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

(21) **PI0609760-0 A2**

BRPI0609760A2

(22) Data de Depósito: 17/02/2006
(43) Data da Publicação: 18/10/2011
(RPI 2128)

(51) Int.Cl.:
G06F 19/00

(54) Título: MÉTODO DE ANÁLISE DE PARTÍCULAS DE VÍRUS

(30) Prioridade Unionista: 15/04/2005 US 60/594526

(73) Titular(es): INTELLIGENT VIRUS IMAGING INC.

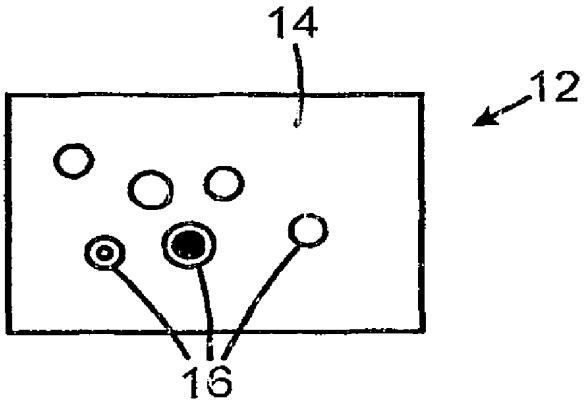
(72) Inventor(es): Ida-Maria Sintorn, Mohammed Homman

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006005571 de 17/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/112928de 26/10/2006

(57) Resumo: MÉTODO DE ANÁLISE DE PARTÍCULAS DE VÍRUS. Uma célula (14) é provida a qual contém uma pluralidade de partículas de vírus (16). Uma primeira imagem (20) de uma primeira partícula de vírus (22) e uma segunda imagem (32) de uma segunda partícula de vírus (34) são tomadas por meio de tecnologia de microscopia eletrônica. A primeira partícula de vírus é caracterizada como estando em um primeiro estágio de maturidade e a segunda partícula de vírus como estando em um segundo estágio de maturidade. A primeira imagem (20) e a segunda imagem (32) são transformadas em primeiro e segundo perfis de escala de cinza (24, 46), respectivamente, com base em dado de pixel. Os primeiro e segundo perfis de escala de cinza (24, 36) são então salvos como primeiro e segundo modelos, respectivamente. Uma terceira partícula de vírus em uma terceira imagem é identificada. A terceira imagem é transformada em um terceiro perfil de escala de cinza. A terceira escala de cinza é comparada com o primeiro e segundo modelos para determinar um estágio de maturidade da terceira partícula de vírus.



"MÉTODO DE ANÁLISE DE UM NÚCLEO DE CÉLULA"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se um método de análise de estrutura de célula que inclui morfologias de vírus.

Fundamentos da Invenção

Muitos esforços foram feitos no passado para classificar e analisar estruturas de célula que incluem vírus e outros componentes. Vários métodos de análise de imagem foram desenvolvidos para descrever, segmentar e classificar vírus por meio do uso de tecnologias de imagem disponíveis. Por exemplo, a microscopia crio-eletrônica foi usada, mas as estruturas das células e a partículas de vírus não são mostradas muito bem. Também foi difícil objetivamente, repetidamente e confiavelmente descrever os componentes de célula para precisamente determinar os estágios de maturidade dos componentes de célula. Isto parcialmente explica porque os vários métodos de análise não foram muito eficazes e existe uma necessidade por métodos mais eficazes para análise de estruturas de célula e partículas de vírus.

Sumário da Invenção

O método da presente invenção provê uma solução para os problemas acima descritos. Mais particularmente, o método da presente invenção é para analisar estruturas de célula e seus componentes. Uma estrutura de célula pode ser provida, a qual contém uma pluralidade de partículas de vírus. Uma primeira imagem de uma primeira partícula de vírus e uma segunda imagem de uma segunda partícula de vírus podem ser tomadas por meio do uso de uma tecnologia de microscopia eletrônica. A primeira partícula de vírus é caracterizada como estando em um primeiro estágio de maturidade e a segunda partícula de vírus como estando em um segundo estágio de maturidade. As primeira e segunda imagens são transformadas em primeiro e segundo perfis de escala de cinza, respectivamente, com base em

dado de pixel ou outra informação das imagens. O primeiro e segundo perfis de escala de cinza são salvos como primeiro e segundo modelos, respectivamente. Uma terceira partícula de vírus em uma terceira imagem pode então ser identificada. A terceira imagem é transformada em um terceiro perfil de escala de cinza. A terceira escala de cinza é comparada com primeiro e segundo modelos para determinar um estágio de maturidade da terceira partícula de vírus.

Breve Descrição do Desenho

A figura 1 é uma vista esquemática de um núcleo de célula contendo partículas de vírus;

a figura 2A é uma imagem de microscópio de uma partícula de vírus EM um primeiro estágio de maturidade;

a figura 2B é uma vista esquemática de um perfil de escala de cinza da partícula de vírus mostrada na figura 2A;

a figura 3A é uma imagem de microscópio de uma partícula de vírus em um segundo estágio de maturidade;

a figura 3B é uma vista esquemática de um perfil de escala de cinza da partícula de vírus mostrada na figura 3A;

a figura 4A é uma imagem de microscópio de uma partícula de vírus do vírus em um terceiro estágio de maturidade;

a figura 4B é uma vista esquemática de um perfil de escala de cinza da partícula de vírus mostrada na figura 4A.

Descrição Detalhada

Com referência às figuras 1-4, o método da presente invenção refere-se se refere a etapas para analisar estruturas de célula que incluem componentes tais como partículas de vírus. A análise de partículas de vírus é somente usada como m exemplo ilustrativo do método da presente invenção e a invenção não é limitada a partículas de vírus. Qualquer componente adequado em uma estrutura tal como uma célula pode ser analisado usando o

método. Uma característica importante da presente invenção é que diferentes partículas de vírus produzem únicos gráficos ou perfis de nível de cinza. Também, as várias partículas de vírus podem estar em diferentes estágios de maturidade de modo que o presente método pode não somente ser usado para determinar os tipos de partículas de vírus mas também o estágio de maturidade da partícula de vírus particular.

Em geral, uma imagem 12 pode primeiramente ser tomada por meio de uma técnica apropriada, tal como microscopia eletrônica de transmissão (TEM) , de uma estrutura de célula 14. A imagem pode incluir partículas virais de vírus 16 que estão em vários estágios de maturidade. Por exemplo, as partículas de vírus podem ser categorizadas como estando em três ou mais estágios de maturidade incluindo partículas de vírus vazias ou imaturas, como mostrado na figura 2A, partículas de vírus intermediárias, como mostrado na figura 3A, e partículas de vírus mais maturas, como mostrado na figura 4A.

As partículas de vírus 16 são freqüentemente linearmente deformadas tornando as partículas de vírus assemelhando-se ligeiramente a elipses, ao contrário de círculos. Para se poder fazer um perfil de densidade acurado, é desejável que as partículas de vírus sejam radialmente simétricas. Desta maneira, a deformação tem que ser invertida a fim de atingir os melhores resultados quando a análise da presente invenção é realizada. Isto pode ser feito por meio de guarnição de uma elipse com partícula viral de vírus que é considerada ser aproximadamente circular. Os principais raios e orientação da elipse podem ser usados para determinar a deformação e fazer a deformação inversa.

Cada posição de pixel na antiga imagem elíptica é então transformada na nova imagem para produzir um retrato onde as estruturas de partícula de vírus são circulares. Todas estruturas de partícula de vírus são preferivelmente sujeitas a este ajuste de deformação. Como descrito abaixo, a

estrutura de partícula de vírus radialmente simétrica pode ser transformada em um perfil de nível de cinza. Ele pode ser usado para descrever a estrutura por meio do cálculo do nível de cinza médio em cada distância a partir do centro que vai do centro para fora em direção à periferia ou concha da estrutura de partícula de vírus. A transformação para estruturas circulares é particularmente útil quando de medição do raio de partícula e da espessura da s paredes de partícula de vírus.

Mais particularmente, a figura 2A mostra uma imagem 20 de uma partícula de vírus viral relativamente imatura ou vazia 22 em um núcleo de célula e a figura 2B mostra este correspondente perfil de nível de cinza 24 em um gráfico 25. É também possível desenvolver um algoritmo matemático para descrever as estruturas de partícula de vírus em lugar de se contar com perfis de escala de cinza. DNA viral pode ser inserido na partícula de vírus 22 que pode eventualmente desenvolver-se em uma partícula de vírus matura com um denso núcleo de DNA core, como mostrado na figura 4A e discutido abaixo.

A partícula de vírus 22 tem um raio 26 que se estende a partir do centro 28 radialmente para fora até um centro da parede de concha 30 da partícula de vírus. Uma vez que a partícula de vírus 22 é virtualmente vazia de componentes viróticos , a porção de centro é quase branca, que mostra como um alto valor de nível de cinza do perfil 24 no lado esquerdo do gráfico 25. A concha 30 é mais escura de modo que o perfil 24 tem um valor de nível de cinza gradualmente menor no lado direito do gráfico 25 uma vez que a área de concha corresponde ao lado direito do gráfico 25.

A figura 3A mostra uma imagem 32 da partícula de vírus 34 que não está totalmente matura. A partícula de vírus 34 contém uma adicional proteína viral que ajuda no empacotamento do DNA viral para dentro das partículas de vírus. As paredes de partícula de vírus podem incluir camadas de proteína, de modo que o tamanho da partícula de vírus e a espessura das

camadas podem ser determinados. A figura 3B mostra um correspondente perfil de nível de cinza 36 em um gráfico 38. A partícula de vírus 34 tem um raio 48 que se estende a partir de um centro 50 para um centro de uma concha periférica 52 da partícula de vírus. O anel negro ou escuro 40 é mostrado como um local mínimo 42 no perfil 36, ao passo que o anel branco 44 é mostrado como um máximo local 46 no perfil 36. O início e o fim dos anéis e parede de concha podem ser determinados por meio de análise da segunda derivada dos perfis de escala de cinza.

Similarmente, a figura 4A mostra uma imagem 54 de uma partícula de vírus mais matura 56 e a figura 4B mostra o correspondente perfil de nível de cinza 58 em um gráfico 60. A partícula de vírus 56 tem um raio 62 que se estende a partir de um centro 64 para um centro de uma parede de concha periférica 66 da partícula de vírus 56. O anel branco 68 é mostrado como um máximo local 70 no perfil 58.

Uma característica importante do método da presente invenção é que é possível criar modelos com base nos perfis de escala cinza para objetivamente descrever as partículas de vírus do vírus. Os modelos podem ser criados também por meio do uso de métodos matemáticos. Por exemplo, um modelo pode ser baseado em uma média das características de muitas partículas de vírus que estão no mesmo estágio de maturidade. Os modelos podem então ser salvos em uma base de dados e posteriormente ser recuperados quando for o momento de analisar e caracterizar novas imagens contendo partículas de vírus. Quando milhares de imagens são feitos, os modelos podem ser usados para calcular o número de partículas de vírus nos vários estágios de maturidade. Desta maneira, a produção de vírus em uma célula pode ser quantificada por meio de tomar imagens TEM adicionais.

Mais particularmente, perfis de modelo de nível de cinza de partículas intermediárias de vírus podem ser criados e usados para identificar estas partículas em micrográficos eletrônicos. Para criar o perfil de cinza de

modelo, o ponto de centro juntamente com o tamanho aproximado da partícula de vírus tem que ser conhecido. O tamanho aproximado (raio) em pixéis da partícula de vírus pode ser deduzido a partir de conhecimento da amplificação da imagem e do verdadeiro tamanho atual da partícula de vírus, ou ele pode ser marcado na imagem. O ponto de centro de um objeto pode ser marcado manualmente ou encontrado através de conjugação de modelos. Preferivelmente, o ponto de centro é automaticamente escolhido como o centro da elipse após ajuste de deformação. Como descrito acima, o perfil de nível de cinza pode ser visualizado como um perfil de curva onde picos na curva representam regiões radiais claras e vales representam regiões radiais escuras.

A largura de certas características radiais, tais como concha e partícula de vírus, pode fornecer informação com respeito à extensão de tegumentação da partícula de vírus quando medições são aplicadas em formas de partícula de vírus citoplásmicas. O problema com a medição desta espessura diretamente a partir da imagem ou do perfil é a dificuldade de determinar onde a partícula de vírus começa e termina. Informação de gradiente acerca do perfil pode ser usada para solucionar este problema. O primeiro gradiente mede como a alteração de níveis de cinza ao longo do perfil, o gradiente terá valores positivos e se os níveis de cinza se movem do claro para escuro, o gradiente terá valores negativos. Onde não existe sobretudo alteração ou onde o perfil tem um máximo ou mínimo local, o gradiente será 0. A espessura da concha poderia, conseqüentemente, ser descrita como o número de pixéis entre o mínimo local até o máximo local no gradiente. Esta é uma maneira objetivo de medir onde a concha começa e termina. Para encontrar estes pontos extremos, o segundo gradiente (o gradiente da curva de gradiente) é calculado, uma vez que um máximo ou mínimo local será zero na curva de gradiente.

Desta maneira, perfis de nível de cinza são gerados para as

muitas partículas de vírus. As curvas geradas de perfil de nível de cinza podem ser suavizadas por meio de convolução com uma função de Gauss padrão. O comportamento de curvas na parede de partícula de vírus ou concha de partícula de vírus pode ser ilustrado como um vale em direção ao comportamento linear que representa a estrutura total da partícula de vírus.

A derivada da função atinge um mínimo local onde a curva descendente é a mais escalonada que representa o início da parede de partícula de vírus. Existe um máximo local onde a curva ascendente é a mais escalonada que representa a extremidade ou exterior da parede de partícula de vírus. Os locais destes extremos locais são encontrados como os cruzamentos por zero da segunda derivada do perfil e a distância entre os extremos servem como a medição da largura da parede de partícula de vírus.

Como discutido acima, o raio da partícula de vírus é calculada como a distância entre o centro da partícula de vírus e o centro da parede de partícula de vírus. O centro da parede de partícula de vírus pode ser previsto como o valor mínimo no perfil de Gauss suavizado, o qual é o cruzamento de zero do 1° gradiente da curva suavizada.

Uma outra característica importante é que as imagens podem ser feitas novamente em um momento posterior e novas estatísticas dos estágios de maturidade das partículas de vírus podem ser comparadas com estatísticas anteriores do número de partículas de vírus nos vários estágios de maturidade. Isto é de particular interesse quando as partículas de vírus foram sujeitas a uma substância química ativa, tal como uma substância farmacêutica apropriada, para melhor entendimento de como a substância afeta a produção de vírus nas partículas de vírus. Por exemplo, uma substância existente ou nova pode ser usada para determinar qual parte da produção de vírus ou qual estágio de maturidade é afetado por ou paralisado pela substância. Se, por exemplo, o vírus passa através de seis estágios de maturidade e não existe vírus no quarto estágio de maturidade, se pode

concluir que a substância farmacêutica previne que o vírus se torne maturo além do quarto estágio de maturidade. O método pode também ser usado para determinar qual estágio de maturidade um novo produto farmacêutico deve ser projetado para produzir efeito.

É também possível identificar novos diferentes morfologias de vírus e descrever como o novo vírus difere das morfologias de vírus anteriormente identificadas.

Uma outra característica do método da presente invenção é que é possível remover certas proteínas a partir do vírus por meio do uso de métodos bioquímicos, tais como siRNA, e então objetivamente determinar como a remoção da proteína ou proteínas afeta a morfologia de vírus e seu correspondente perfil de escala de cinza. Por exemplo, uma substância farmacêutica pode ser projetada a prevenir a formação de uma certa proteína na partícula de vírus e os efeitos de tal prevenção sobre o perfil de escala de cinza podem ser estudados. A remoção de uma certa proteína pode prevenir que o vírus avance de um estágio de maturidade para um estágio de maturidade posterior. O método torna possível determinar qual estágio de maturidade é afetado por meio da remoção da proteína particular.

Embora a presente invenção tenha sido descrita de acordo com composições e formas de concretização preferidas, deve ser entendido que certas substituições e alterações podem ser feitas às mesmas sem fugir do espírito e escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de análise de um núcleo de célula, caracterizado pelo fato de que compreende:

prover uma célula (14) contendo uma pluralidade de partículas (16);

tomar uma primeira imagem (20) de uma primeira partícula (22) e uma segunda imagem (32) de uma segunda partícula (34);

caracterizar a primeira partícula como estando em um primeiro estágio de maturidade e a segunda partícula como estando em um segundo estágio de maturidade;

transformar a primeira imagem (20) em um primeiro perfil de escala de cinza (24);

transformar a segunda imagem (32) em um segundo perfil de escala de cinza (36);

salvar o primeiro perfil de escala de cinza (24) como um primeiro modelo;

salvar o segundo perfil de escala de cinza (36) como um segundo modelo;

identificar uma terceira partícula em uma terceira imagem;

transformar a terceira imagem em um terceiro perfil de escala de cinza; e

comparar a terceira escala de cinza com o primeiro e segundo modelos para determinar um estágio de maturidade da terceira partícula.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende sujeitar a terceira partícula a uma substância química ativa.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende criar uma quarta imagem da terceira partícula em um instante posterior a um instante da criação da terceira imagem.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que ainda compreende determinar um estágio de maturidade de terceira partícula.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que ainda compreende determinar um efeito da substância química sobre a terceira partícula com base no estágio de maturidade determinado.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que ainda compreende transformar a quarta imagem em um quarto perfil de escala de cinza para objetivamente determinar o efeito da substância química sobre a terceira partícula.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende transformar partículas de vírus na forma elíptica para partículas de vírus na forma circular.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende determinar um início e um final de uma parede de partícula de vírus por tomar derivados do perfil de escala de cinza (24, 36, 58) .

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende determinar um início e um final de uma camada de proteína por tomar derivados do perfil de escala de cinza (24, 36, 58) .

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende remover uma proteína a partir da partícula de vírus (24) e gerar um perfil de escala de cinza modificado.

FIG. 1

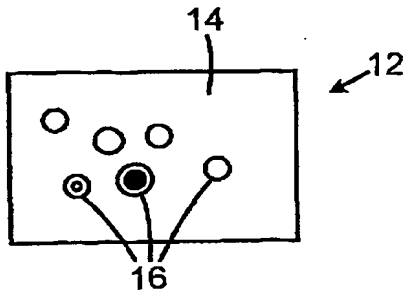


FIG. 2B

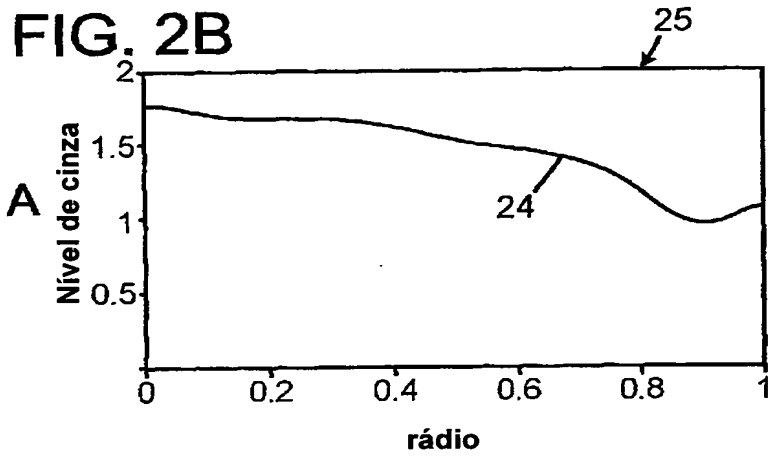


FIG. 2A

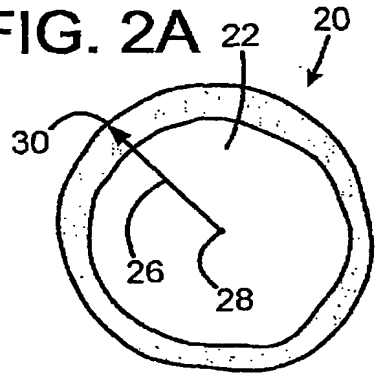


FIG. 3B

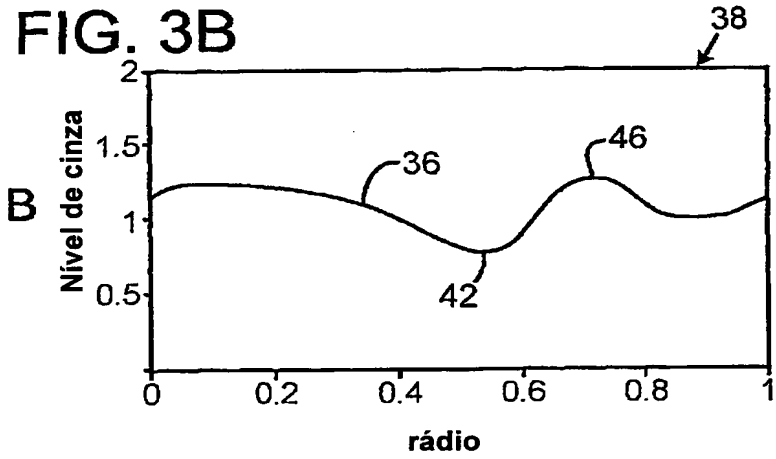


FIG. 3A

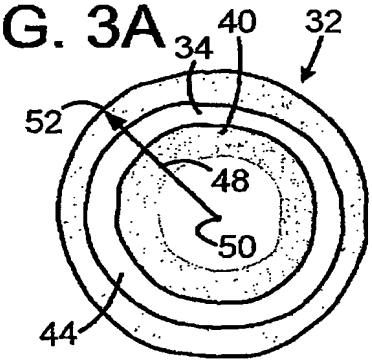


FIG. 4B

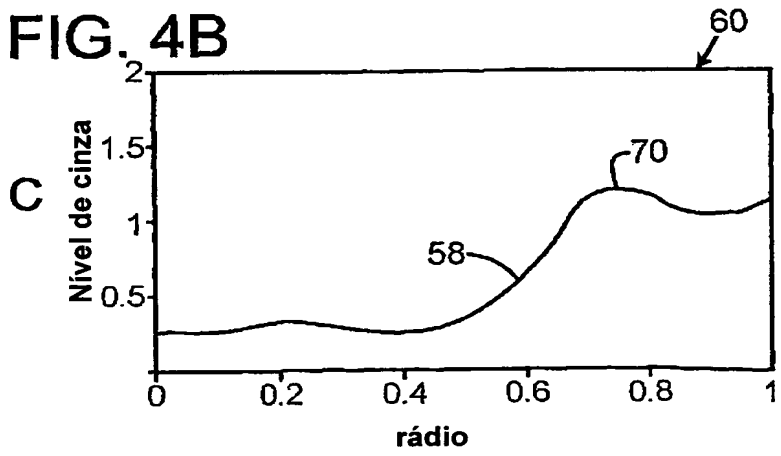
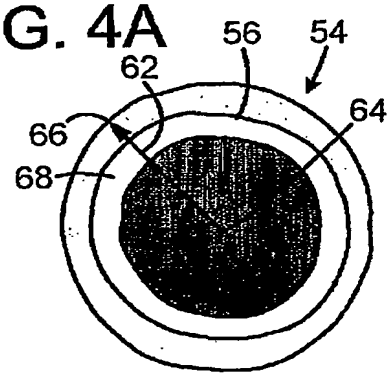


FIG. 4A



PI0609760-0

RESUMO

"MÉTODO DE ANÁLISE DE PARTÍCULAS DE VÍRUS"

Uma célula (14) é provida a qual contém uma pluralidade de partículas de vírus (16). Uma primeira imagem (20) de uma primeira partícula de vírus (22) e uma segunda imagem (32) de uma segunda partícula de vírus (34) são tomadas por meio de tecnologia de microscopia eletrônica. A primeira partícula de vírus é caracterizada como estando em um primeiro estágio de maturidade e a segunda partícula de vírus como estando em um segundo estágio de maturidade. A primeira imagem (20) e a segunda imagem (32) são transformadas em primeiro e segundo perfis de escala de cinza (24, 46), respectivamente, com base em dado de pixel. Os primeiro e segundo perfis de escala de cinza (24, 36) são então salvos como primeiro e segundo modelos, respectivamente. Uma terceira partícula de vírus em uma terceira imagem é identificada. A terceira imagem é transformada em um terceiro perfil de escala de cinza. A terceira escala de cinza é comparada com o primeiro e segundo modelos para determinar um estágio de maturidade da terceira partícula de vírus.