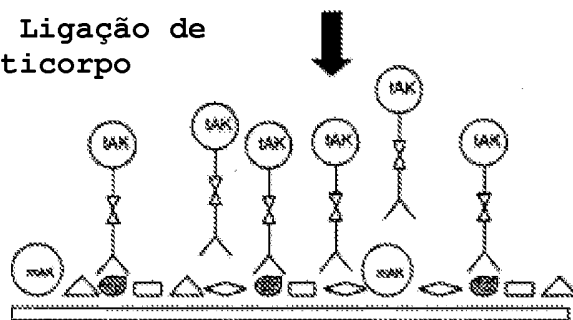
15. Utilização do conjunto das Reivindicações 7-8 ou do conjugado das Reivindicações 12-14 no teste para o analito.

Fig. 1

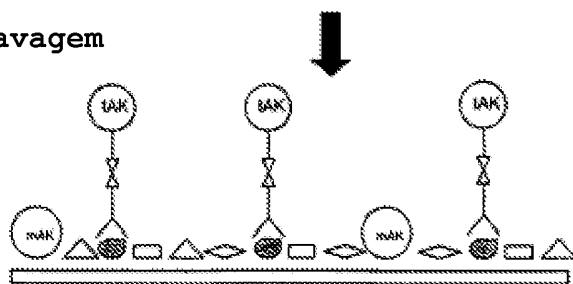
1. Bloqueio



2. Ligação de anticorpo



3. Lavagem



4. Clivagem do agente de ligação

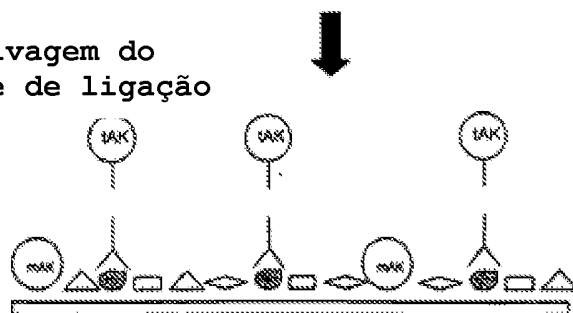
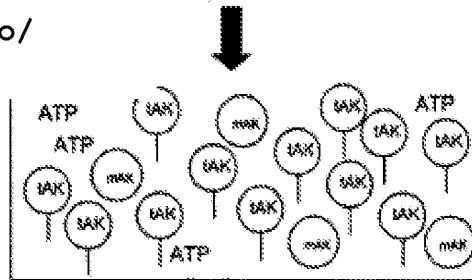
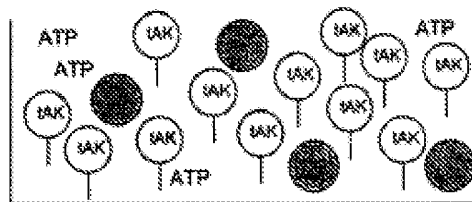


Fig. 2

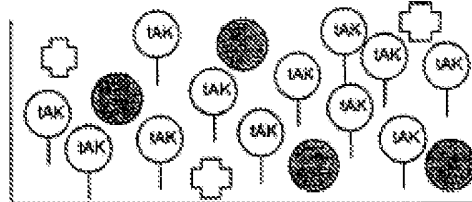
5. Recuperação/
Transferência



6. Inativação térmica



7. Hidrólise de ATP



8. Inativação térmica

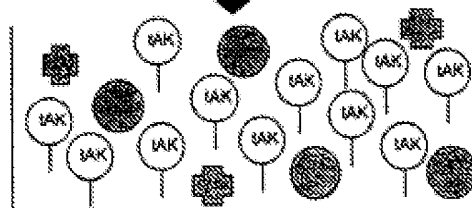
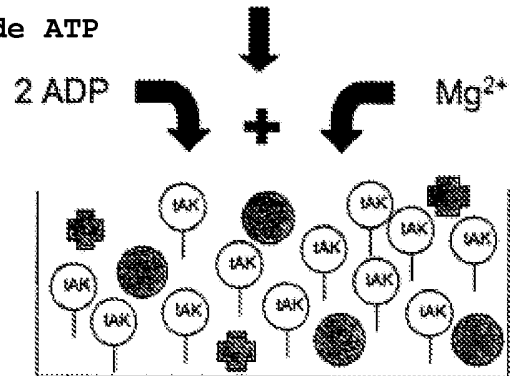


Fig. 3

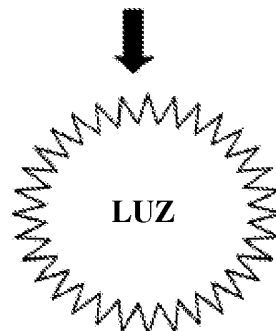
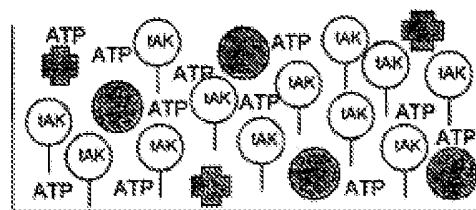
9. Geração de ATP

















10. Bioluminescência de ATP

D - luciferina

luciferase



	~	Adenilato cinase mesofilica
	~	Proteína priónica
  	~	Materiais celulares diversos
	~	Adenilato cinase termoestável
	~	Agente de ligação passível de clivagem
	~	Anticorpo
  	~	Conjugado anticorpo - adenilato cinase termoestável
ATP	~	Adenosina 5' - trifosfato
	~	Apirase / adenosina desaminase
 	~	Enzimas inactivadas termicamente