



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

(21) **PI0616323-8 A2**

(22) Data de Depósito: 20/09/2006
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68 2006.01

(54) Título: **MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM FLUIDO MAMÁRIO DOADO FOI OBTIDO A PARTIR DE UM INDIVÍDUO ESPECÍFICO**

(30) Prioridade Unionista: 20/09/2005 US 60/719.317,
28/10/2005 US 60/731.428

(73) Titular(es): PROLACTA BIOSCIENCE, INC.

(72) Inventor(es): David Rechtman, Elena M. Medo, Martin L. Lee

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006036827 de 20/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/035870 de 29/03/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM FLUIDO MAMÁRIO DOADO FOI OBTIDO A PARTIR DE UM INDIVÍDUO ESPECÍFICO. A divulgação está relacionada de maneira geral a um método para testar fluido mamário (incluindo leite) para estabelecer ou confirmar a identidade do doador do fluido mamário. Tais métodos e sistemas são úteis na indústria de banco de leite para aumentar a segurança.

**MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM FLUIDO MAMÁRIO DOADO FOI
OBTIDO A PARTIR DE UM INDIVÍDUO ESPECÍFICO
REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS**

Este pedido reivindica prioridade sob U.S.C. 35 §119,
5 dos Pedidos de Patente Provisória de números de série
60/719.317, depositado em 20 de setembro de 2005, e
60/731.428, depositado em 28 de outubro de 2005, dos quais
as divulgações estão aqui incorporadas por referência.

CAMPO TÉCNICO

10 A invenção está relacionada de forma geral a um método
para testar fluido mamário (incluindo leite) para
estabelecer ou confirmar a identidade do doador do fluido
mamário.

FUNDAMENTOS

15 Diferentemente de doadores de sangue que fazem sua
doação sob a supervisão direta da equipe do banco de
sangue, doadores de leite materno humano tendem a bombear
seu leite para doação em casa ou outros locais convenientes
aos mesmos e então armazenam o leite materno em seus
20 congeladores até que possam acumular o bastante para trazer
ao centro de doação. Assim, na ausência de supervisão
direta das doações, podem surgir dúvidas quanto à
procedência do leite materno doado.

A fim de estabelecer que o leite materno fornecido
25 pelo doador é, de fato, exclusivamente daquela doadora
humana, deve ocorrer alguma forma de teste para estabelecer
a identidade do doador.

Muitos métodos diferentes de tipagem de DNA são
conhecidos para identificar ou tipar entre espécimes e
30 humanos. Tais métodos incluem análise de DNA humano por

repetições curtas em sequência (STR), repetições de
microsatélites ou repetições de sequência simples (SSR),
análise de múltiplos genes humanos e análise de genes de
antígeno de linfócito humano (HLA) e loci por análise de
5 reação em cadeia de polimerase (PCR), análise de
polimorfismo no comprimento de restrição e outros métodos.

É conhecido que humanos possuem antígenos que são
específicos àquele indivíduo. Por exemplo, os antígenos de
leucócitos humanos (HLA) foram utilizados no passado para
10 tipar tecido para transplante.

SUMÁRIO

A invenção fornece métodos e sistemas para
diagnosticar ou selecionar fluido mamário de qualquer
número de organismos mamíferos. Em um aspecto, a invenção
15 fornece métodos e sistemas para diagnosticar ou selecionar
amostras de leite humano para confirmar que o leite é de
uma determinada fonte.

Em um aspecto a invenção está relacionada a um método
para determinar se leite materno foi obtido a partir de um
20 humano específico compreendendo testar uma amostra d leite
materno para obter um perfil de marcador de identidade e
testar uma amostra biológica do humano para obter um perfil
de marcador de identidade de referência e comparar os
perfis de marcador de identidade.

25 A invenção fornece um método para determinar se o
leite materno foi obtido de uma fonte desejada ou humano
específico compreendendo tipagem de ácido nucléico de uma
amostra do leite materno para se obter um perfil de tipo de
DNA e tipagem de ácido nucléico de uma amostra biológica do
30 humano para obter um perfil de tipo de DNA de referência e

comparar os perfis de tipo de DNA.

Em uma modalidade, o método de tipagem de ácido nucléico da amostra biológica do humano é selecionado entre análise STR, análise HLA ou análise de genes múltiplos. É
5 ainda observado que o método de tipagem de ácido nucléico utilizado para a amostra de leite materno é o mesmo que aquele utilizado para a amostra biológica. É observado que os loci/alelos utilizados para o perfil de tipo de DNA serão os mesmos tanto para o perfil de tipo de DNA de
10 referência e o perfil de tipo de DNA da amostra de leite materno.

Em uma modalidade o leite materno será congelado. É ainda observado que o método para obtenção da amostra de leite materno a partir do leite materno congelado será por
15 perfuração de um núcleo através do leite materno congelado. Alternativamente, é observado que a amostra de leite materno pode ser obtida raspando-se a superfície do leite materno congelado.

Em outra modalidade o leite materno estará líquido. É
20 observado que o método para obtenção da amostra de leite materno será por isolamento da amostra de leite materno por pipetagem ou outro meio.

Em outra modalidade as amostra de leite materno podem ser combinadas ou misturadas antes da tipagem de ácido
25 nucléico.

A invenção também fornece um método para determinar se leite materno foi obtido de uma fonte definida (por exemplo, um humano específico) compreendendo testar uma amostra de leite materno para se obter um perfil de auto-
30 antígeno e testar uma amostra biológica do humano para se

obter um perfil de auto-antígeno de referência e comparar os perfis de auto-antígeno.

A invenção também fornece um artigo de fabricação ou conjunto compreendendo um recipiente, um marcador no
5 recipiente e um reagente para detectar ou medir os marcadores de identidade, onde o marcador no recipiente indica que o reagente pode ser utilizado para determinar o perfil do marcador de identidade de leite materno. Em uma modalidade, o reagente compreende materiais de PCR (um
10 conjunto de iniciadores, DNA polimerase e 4 nucleosídeo trifosfato) que hibridizam com o gene ou loci do mesmo. O conjunto pode ainda compreender componentes adicionais, como reagentes, para detectar ou medir a entidade detectável ou fornecer um controle. Outros reagentes
15 utilizados para hibridização, pré-hibridização, extração de DNA, visualização e similares podem estar também incluídos, se desejado. Em outra modalidade, o reagente é um anticorpo para detectar auto-antígenos.

Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são
20 expostos na descrição abaixo. Outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da descrição e das reivindicações.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A menos que de outra forma definido, os termos
25 técnicos e científicos usados aqui possuem os mesmos significados conforme comumente compreendido por qualquer um habilitado na técnica à qual esta invenção pertença. Todas as referências citadas aqui estão incorporados por referência em sua totalidade.

30 Aquele habilitado na técnica reconhecerá muitos

métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui que poderiam ser utilizados na prática desta invenção. De fato a invenção não está de qualquer forma limitada aos métodos e materiais aqui descritos. Para os
5 propósitos da invenção os seguintes termos são definidos.

Fluido mamário inclui leite materno e/ou colostro retirado de indivíduos do sexo feminino lactantes. Fluido mamário integral, líquido selecionado ou frações sólidas do fluido mamário, células integrais ou constituintes
10 celulares, proteínas, glicoproteínas, peptídeos, nucleotídeos (incluindo polinucleotídeos de DNA e RNA) e outros constituintes bioquímicos e moleculares semelhantes do fluido mamário podem ser utilizados nos métodos da invenção. O fluido mamário pode ser obtido a parti de
15 qualquer número de espécies de indivíduos femininos, mas não limitado a humanos, bovinos, caprinos e similares.

O marcador de identidade inclui um marcador que pode ser utilizado para identificar um único indivíduo de outros indivíduos em uma população. Tais marcadores estão
20 presentes nas células encontradas em fluido mamário. Tais marcadores poderiam incluir, mas não estão limitados a genes, alelos, loci, polipeptídios ou peptídeos antígenos.

Um perfil de marcador de identidade compreende um perfil de um número de marcadores de identidade cujos
25 perfis identificam o humano ou indivíduo único de outros humanos com um grau suficiente de certeza. É observado que o perfil de marcador de identidade identifica pelo menos um humano entre 100.000 humanos, ou um humano entre 1 milhão de humanos ou um humano entre 5 milhões de humanos.

30 Tipagem de ácido nucléico refere-se a um método para

determinar o perfil de tipo DNA de uma amostra biológica ou de leite. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a análise STR, análise HLA ou análise de genes múltiplos de genes/alelos/*loci* presentes em uma amostra de polinucleotídeos da amostra biológica ou de leite.

Perfil de tipo de DNA refere-se a um perfil de um DNA genômico de um humano ou de um indivíduo que é suficiente para distinguir o humano ou indivíduo único de outros humanos com um grau suficiente de certeza. É observado que o perfil de DNA identifica pelo menos um humano entre 100.000 humanos, ou um humano entre 1 milhão de humanos ou um humano entre 5 milhões de humanos. Geralmente este método envolve identificar alelos de pelo menos 5 *loci*/genes ou pelo menos 10 *loci*/genes ou pelo menos 13 *loci*/genes.

Um alelo compreende uma das diferentes seqüências de ácido nucléico de um gene em um *locus* particular em um cromossomo. Uma ou mais diferenças genéticas podem constituir um alelo. Exemplos de seqüências de alelo HLA são expostas em Mason e Parham (1998), "Tissue Antigens", 51: 417-66, que relaciona os alelos HLA-A, HLA-B e HLA-C e Marsh e outros, (1992), "Hum. Immunol." 35:1, que relaciona alelos Classe II para DRA, DRB, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1.

Um *locus* compreende uma localização distinta em um cromossomo. Os *loci* podem ser parte de um gene ou parte de uma seqüência de repetição. *Loci* de antígenos de leucócito humano exemplares (HLAs) são os genes MHC classe I denominados HLA-A, HLA-B e HLA-C; genes classe I não-clássicos incluindo HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J e HLA-X, MIC; e genes classe II como HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR.

Locis STR exemplares são: CSF1P0, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, DI8S51, D21S11, DYS19, F13A1, FES/FPS, FGA, HPRTB, TH01, TPOX, DYS388, DYS391, DYS392, DYS393, D2S1391, D18S535, D2S.1338, D19S433, D6S477, 5 D1S518, D14S306, D22S684, F13B, CD4, D12S391, D10S220 e D7S523 (ver, por exemplo, Patente U.S. de número 6.090.558).

Um método de análise de HLA ou análise de antígeno de leucócito humano é um método que permite a determinação ou 10 designação de um ou mais polimorfismos genéticos de antígenos de leucócito humano (HLA) distintos geneticamente por qualquer número de métodos conhecidos na técnica. Alguns métodos ponderados são aqui descritos.

Um método de análise de STR é um método que permite a 15 determinação ou designação de um ou mais polimorfismos genéticos de STR geneticamente distintos por qualquer número de métodos conhecidos na técnica. Alguns métodos ponderados estão aqui descritos.

Um método de análise de genes múltiplos é um método 20 que permite a determinação ou designação de um ou mais polimorfismos genéticos de genes humanos distintos geneticamente por qualquer número de métodos conhecidos na técnica. Tais genes podem ou não incluir os genes HLA. Alguns métodos ponderados estão aqui descritos.

25 Diversas técnicas de amplificação são conhecidas na técnica. Amplificação refere-se a uma reação onde um ácido nucléico modelo, ou porções deste, é duplicado pelo menos uma vez. Tais técnicas de amplificação incluem amplificação aritmética, logarítmica ou exponencial. A amplificação de 30 um ácido nucléico pode ocorrer utilizando-se qualquer

sistema de amplificação de ácido nucléico, tanto isotérmico quanto de gradiente térmico incluindo, mas não limitado a reação em cadeia de polimerase (PCR), reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), reação em
5 cadeia de ligase (LCR), reação em seqüência auto-sustentada (3SR), e amplificações mediadas por transcrição (TMA). Misturas de amplificação de ácido nucléico típicas (por exemplo, mistura de reação de PCR) incluem um modelo de ácido nucléico que deve ser amplificado, uma polimerase de
10 ácido nucléico, seqüência(s) de iniciador de ácido nucléico, trifosfato de nucleotídeo e um tampão contendo todas as espécies de íons exigidas para a reação de amplificação.

Produtos de amplificação obtidos a partir de uma
15 reação de amplificação tipicamente compreendem um DNA ou RNA de filamento simples ou de filamento duplo ou quaisquer outros produtos de ácido nucléico de reações de amplificação isotérmica ou de gradiente térmico que incluam PCR, LCR e similares.

20 Um ácido nucléico modelo refere-se a um polímero de ácido nucléico que se procura copiar ou amplificar. O(s) ácido(s) nucléico(s) modelo pode(m) ser isolado(s) ou purificado(s) a partir de uma célula, tecido e similares. O ácido nucléico modelo pode compreender DNA, cDNA, RNA
25 genômicos ou similares.

Iniciadores são utilizados em algumas técnicas de amplificação. Um iniciador compreende um oligonucleotídeo utilizado em uma reação de amplificação (por exemplo, PCR) para amplificar um ácido nucléico alvo. O iniciador é
30 tipicamente de filamento simples. O iniciador pode ser de

cerca de 5 a 30 ácidos nucléicos de comprimento, mais comumente de cerca de 10 a 25 ácidos nucléicos de comprimento.

Um iniciador de *locus* específico de STR é um
5 oligonucleotídeo que hibridiza em uma variante de ácido nucléico alvo que define, total ou parcialmente, aquele *locus* de STR particular.

Um iniciador de alelo específico de HLA é um
10 oligonucleotídeo que hibridiza em uma variante de ácido nucléico alvo que define, total ou parcialmente, aquele alelo de HLA particular.

Um iniciador de *locus* específico de HLA é um
15 oligonucleotídeo que permite a amplificação de um *locus* de HLA ou que pode hibridizar especificamente em um *locus* de HLA.

Um iniciador de alelo específico é um oligonucleotídeo que hibridiza em uma variante de ácido nucléico alvo que define, total ou parcialmente, aquele alelo de gene particular.

20 Um iniciador de *locus* específico é um oligonucleotídeo que permite a amplificação de um *locus* de um gene ou que pode hibridizar especificamente em um *locus* de um gene.

Um iniciador e um iniciador reverso constituem um par de iniciadores que podem se ligar a um ácido nucléico
25 modelo e, sob condições de amplificação apropriadas, produzir um produto de amplificação. Se o iniciador está se ligando ao filamento no sentido então o iniciador reverso está se ligando ao filamento anti-sentido. Alternativamente, se o iniciador está se ligando ao
30 filamento anti-sentido então o iniciador reverso está se

ligando ao filamento no sentido. Em essência, o iniciador ou iniciador reverso pode se ligar a ambos os filamentos, desde que o outro iniciador ou iniciador reverso se ligue ao filamento oposto.

5 Qualquer número de marcadores identificáveis pode ser utilizado para detectar um ácido nucléico alvo pelo uso de amplificação ou outra técnica. Um marcador detectável refere-se a uma metade que está fixada através de técnicas covalentes ou não covalentes a um oligonucleotídeo ou outro
10 agente de detecção. Exemplos de marcadores detectáveis incluem uma metade radioativa, uma metade fluorescente, uma metade quimioluminescente, uma metade cromogênica e similares. Metades fluorescentes compreende entidades químicas que aceitam energia radiante de um comprimento de
15 onda e emitem energia radiante em um segundo comprimento de onda.

Várias técnicas de hibridização podem ser utilizadas nos métodos aqui descritos. Hibridizar ou hibridização refere-se à ligação ou duplexação de uma molécula a um
20 polinucleotídeo substancialmente complementar ou fragmento deste através de ligação por meio de emparelhamento de base. A hibridização tipicamente envolve a formação de ligações de hidrogênio entre nucleotídeos em um ácido nucléico e um segundo ácido nucléico complementar. Métodos
25 de hibridização podem incluir condições altamente estridentes, moderadamente estridentes ou de baixa estringência.

O termo "condições de estringência" refere-se a condições sob as quais um oligonucleotídeo de captura,
30 oligonucleotídeo ou produto de amplificação hibridizará a

seu ácido nucléico alvo. Os termos "condições de hibridização estridente" ou "condições altamente estridentes" são dependentes de seqüência e serão diferentes com parâmetros ambientais diferentes (por exemplo, concentrações de sal e presença de orgânicos). Geralmente, as condições estridentes são selecionadas para estarem cerca de 5°C a 20°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m) para um ácido nucléico específico a uma força iônica e pH definidos. Condições estridentes estão cerca de 5°C a 10°C abaixo do ponto de fusão térmica para um ácido nucléico específico ligado a um ácido nucléico complementar. A T_m é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) na qual 50% de um ácido nucléico hibridiza a um marcador compatível. Oligonucleotídeos mais longos hibridizam a temperaturas mais altas. Tipicamente, condições estridentes serão aquelas nas quais a concentração de sal compreende cerca de 0,01 M a 1,0 M de Na (ou outros sais) a um papel higiênico 7,0 a 8,3 e a temperatura está pelo menos cerca de 30°C para marcadores curtos (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos). As condições estridentes podem também ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizantes, tal como formamida. Um guia extenso da hibridização e lavagem de ácidos nucléicos é encontrado em Tijssen (1993), "Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology -hybridization with nucleic acid probes parts I and II", Elsevier, N.Y.; Choo (ed), (1994), "Methods Molecular Biology Volume 33 - In Situ Hybridization Protocols", Humana Press Inc., Nova Jersey; Sambrook e outros, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", (2ª ed., 1989), "Current Protocols in Molecular

Biology", Ausubel e outros, (eds.), (1994).

As condições de hibridização para um marcador, iniciador e alvo em particular são prontamente determináveis por aquele de habilidade comum na técnica e
5 geralmente é um cálculo empírico dependente de comprimento de marcador, temperatura de lavagem e concentração de sal. De forma geral, marcadores maiores exigem temperaturas mais altas para uma recombinação adequada, enquanto marcadores menores precisam de temperaturas menores. A hibridização
10 geralmente depende da capacidade de ácidos nucleicos monofilamentares se recombinarem a filamentos complementares presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejado entre um marcador e um alvo hibridizável, maior
15 será a temperatura relativa que poderá ser utilizada. Como um resultado, ocorre que temperaturas relativas mais altas tenderão a tornar as condições de reação mais estridentes, enquanto temperaturas mais baixas, o contrário.

As condições de lavagem de hibridização são comumente
20 determinadas de forma empírica para a hibridização de cada marcador ou conjunto de iniciadores com um ácido nucleico alvo correspondente. O ácido nucleico alvo e marcadores/iniciadores são primeiramente hibridizados (tipicamente sob condições de hibridização estridentes) e
25 em seguida lavados com tampões contendo concentrações sucessivamente menores de sais ou concentrações maiores de detergentes, ou em temperaturas crescentes até que a relação entre sinal e ruído para hibridização específica e não específica seja alta o bastante para facilitar a
30 detecção de hibridização específica. Condições de

temperatura estridentes irão geralmente incluir temperaturas que excedam cerca de 30°C, mais comumente que excedam cerca de 37°C e, ocasionalmente, que excedam cerca de 45°C. Condições de sal estridentes serão, comumente, de 5 menos que cerca de 1.000 mM, geralmente de menos de cerca de 500 mM, mais comumente de menos de cerca de 400 mM, tipicamente menos de cerca de 300 mM, tipicamente menos de cerca de 200 mM e mais tipicamente de cerca de menos de 150 mM. Entretanto, a combinação de parâmetros é mais 10 importante que a medida de qualquer parâmetro individual. Ver, por exemplo, Wetmur e outros, "J. Mol Biol", 31:349-70 (1966), e Wetmur, "Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology 26", (34):227-59 (1991).

Em uma modalidade, condições altamente estridentes 15 compreendem hibridização em 50% de formamida, SSC 6X (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato sódico, solução de Denhardt 5X, DNA de esperma de salmão sonificado (100/µg/mL), 0,5% de SDS e 10% de sulfato de dextrano a 42°C, com lavagens a 42°C em 20 SSC 2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e 0,1% de SDS, seguido de uma lavagem de alta estridência compreendendo SSC 0,2X contendo 0,1% de SDS a 42°C.

Os termos "complemento", "complementaridade" ou "complementar" conforme aqui utilizados, são utilizados 25 para descrever polinucleotídeos monofilamentares relacionados pelas regras de emparelhamento de base antiparalelo. Por exemplo, a sequência 5'-CTAGT-3' é completamente complementar à sequência 5'-ACTAG-3'. Complementaridade pode ser "parcial", onde a base 30 emparelhando é inferior a 100%, ou complementaridade pode

ser "completa" ou "total", implicando em complementação antiparalela 100% perfeita entre dois polinucleotídeos. Por convenção da técnica, moléculas de ácido nucléico monofilamentares são escritas com suas extremidades 5' para a esquerda e suas extremidades 3' para a direita.

O termo "par de bases complementar" refere-se a um par de bases (nucleotídeos) cada um em um ácido nucléico separado no qual cada base do par está ligada por hidrogênio à outra. Um emparelhamento de base "clássico" (Watson-Crick) contém uma purina e uma pirimidina; a adenina emparelha especificamente com timina (A-T), guanina com citosina (G-C), uracila com adenina (U-A). As duas bases em um par de bases clássico são referidos como sendo complementares um ao outro.

Substancialmente complementar entre um marcador ou ácido nucléico iniciador e um ácido nucléico alvo admite pequenas discrepâncias que podem ser acomodadas reduzindo-se a estringência do meio de hibridização para se atingir o grau desejado de hibridização e identificação do polinucleotídeo alvo hibridizado.

Um oligonucleotídeo de captura útil para identificação de um ácido nucléico alvo refere-se a um ácido nucléico ou fragmento que pode hibridizar a um polinucleotídeo, oligonucleotídeo, produto de amplificação ou similar e possui a capacidade de ser imobilizado a uma fase sólida. Um oligonucleotídeo de captura tipicamente hibridiza a pelo menos uma porção de um produto de amplificação contendo seqüências complementares sob condições estringentes.

Um oligonucleotídeo de captura de locus específico de HLA é um oligonucleotídeo de captura que é complementar a e

hibridiza a uma região conservada de um *locus* de HLA. Por exemplo, o oligonucleotídeo de captura pode ser específico para o *locus* de HLA-A e hibridizará a um ou mais regiões conservadas ou subsequências do *locus* de HLA-^a

5 De forma similar, um oligonucleotídeo de captura de *locus* específico de ST é um oligonucleotídeo de captura que é complementar a e hibridiza a uma região conservada de um *locus* de STR. Um oligonucleotídeo de captura de *locus* específico é um oligonucleotídeo de captura que é
10 complementar a e hibridiza a uma região conservada de um *locus* genérico.

Um oligonucleotídeo de captura é tipicamente imobilizado em uma fase sólida diretamente ou indiretamente. Tal imobilização pode se dar através de
15 ligações covalentes ou não covalentes.

O termo "amplicon" é aqui utilizado para significar uma população de moléculas de DNA que foram produzidas por amplificação, por exemplo, por PCR.

O termo "indivíduo" refere-se a um indivíduo mamífero
20 lactante. O indivíduo pode ser humano, bovino, caprino e similares. Por exemplo, a seleção quanto à origem de produtos de leite de mamíferos não humanos pode ser importante para rastreamento de produtos até um bovino em particular, por exemplo, para a FDA ou outras finalidades.

25 O termo "mutação" conforme aqui utilizado algumas vezes se refere a um polimorfismo funcional que ocorre na população e está fortemente correlacionado a um gene. O termo "mutação" é também utilizado aqui para se referir a um local e tipo específico de polimorfismo funcional, sem
30 referência ao grau de risco que uma mutação particular

ofereça a um indivíduo quanto a uma doença particular.

Um "auto-antígeno" é um antígeno que identifica o indivíduo em particular de outros indivíduos na população. Auto-antígenos exemplares incluem os antígenos de histocompatibilidade principais (MHC) ou os antígenos de tipo sanguíneo (ABO).

Um "perfil de auto-antígeno" significa um perfil de auto-antígeno de um humano ou de um indivíduo que é suficiente para distinguir o indivíduo único de outros indivíduos com um grau suficiente de certeza.

O termo "anticorpo" é utilizado em seu significado mais amplo e cobre anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia simples e fragmentos de anticorpos.

Em um aspecto, a invenção fornece um método para determinar origem de leite. Por exemplo, a fim de garantir que leite materno humano recebido de um humano específico realmente vem daquele humano, são necessários métodos de teste de identidade em algumas amostras de leite recebidas de cada humano.

Como parte do processo de qualificação para doador de leite, cada doador de leite em potencial será identificado por métodos biológicos (conforme descrito acima). As características de identificação do indivíduo estarão também presentes no leite do doador. Tais características serão utilizadas para comparar o leite do doador ao indivíduo doador.

Conseqüentemente, o método da invenção utilizou uma amostra biológica de referência de um doador em potencial para identificação biológica. Tais amostras podem ser

obtidas por métodos conhecidos na técnica tais como, sem estar limitados a, uma amostra de células de esfregão de bochecha ou uma amostra de sangue extraído ou outro tecido conveniente.

- 5 A amostra biológica de referência, identificada com um único número de referência, é testada em marcadores de identidade.

 É observado que a amostra biológica pode ter seu DNA tipado por métodos conhecidos na técnica, como análise STR
10 de loci de STR, análise de HLA de loci de HLA ou análise de gene múltiplo de genes/alelos individuais. O perfil de tipo de DNA da amostra de referência é registrado.

 É adicionalmente observado que a amostra biológica pode ser testada quanto a auto-antígenos utilizando-se
15 anticorpos conhecidos na técnica ou outros métodos para determinar um perfil de auto-antígeno.

 Um indivíduo desejando doar fluido mamário expressará o fluido mamário (leite materno) utilizando procedimentos padrão. O fluido mamário é tipicamente coletado em
20 recipientes úteis para envio e armazenamento. O fluido mamário pode ser então congelado para análise e uso posteriores ou analisados sem congelamento. Um ou mais recipientes são utilizados para se obter uma amostra de teste. A amostra de teste é retirada para identificação de
25 um ou mais marcadores de identidade.

 Métodos para obtenção de uma amostra de fluido congelado expresso incluem uma ferramenta de perfuração de aço inoxidável utilizada para perfurar um núcleo por todo o comprimento do recipiente. Alternativamente, uma amostra
30 pode ser raspada da superfície do fluido mamário congelado.

O recipiente pode conter uma porção separada que coleta uma amostra do fluido mamário expresso e esta pode ser removida como a amostra. Onde o fluido mamário está em forma líquida é observado que o método para obtenção da amostra de teste
5 será por pipetagem ou outro método.

É observado que amostras de um número de recipientes de leite do mesmo indivíduo podem ser utilizados para verificação de marcador de identidade. É observado que pelo menos 2 amostras, pelo menos 5 amostras ou pelo menos 8
10 amostras podem ser utilizadas para verificação.

É observado que a amostra de teste pode ser testada por tipagem de ácido nucléico utilizando-se métodos conhecidos na técnica, como análise STR de loci de STR, análise de HLA de loci de HLA ou análise de gene múltiplo
15 de genes/alelos individuais para se obter a tipagem de DNA da amostra de leite.

A tipagem de DNA ou perfil biológico (isto é, perfis de identidade das amostras de teste) será comparada à tipagem de DNA de referência ou perfil biológico para o
20 suposto doador. Uma combinação ou identidade da tipagem de DNA ou perfil biológico indicará que o fluido mamário foi obtido de um mesmo, por exemplo, indivíduo específico.

As amostras de núcleo podem ser também testadas por verificação de marcador de identidade quanto à presença de
25 perfis de marcador de identidade diferentes. Se não houver perfis de marcador de identidade que não o perfil de marcador de identidade do indivíduo esperado, indicará que não há fluido (por exemplo, leite) de outros humanos ou animais contaminando o fluido mamário doado. Se houver
30 sinais que não aquele sinal esperado para aquele indivíduo,

os resultados indicam contaminação. Tal contaminação resultará na reprovação do fluido mamário (por exemplo, leite) ao teste.

Amostras de ácidos nucleicos do doador de referência (por exemplo, DNA genômico) são isoladas de qualquer amostra biológica conveniente incluindo, mas não limitada a, leite, saliva, células bucais, raízes capilares, sangue e qualquer outra amostra de célula ou tecido com núcleos interfase ou células interfase intactas.

Métodos para isolamento de ácidos nucleicos (por exemplo, DNA genômico) destas várias fontes são descritos em, por exemplo, Kirby, "DNA Fingerprinting, An Introduction", W. H. Freeman & Co., Nova Iorque (1992). Ácidos nucleicos (por exemplo, DNA genômico) podem ser também isolados de culturas celulares primárias ou secundárias ou de linhas celulares transformadas derivadas de qualquer uma das amostras de tecido mencionadas anteriormente.

Amostras de RNA podem ser também utilizadas. O RNA pode ser também isolado conforme descrito em Sambrook e outros, supracitado. O RNA pode ser RNA celular total, mRNA, poli A+ RNA ou qualquer combinação destes. Para melhores resultados, o RNA é purificado, mas pode também ser RNA citoplasmático não purificado. O RNA pode ser transcrito de forma reversa para formar DNA que é então utilizado como o padrão de amplificação, de forma que PGR indiretamente amplifique uma população específica de transcrições de RNA. Ver, por exemplo, Sambrook e outros, supracitado, e Berg e outros, "Hum. Genet." 85:655-658, (1990).

Marcadores de DNA de repetições de microsatélites (STR), também chamadas de microsatélites ou repetições de sequência simples (SSRs) ou repetição de nucleotídeo de satélite de DNA ("DTNR"), compreendem sequências de DNA de satélites repetidos com uma repetição de núcleo de 2 a 6 pares de base (bp). Marcadores STR são prontamente amplificador durante a PCR utilizando-se iniciadores que se ligam a regiões conservadas do genoma flanqueando a região de repetição.

10 Repetições de tamanho comum incluem dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos e superiores. O número de repetições ocorrendo em um locus genético particular varia de poucas a centenas dependendo do locus e do indivíduo. A composição de repetições da sequência e da
15 base pode variar significativamente, incluindo uma falta de consistência em um locus de repetição de nucleotídeo particular. Milhares de loci de STR foram identificados no genoma humano e anteviu-se que ocorrem com a frequência de uma vez a cada 15 kb. Estudos de população foram executados
20 em dúzias destes marcadores de STR assim como extensos estudos de validação em laboratórios forenses. Sequências de iniciador específico localizadas nas regiões flanqueando a região de repetição de satélite de DNA foram utilizadas para amplificar alelos de loci de STR através da reação em
25 cadeia de polimerase ("PCR"). Os produtos de PCR incluem as regiões de repetição polimórficas, que variam em comprimento dependendo do número de repetições ou repetições parciais, e as regiões de flanqueamento, que são tipicamente de comprimento e sequência constantes entre
30 amostras.

O número de repetições presentes para um indivíduo particular em um *locus* particular está descrito como o valor do alelo para o *locus*. Pelo fato de a maioria dos cromossomos estarem presentes em pares, as amplificações por PCR de um único *locus* comumente produz dois produtos de PCR de tamanhos diferentes representando dois diferentes números de repetição ou valores de alelo. A faixa de números de repetição possíveis para um dado *locus*, determinado através de amostragem experimental da população, é definida como a faixa de alelo, e pode variar para cada *locus*, por exemplo, de 7 a 15 alelos. A faixa de tamanho do produto de PCR do alelo (faixa de tamanho do alelo) para um dado *locus* é definida pela colocação de dois iniciadores de PCR em relação à região de repetição e à faixa do alelo. As seqüências nas regiões que flanqueiam cada *locus* devem ser completamente conservadas de forma que os iniciadores se recombinem efetivamente e iniciem a amplificação por PCR. Para os propósitos de análise genética repetições de di-, tri- e tetranucleotídeos na faixa de 5 a 50 são tipicamente utilizadas nas seleções. Laboratórios Forenses usam *loci* de tetranucleotídeo (isto é, 4 pares de base na repetição) devido à menor quantidade de "fantasmas" produzidos durante a PCR (produtos fantasmas são picos adicionais que podem complicar a interpretação das misturas de DNA aparecendo em frente de picos de alelo regulares). O número de repetições pode variar de 3 a 4 repetições para mais de 50 repetições com marcadores extremamente polimórficos. O número de repetições e, por conseguinte o tamanho do produto de PCR pode variar entre as amostras em uma população tornando os marcadores STR

úteis na testagem de identidade dos estudos de mapeamento genético.

Há 13 *loci* STR centrais identificados na base de dados de CODIS dos Estados Unidos. Estes *loci* STR são TH01, TPOX, CSF1PO, VWA, FGA, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D8S1179, D18S51 e D21S11. A amelogenina marcadora de tipagem de sexo, está também incluída nos multiplex de STR que cobrem os 13 *loci* STR centrais. Os 13 *loci* STR de CODIS são cobertos pelos kits de Profiler Plus™ e Cofiler™ de Applied Biosystems (ABI) (Cidade de Foster, CA). É considerado que os seguintes *loci* STR possam ser usados nesta invenção: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, DYS19, F13A1, FESfFPS, FGA, HPRTB, TH01, TPOX, DYS388, DYS391, DYS392, DYS393, D2S1391, D18S535, D2S1338, D19S433, D6S477, D1S518, D14S306, D22S684, F13B, CD4, D12S391, D10S220 and D7S523 (a seqüência de cada *loci* está aqui incorporada para referência). Com exceção de D3 S1358, as seqüências para o *loci* STR desta invenção são acessíveis ao público geral através do GenBank (veja a Patente U. S. de número 6.090.558, aqui incorporada para referência). Outro *loci* STR foi desenvolvido por fabricantes comerciais e estudados extensivamente por cientistas forenses. Estes incluem todos os sistemas de STR de tetranucleotídeo GenePrint™ a partir de Promega Corporation (Madison, WI).

Muitos diferentes iniciadores foram projetados para vários *loci* STR e são relatados na literatura. Estes iniciadores recombina-se a segmentos de DNA fora da região de repetição em tandem do DNA para produzir produtos de PCR contendo a região de repetição em tandem. Estes iniciadores

foram projetados com separação eletroforética em gel de poliacrilamida em mente como um método de detecção/medição, porque as separações de DNA foram tradicionalmente executadas por eletroforese em gel de placa ou capilar. A análise de multiplex de STR é freqüentemente executada com amplificação por PCR e detecção de marcadores múltiplos. A multiplexação por STR é mais comumente executada usando-se etiquetas fluorescentes espectralmente distinguíveis e/ou tamanhos de produtos por PCR que não se sobrepõem. A amplificação de multiplex de STR em uma ou duas reações por PCR com iniciadores marcados de forma fluorescente e medição com separação por eletroforese em gel ou capilar e detecção fluorescente induzida a laser é um método padrão. Os alelos de STR destes produtos de PCR multiplexados tipicamente variam em tamanho de 100 a 800 pares de base com lotes comercialmente disponíveis.

Sistemas baseados em gel são capazes de multiplexar a análise de 2 ou mais *loci* STR usando-se dois métodos. O primeiro método é particionar por tamanho os diferentes *loci* de produto de PCR. O particionamento por tamanho envolve projetar os iniciadores de PCR usados para amplificar os diferentes *loci* de forma que a faixa de tamanho do produto de PCR alelo para cada *locus* cubra uma parte diferente e separável do espectro de tamanho do gel. Como um exemplo, os iniciadores de PCR para o *Locus A* devem ser projetados de forma que a faixa de tamanho dos alelos seja de 250 a 300 nucleotídeos, enquanto que os iniciadores para o *Locus B* são projetados para produzir uma faixa de tamanho de alelos de 340 a 410 nucleotídeos.

O segundo método para multiplexar 2 ou mais *loci* STR

em sistemas baseados em gel é o uso de particionamento espectroscópico. O estado atual da técnica para os sistemas baseados em gel envolve o uso de corantes fluorescentes como marcadores espectroscópicos específicos para diferentes *loci* amplificados de PCR. Diferentes cromóforos que emitem luz em diferentes comprimentos de onda fornecem um método para detecção diferencial de dois diferentes produtos de PCR mesmo se eles são exatamente do mesmo tamanho, assim 2 ou mais *loci* podem produzir produtos de PCR com faixas de tamanho que se sobrepõem. Por exemplo, o *Locus A* com um marcador fluorescente verde produz uma faixa de tamanho de alelo de 250 a 300 nucleotídeos, enquanto que o *Locus B* com um marcador fluorescente vermelho produz uma faixa de tamanho de alelo de 270 a 330 nucleotídeos. Um dispositivo de detecção fluorescente excitado a laser para escaneamento monitora o comprimento de onda de emissões e determina diferentes tamanhos de produto de PCR, e seus valores de alelo correspondentes, para seus *loci* específicos com base em sua cor fluorescente.

É considerado que um método de espectrometria de massa para tipificar e analisar STR, examinar oligômeros de ácido nucleico menores pode ser usado porque a sensibilidade de detecção e resolução de massa são superiores com oligômeros menores. A aplicação de análise de STR ao tempo de vôo-espectrometria de massa (TOF-MS) requer o desenvolvimento de conjuntos de iniciadores que produzem pequenos produtos de PCR de 50 a 160 nucleotídeos de comprimento, tipicamente de 50 a 100 nucleotídeos de tamanho. Os ácidos nucleicos amplificados podem também ser usados para gerar produtos filamentosos únicos que estão na faixa de tamanho desejado

para análise de TOF-MS através do prolongamento de um iniciador na presença de um reagente de terminação de cadeia. Uma classe típica de reagente de terminação de cadeia comumente usado por aqueles habilitados na técnica é o trifosfato de dideoxinucleotídeo. Novamente, a aplicação de análise de STR ao TOF-MS requer que o iniciador seja prolongado para gerar produtos de 50^a 160 nucleotídeos de tamanho, e tipicamente cerca de 50 a 100 nucleotídeos de tamanho (ver a Patente U. S. de número 6.090.558, aqui incorporada por referência).

Um oligonucleotídeo clivável biotinilado é usado como um iniciador em cada ensaio e é incorporado através de metodologias de amplificação de ácido nucleico (isto é, PCR) no produto final que é medido no espectrômetros de massa. Este processo está descrito em, por exemplo, Patente U. S. de número 5.700.642 e Patente U. S. de número 6.090.558 (ver também Butler e outros, International Journal of Legal Medicine 112(1) 45-59 (1998)). O ensaio de STR envolve uma etapa de amplificação por PCR onde um dos iniciadores é substituído por um iniciador biotinilado clivável. O produto de PCR biotinilado é então capturado nas contas magnéticas revestidas com estreptavidina para limpeza de amostra pós-PCR e remoção de sal, seguida por análise de espectrometria de massa.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) representam uma outra forma de variação de DNA que é útil para testagem de identidade humana. SNPs são as formas mais freqüentes de variação de sequência de DNA nos genomas de organismos e estão se tornando de forma crescente marcadores genéticos populares para estudos de mapeamento de genoma e

diagnóstico médico. SNPs são tipicamente bi-alélicos com dois possíveis nucleotídeos (nt) ou alelos em um sítio particular no genoma. Porque os SNPs são menos polimórficos (isto é, possuem menos alelos) que os marcadores STR correntemente usados, mais marcadores de SNP são exigidos para se obter o mesmo nível de discriminação entre as amostras. Aproximadamente de 30-50 SNPs não ligados podem ser exigidos para se obter as probabilidades de combinação de 1 em 100 bilhões conforme visto com os 13 STRs do CODIS.

10 Um ensaio de SNP envolve tipicamente um processo de três etapas: (1) amplificação por PCR, (2) remoção de fosfatase de nucleotídeos, e (3) extensão de iniciador usando-se um iniciador clivável biotinilado com dideoxinucleotídeos para adição de base única dos nucleotídeos complementares àqueles no sítio de SNP (Li e outros, Electrophoresis 20(6):1258-1265 (1999)) .

15 A análise simultânea de múltiplos marcadores de SNP (isto é, multiplexação) é possível colocando-se os sítios de clivagem em posições diferentes nos vários iniciadores de forma que eles não se sobreponham em uma escala de massa.

O meio mais comum para amplificação é a reação em cadeia de polimerase (PCR), conforme descrito nas Patentes U. S. de números 4.683.195, 4.683.202, 4.965.188 cuja divulgação de cada uma está aqui incorporada por referência. Se PCR é usado para amplificar as regiões alvo nas células de sangue, sangue integral heparinizado deve ser retirado em um tubo selado a vácuo mantido separado de outras amostras e manipulado com luvas limpas. Para 25 melhores resultados, o sangue deve ser processado

imediatamente após coleta; se for possível, ele deve ser mantido em um recipiente lacrado a 4°C até o uso. As células em outros fluidos fisiológicos podem também ser analisados. Quando se usa qualquer um destes fluidos, as
5 células no fluido devem ser separadas do componente do fluido por centrifugação.

Para amplificar uma sequência de ácido nucleico objetivada em uma amostra por PCR, a sequência deve ser acessível aos componentes do sistema de amplificação. Um
10 método de isolamento do DNA alvo é a extração bruta que é útil para amostras relativamente grandes. De forma resumida, as células mononucleares das amostras de sangue, células da boca, ou semelhantes são isolados. As pelotas são armazenadas congeladas a -20°C até que sejam usadas
15 (Publicação de Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada por referência).

As pelotas podem ser ressuspensas na solução de lise do kit de isolamento de DNA PUREGENE® (cat#D-5000, GENTRA, Minneapolis, MN) CONTENDO 100/μG/mL de proteinase K. Após
20 incubação a 55°C durante a noite. A extração de DNA é executada de acordo com as recomendações dos produtores. As amostras de DNA são ressuspensas em solução aquosa e armazenadas a -20°C.

Quando a amostra contém um grande número de células, a
25 extração pode ser executada por métodos conforme descrito em Higuchi, "Simple and Rapid Preparation of Samples for PCR", em PCR Technology, p. 31-43 Ehrlich, H. A. (ed.), Stockton Press, New York.

Um procedimento relativamente fácil para extrair DNA
30 por PCR é um procedimento de coagulação adaptado do método

descrito por Miller e outros, Nucleic Acids Res. 16:1215, (1988), que está incorporada por referência. Células nucleadas são ressuspensas em 3 mL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM Na₂ EDTA, pH 8,2). Cinquenta
5 microlitros de uma solução 20 mg/mL de proteinase K e 200 µL de uma solução 20% SDS são adicionados às células e então incubados a 37°C durante a noite. Seguindo a digestão adequada, 1 mL de uma solução NaCl 6M é adicionado à amostra e vigorosamente misturado. A solução resultante é
10 centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. A pelota contém as proteínas celulares precipitadas, enquanto o sobrenadante contém o DNA. O sobrenadante é removido a um tubo de 15 mL que contém 4 mL de isopropanol. Os conteúdos do tubo são misturados gentilmente até que a água e as fases de álcool
15 sejam misturadas e um precipitado de DNA branco fosse formado. O precipitado de DNA é colocado em água destilada e dissolvido. (A publicação de Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada para referência).

Kits para a extração de DNA de alto peso molecular por
20 PCR incluem o kit de isolamento de DNA PUREGENE® GENTRA (D-5000), um kit de isolamento genômico A.S.A.P.® (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.), Sistema de isolamento de DNA genômico (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md.), kit de purificação de DNA ELU-QUIK® (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.), Kit
25 de extração de DNA (Stratagene, LaJolla, Calif.), kit de isolamento TURBOGEN® (Invitrogen, San Diego, Calif.), e etc. O uso destes kits de acordo com as instruções do fabricante é geralmente aceitável para a purificação do DNA antes de se praticar os métodos da invenção (Publicação de
30 Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui

incorporada para referência).

A concentração e pureza do DNA extraído podem ser determinadas por análise espectro fotométrica da absorbância de uma alíquota diluída a 260 nm e 280 nm.

5 Após a extração do DNA, a amplificação por PCR pode proceder. A primeira etapa de cada ciclo do PCR envolve a separação do duplo ácido nucleico formado pela extensão do iniciador. Uma vez que os filamentos são separados, a próxima etapa em PCR envolve a hibridização dos filamentos
10 separados com os iniciadores que flanqueiam a sequência alvo. Os iniciadores são então prolongados para formar cópias complementares dos filamentos alvos. Para amplificação por PCR bem-sucedida, os iniciadores são projetados de forma que a posição na qual cada iniciador
15 hibridiza ao longo da sequência dupla é tal que um produto de extensão sintetizado a partir de um iniciador, quando separado do modelo (complemento), serve como um modelo para a extensão do outro iniciador. Os ciclos de desnaturação, hibridização e extensão são repetidos quantas vezes quanto
20 necessário para se obter a quantidade desejada de ácido nucleico amplificado (Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada para referência).

Em uma modalidade de amplificação por PCR, a separação do filamento é alcançada aquecendo-se a reação a uma
25 temperatura suficientemente alta por um tempo suficiente para causar a desnaturação da dupla mas não causar uma desnaturação irreversível da polimerase (veja Patente U. S. de número 4.965.188, aqui incorporada para referência). A desnaturação por calor típica envolve temperaturas variando
30 de cerca de 80°C a cerca de 105°C por períodos de tempo

variando de segundos a minutos. A separação dos filamentos, entretanto, pode ser executada por qualquer método de desnaturação adequado incluindo meios físicos, químicos ou enzimáticos. A separação do filamento pode ser induzida por
5 uma helicase, por exemplo, ou uma enzima capaz de exibir atividade de helicase. Por exemplo, a enzima RecA possui atividade de helicase na presença de ATP. Condições de reação adequadas para a separação de filamento por helicases são conhecidas na técnica (ver Kuhn e outros,
10 1979, CSH-Quantitative Biology, 43:63-67; e Radding, 1982, Ann. Rev. Genetics 16:405-437, incorporada por referência).

A extensão dependente de modelo dos iniciadores em PCR é catalisada por um agente de polimerização na presença de quantidades adequadas de quatro trifosfatos de
15 desoxirribonucleotídeos (tipicamente dATP, dGTP, dCTP e dTTP) em um meio de reação compreendido dos sais apropriados, cátions metálicos, e sistemas de tamponamento de pH. Agentes de polimerização adequados são enzimas conhecidas por catalisarem a síntese de DNA dependente de
20 modelo. Em alguns casos, as regiões alvo podem codificar pelo menos uma parte de uma proteína expressa pela célula. Neste exemplo, o mRNA pode ser usado para amplificação da região alvo. Alternativamente, o PCR pode ser usado para gerar uma biblioteca de cDNA a partir do RNA para
25 amplificação posterior, o modelo inicial para extensão do iniciador é o RNA. Os agentes de polimerização adequados para sintetizar uma sequência de cópia do DNA (cDNA) complementar a partir do modelo de RNA são transcriptase reversa (RT), tal como a RT do vírus da mieloblastose
30 aviária, a RT do vírus da leucemia murina de Moloney ou a

DNA polimerase de *Thermus thermophilus* (Tth), uma DNA polimerase termoestável com a atividade da transcriptase reversa comercializada por Perkin Elmer Cetus, Inc. Tipicamente, o modelo de RNA genômico é degradado por aquecimento durante a primeira etapa de desnaturação após a etapa de transcrição reversa deixando apenas um modelo de DNA. As polimerases adequadas para uso com um modelo de DNA incluem, por exemplo, a DNA polimerase I da *E. coli* ou seu fragmento Klenow, a T4 DNA polimerase, Tth polimerase, e Taq polimerase, uma DNA polimerase estável ao calor isolada da *Thermus aquaticus* e comercialmente disponível a partir de Perkin Elmer Cetus, Inc. A última enzima é amplamente usada na amplificação e seqüenciamento dos ácidos nucleicos. As condições de reação para uso da Taq polimerase são conhecidas na técnica (Publicação de Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada por referência).

A PCR alelo-específica diferencia entre as regiões alvo diferenciando-se na presença ou ausência de uma variação ou polimorfismo. Os iniciadores de amplificação por PCR são escolhidos os quais se ligam apenas a certos alelos da seqüência alvo. Este método está descrito por Gibbs, *Nucleic Acid Res.* 17:2437-2448 (1989) (Publicação de Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada para referência).

Métodos de seleção de diagnóstico adicionais empregam os métodos de seleção por oligonucleotídeo alelo-específico (ASO), conforme descritos por Saiki e outros, *Nature* 324:163-166 (1986). Os oligonucleotídeos com um ou mais pares de base desemparelhados são gerados para qualquer

alelo particular. Os métodos de seleção por ASO detectam desemparelhamentos entre o DNA amplificado por PCR ou o DNA genômico de alvo variante e os oligonucleotídeos não mutantes, mostrando ligação diminuída dos oligonucleotídeos em relação a um oligonucleotídeo mutante. Os marcadores de oligonucleotídeo podem ser projetados de forma que, sob baixa estringência, se liguem a ambas as formas polimórficas do alelo, mas que sob alta estringência, se liguem ao alelo que eles correspondem. Alternativamente, as condições de estringência podem ser projetadas de forma que uma resposta essencialmente binária seja obtida, isto é, um ASO correspondente a uma forma variante do gene alvo que se hibridizará àquele alelo, e não ao alelo do tipo selvagem (Publicação de Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada para referência).

As regiões alvo do DNA de um indivíduo podem ser comparadas com a amostra do fluido mamário por detecção de alelo mediado por ligase. A ligase pode também ser usada para detectar mutações pontuais na reação de amplificação da ligação descrita em Wu e Wallace, *Genomics* 4:560-569 (1989). A reação de amplificação de ligação (LAR) utiliza a amplificação da sequência de DNA específica usando rodadas sequenciais de ligação dependente de modelo conforme descrito em Barany, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:189-193 (1990) (Publicação de Patente U. S. de número 20040253594 que está aqui incorporada para referência).

Os produtos de amplificação gerados usando-se a reação em cadeia da polimerase podem ser analisados pelo uso de eletroforese em gel de gradiente desnaturante. Alelos diferentes podem ser identificados com base nas diferentes

propriedades de fusão dependentes de sequência e migração eletroforética do DNA em solução. A fusão de moléculas de DNA em segmentos, chamados de domínios de fusão, sob condições de temperatura aumentada ou desnaturação. Cada
5 domínio de fusão funde-se de forma cooperativa a uma temperatura de fusão (TM) distinta específica à base. Os domínios de fusão possuem pelo menos 20 pares de base de comprimento e podem ser de até várias centenas de pares de base de comprimento.

10 A diferenciação entre os alelos com base nas diferenças de domínio de fusão específico à sequência pode ser avaliada usando-se eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito em Myers e outros, Capítulo 7 de Erlich ed., PCR Technology, W. H. Freeman e
15 Co., New York (1989) aqui incorporada por referência.

Geralmente, uma região alvo a ser analisada por eletroforese em gel de gradiente desnaturante é amplificada usando-se iniciadores de PCR que flanqueiam a região alvo. O produto de PCR amplificado é aplicado a um gel de
20 poliacrilamida com um gradiente desnaturante linear conforme descrito em Myers e outros, Meth. Enzymol. 155:501-527 (1986), e Myers e outros, em Genomic Analysis, A Practical Approach, K. Davies Ed. IRL Press Limited, Oxford páginas 95-139 (1988). O sistema de eletroforese é
25 mantido a uma temperatura levemente abaixo da TM dos domínios de fusão das seqüências alvo.

Em um método alternativo de eletroforese em gel de gradiente desnaturante, as seqüências alvos podem ser inicialmente fixadas a uma extensão de nucleotídeos GC,
30 chamado de "GC-clamp", conforme descrito por Myers no

Capítulo 7 de Erlich, PCT Technology Stockton Press. É considerado que pelo menos 80% dos nucleotídeos na "GC-clamp" ou são guanina ou citosina. O "GC-clamp" pode possuir pelo menos 30 bases de comprimento. Este método é particularmente adaptado às seqüências alvo com altas TM's.

Geralmente, a região alvo é amplificada pela reação em cadeia da polimerase conforme descrito acima. Um dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR carrega em sua extremidade 5', a região de "GC-clamp", pelo menos 30 bases da seqüência rica em GC, que está aqui incorporada na extremidade 5' da região alvo durante a amplificação. A região alvo amplificada resultante é submetida em um gel de eletroforese sob condições de gradiente desnaturante conforme descrito acima. Os fragmentos de ácido nucleico que se diferenciam por uma única mudança de base migrarão através do gel a diferentes posições que podem ser visualizadas por coloração de brometo de etídio.

A eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) é baseada nos mesmos princípios fundamentais da eletroforese em gel de gradiente desnaturante, exceto que o gradiente desnaturante é produzido por diferenças em temperatura em vez de diferenças na concentração de um desnaturante químico. A TGGE padrão utiliza um aparelho de eletroforese com um gradiente de temperatura submetido ao longo da rota de eletroforese. À medida que as amostras migram através de um gel com uma concentração uniforme de um desnaturante químico, elas encontram temperaturas crescentes. Um método alternativo de TGGE, eletroforese em gel com gradiente de temperatura temporal (TTGE ou tTGGE) usa uma temperatura que aumenta regularmente do gel de

eletroforese inteiro para alcançar o mesmo resultado. À medida que as amostras migram através do gel, a temperatura do gel inteiro aumenta, levando as amostra a encontrar temperatura crescente à medida que elas migram através do gel. A preparação das amostras, incluindo amplificação por PCR com incorporação de uma "GC-clamp", e a visualização dos produtos são as mesmas para a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (ver, por exemplo, Publicação de Patente U. S. de número 20040253594).

10 O complexo antígeno de leucócito humano (também conhecido como o complexo de maior histocompatibilidade) atravessa aproximadamente 3,5 milhões de pares de base no braço curto do cromossomo 6. Ele é divisível em 3 regiões separadas que contém os genes de classe I, classe II e de classe II. Em humanos, o complexo HLA classe I possui cerca de 2000 kb de comprimento e contém cerca de 20 genes. Dentro da região de classe I existem genes que codificam as bem caracterizadas moléculas MHC classe I designadas HLA-A, HLA-B e HLA-C. Além disso, há genes de classe I não clássicos que incluem HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H, HLA-J e I-ILA-X assim como uma nova família conhecida como MIC. A região de classe II contém três genes conhecidos como os loci HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR. Estes genes codificam as cadeiras das moléculas MHC classe II clássicas designadas HLA-DR, DP e DQ. Em humanos, os genes não clássicos designados DM, DN e Do foram também identificados dentro da classe II. A região de classe II contém uma coleção heterogênea de mais de 36 genes. Vários componentes completos são codificados por três genes incluindo as TNF's (ver, por exemplo, a Patente U. S. de número 6.670.124 aqui

15

20

25

30

incorporada por referência).

Qualquer cópia dada do cromossomo 6 humano pode conter várias diferentes versões alternativas de cada um dos genes precedentes e assim pode produzir proteínas com seqüências
5 distintamente diferentes. Os loci que constituem a MHC são altamente polimórficos, isto é, muitas formas do gene ou alelos existem em cada locus. Várias centenas de variantes alélicas diferentes de moléculas MHC de classe I e classe II foram identificadas em humanos. Entretanto, qualquer uma
10 apenas expressa até 6 diferentes moléculas de classe I e até 12 diferentes moléculas de classe II.

As regiões precedentes desempenham uma importante função na determinação se o tecido transplantado será aceito com sendo próprio (histocompatível) ou rejeitado
15 como estranho (histoincompatível). Por exemplo, dentro da região de classe II, três loci, isto é, HLA-DR, DQ e DP são conhecidos por expressar produtos funcionais. Pares de genes A e B dentro destes três loci codificam produtos de proteína heterodimérico que são multi-alélicos e
20 alorreativos. Além disso, combinações de epítomos em moléculas DR e/ou DQ são reconhecidos por células T alorreativas. Esta reatividade foi usada para definir os tipos "DW" por ensaios celulares com base na reação mista de linfócito (MLR). É considerado que a união do tipo HLA
25 da amostra biológica de referência com a amostra de fluido mamário pode ser usada para determinar se a amostra de fluido mamário foi originada do doador.

Um método de tipagem de ácido nucleico para a identificação destes alelos foi a análise de polimorfismo
30 no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) discutida

aqui (ver também, Patente U. S. de número 6.670.124).

Além do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), um outro método é a hibridização dos produtos amplificados por PCR com marcadores de oligonucleotídeos específicos a sequência (PCR-SSO) para 5 distinguir entre os alelos HLA (ver, Tiercy e outros, (1990) Blood Review 4:9-15). Este método requer que um produto de PCR do locus HLA de interesse seja produzido e então semeado sobre membranas ou tiras de nitrocelulose. 10 Então cada membrana é hibridizada com um marcador específico à sequência, lavado e então analisado por exposição a filme de raios-X ou por ensaio colorimétrico dependendo do método de detecção. Similar à metodologia de PCR-SSP, os marcadores são feitos para a área polimórfica 15 alélica responsável pelos diferentes alelos HLA. Cada amostra deve ser hibridizada e marcada pelo menos de 100 a 200 vezes diferentes para uma tipagem de Classe I e II completa. Os métodos de hibridização e detecção para tipagem por PCR-SSO incluem o uso de marcadores marcados 20 não radioativos, formatos de microplaca, e etc. (veja, por exemplo, Saiki e outros (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. , U.S.A. 86:6230-6234; Erlich e outros (1991) Eur. J. Immunogenet. 18(1-2):33-55; Kawasaki e outros (1993) Methods Enzymol. 218:369-381), e tipagem de HLA classe II 25 em grande escala automatizada (veja, por exemplo, Patente U. S. de número 6.670.124).

Um outro método de tipagem compreende a amplificação de iniciador específico à sequência (PCR-SSP) que pode ser usado nos métodos da invenção (veja, Olemp e Zetterquist 30 (1992) Tissue Antigens 39:225-235). Em PCR-SSP, os

iniciadores específicos à sequência alélicos amplificam apenas o alelo do modelo complementar, permitindo a variabilidade genética para ser detectada com um alto grau de resolução. Este método permite a determinação do tipo de HLA simplesmente se os produtos de amplificação (coletivamente chamados de "amplicon") estão ou não presentes ou ausente depois da PCR. Em PCR-SSP, a detecção dos produtos de amplificação é freqüentemente feita por eletroforese em gel de agarose seguida por coloração com brometo de etídio (EtBr) do gel (ver, por exemplo, Patente U. S. de número 6.670.124).

Um outro método de tipagem de HLA é o SSCP-Single-Stranded Conformational Polymorphism. Resumidamente, os produtos de PCR de filamento único do loci de HLA diferente são submetidos à Eletroforese em Gel de Poliacrilamida não desnaturante (PAGE). O filamento único irá migrar a uma única locação com base em sua composição do par da base. Por comparação com filamentos conhecidos, uma tipagem pode ser deduzida. Este é o único método que pode determinar a homozigiosidade (ver, por exemplo, Patente U. S. de número 6.670.124) (Orita e outros, Proc. Nat. Acad. Sci 86:2766-2770 (1989)).

A identificação de uma sequência de DNA pode ser feita sem uma etapa de amplificação, com base em polimorfismos incluindo polimorfismos em comprimento de fragmento de restrição ("RFLP") em um indivíduo. Os marcadores de hibridização são geralmente oligonucleotídeos que se ligam através de pares de base complementares a todo ou parte de um ácido nucleio alvo. Os marcadores tipicamente ligam sequências alvo carentes de complementaridade completa com

a sequência de marcador dependente da estringência das condições de hibridização. Os marcadores são tipicamente marcados diretamente ou indiretamente, de forma que pela análise da presença ou ausência do marcador, pode-se
5 detectar a presença ou ausência da sequência alvo. Métodos de marcação direta incluem marcação com radioisótopo, tal como com ^{32}P ou ^{35}S . Métodos de marcação indireta incluem etiquetas fluorescentes, complexos de biotina que podem ser ligados a avidina ou estreptavidina, ou etiquetas de
10 peptídeo ou de proteína. Os métodos de detecção visuais incluem fotoluminescentes, vermelho Texas, rodamina e seus derivados, corante leuco vermelho e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), fluoresceína, e seu derivados, dansil, umbeliferona e etc. ou com peroxidase do rábano
15 silvestre, fosfatase alcalina e etc. (ver, por exemplo, Publicação de Patente U. S. de número 20040253594, Publicação de Patente U. S. de número 20050123947, que estão aqui incorporadas para referência).

Uma ou mais enzimas de restrição adicionais e/ou
20 marcadores e/ou iniciadores podem ser usados. Enzimas adicionais, marcadores construídos e iniciadores podem ser determinados por experimentação de rotina por aqueles habilitados na técnica e são objetivados para estarem inseridos no escopo da invenção.

25 Embora os métodos descritos aqui possam ser em termos do uso de uma única enzima de restrição e um único conjunto de iniciadores, os métodos não são desta forma limitados. Uma ou mais enzimas de restrição adicionais e/ou marcadores e/ou iniciadores podem ser usados, se desejado. Enzimas
30 adicionais, marcadores construídos e iniciadores podem ser

determinados através de experimentação de rotina, combinados com os ensinamentos fornecidos e aqui incorporados.

Os reagentes adequados para aplicar os métodos da
5 invenção podem ser embalados em kits convenientes. Os kits fornecem os materiais necessários, embalados em recipientes adequados. Tipicamente, o reagente é um conjunto de PCR (um conjunto de iniciadores, DNA polimerase e 4 nucleosídeos trifosfatos) que se hibridizam com o gene ou loci deste.
10 Tipicamente, o conjunto de PCR é incluído no kit. Tipicamente, o kit também compreende meios adicionais, tais como reagentes, para detectar ou medir a entidade detectável ou fornecer um controle. Outros reagentes usados para hibridização, pré-hibridização, extração de DNA,
15 visualização, etc. podem também ser incluídos, se desejado.

É também considerado que a amostra de fluido mamário pode ser testada para auto-antígenos presentes no fluido mamário para estabelecer um perfil de auto-antígeno (perfil marcador de identidade) O perfil de auto-antígeno da
20 amostra de fluido mamário será comparado ao perfil de auto-antígeno de referência para o humano individual. Uma combinação ou identidade do perfil de auto-antígeno indicará que o fluido mamário foi obtido a partir do indivíduo específico.

25 Os vários antígenos que determinam o próprio são codificados por mais de 40 loci diferentes, tal como o principal complexo de histocompatibilidade (MHC), também chamado de locus do antígeno de leucócito humano (HLA) e os antígenos do grupo do sangue, tal como ABO.

30 Métodos são conhecidos na técnica para selecionar

humanos para o tipo de grupo sanguíneo ABO. Os antígenos do grupo de sangue são expressos em células vermelhas do sangue, células epiteliais e células endoteliais.

O teste para o tipo de HLA podem ser conduzidos por
5 métodos conhecidos na técnica tal como tipagem sorológica e celular.

É considerado que os antígenos poderão ser identificados por um teste microcitotoxicidade. Neste teste, células brancas do sangue são distribuídas em uma
10 placa de microtitulação e anticorpos monoclonais específicos para antígenos MHC de classe I e classe II são adicionados a diferentes cavidades. Desde então, complemento é adicionado às cavidades e a citotoxicidade é avaliada por absorção ou exclusão para vários corantes (por
15 exemplo, azul de tripan ou eosina) pelas células. Se as células brancas do sangue expressão o antígeno MHC para um anticorpo monoclonal particular, então as células serão lisadas na adição do complemento e estas células mostrarão absorver o corante (ver, Terasaki e McClelland, (1964)
20 Nature, 204:998 e Patente U. S. de número 6.670.124). A tipagem de HLA baseada na microcitotoxicidade mediada por anticorpo pode portanto indicar a presença ou ausência de vários alelos MHC (veja, Kuby Immunology, 4ª Edição, Freeman and Company, páginas 520-522).

25 A detecção de antígenos pode ser selecionada a partir de, mas não é limitada a, ensaios imunossorvente ligados à enzima, imunoensaios radioligantes de fase sólida onde os anticorpos podem ser direcionados contra antígenos solúveis ou antígenos de superfície de célula, autoradiografia,
30 radioimunoensaio de ligação competitiva, ensaio

imunoradiométrico (IRMA), microscopia de elétrons, marcação com peroxidase antiperoxidase (PAP), microscopia fluorescente, marcação com fosfatase alcalina e marcação com peroxidase.

5 No caso onde o(s) método(s) de detecção usa(m) microscópio ótico, as células da amostra biológica ou a amostra do fluido mamário são montadas e fixadas em uma lâmina de microscópio. Neste caso, a etapa de detecção do anticorpo marcado consiste em detectar uma coloração
10 resultante do auto-antígeno com um microscópio ótico (ver, por exemplo, Patente U. S. de número 6.376.201).

 Várias modalidades da invenção foram descritas. Entretanto, será compreendido que várias modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito e escopo da invenção.
15 Conseqüentemente, outras modalidades estão inseridas no escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar se um fluido mamário doado foi obtido a partir de um indivíduo específico, o método caracterizado por compreender:

5 (a) testar uma amostra biológica doada a partir do indivíduo específico para se obter pelo menos um perfil marcador de identidade de referência para pelo menos um marcador;

(b) testar uma amostra do fluido mamário doado para se
10 obter pelo menos um perfil marcador de identidade para o pelo menos um marcador na etapa (a); e

(c) comparar os perfis marcadores de identidade,
onde uma combinação entre os perfis marcadores de
identidade indica que o fluido mamário foi obtido a partir
15 do indivíduo específico.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teste da amostra de fluido mamário e o teste da amostra biológica compreendem uma tipagem de ácido nucleico.

20 3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a tipagem do ácido nucleico compreende um método selecionado a partir do grupo consistindo de: análise STR, análise de HLA, análise de gene múltiplo e uma combinação destes.

25 4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a tipagem do ácido nucleico compreende uma análise de STR.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a tipagem do ácido nucleico
30 compreende uma análise de HLA.

6. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a tipagem do ácido nucleico compreende uma análise de gene múltiplo.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o fluido mamário doado é congelado.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por também compreender a obtenção da amostra de fluido mamário através da perfuração até o centro do fluido congelado.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por também compreender a obtenção da amostra de fluido mamário por raspagem da superfície do fluido mamário congelado.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por também compreender isolar o fluido mamário antes da etapa (b).

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra de fluido mamário compreende uma mistura de uma ou mais amostras de fluido mamário.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teste da amostra de fluido mamário e o teste da amostra biológica compreendem um teste de anticorpo para se obter um perfil de auto-antígeno.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra do fluido mamário doado compreende uma fração sólida selecionada do fluido.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os perfis de identidade

compreendem marcadores de peptídeo.

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica doada é selecionada a partir do grupo consistindo de: leite,
5 saliva, célula bucal, raiz de cabelo e sangue.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as amostras biológicas doadas compreendem uma amostra de sangue.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15,
10 caracterizado pelo fato de que as amostras biológicas doadas compreendem uma célula bucal.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a falta de uma combinação entre os perfis de marcador de identidade indica
15 contaminação do fluido mamário por um outro mamífero.

19. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as etapas (a) até (c) são executadas em um centro de doação de leite materno humano.

20. Método para determinar se um fluido mamário doado
20 foi obtido a partir de um indivíduo específico, caracterizado por compreender:

(a) testar uma amostra do fluido mamário para se obter pelo menos um perfil marcador de identidade;

(b) testar uma amostra biológica a partir do indivíduo
25 específico para se obter pelo menos um perfil marcador de identidade de referência; e

(c) comparar os perfis marcadores de identidade, onde uma combinação entre os perfis marcadores de identidade é indicativa de que o fluido mamário foi obtido a partir do
30 indivíduo específico.

**MÉTODO PARA DETERMINAR SE UM FLUIDO MAMÁRIO DOADO FOI
OBTIDO A PARTIR DE UM INDIVÍDUO ESPECÍFICO**

A divulgação está relacionada de maneira geral a um
método para testar fluido mamário (incluindo leite) para
5 estabelecer ou confirmar a identidade do doador do fluido
mamário. Tais métodos e sistemas são úteis na indústria de
banco de leite para aumentar a segurança.