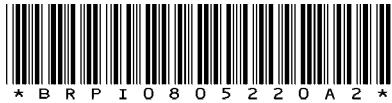




República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0805220-4 A2



* B R P I 0 8 0 5 2 2 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 21/11/2008
(43) Data da Publicação: 17/08/2010
(RPI 2067)

(51) Int.Cl.:
C07K 1/14
C07K 14/025
G01N 33/569

(54) Título: MÉTODOS PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA A PARTIR DE CÉLULAS FIXAS E PARA DETECTAR UMA PROTEÍNA, SISTEMA E KIT PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA, E, MÉTODO PARA EXTRAIR UMA PROTEÍNA VIRAL ALVO DE UMA AMOSTRA DE CÉLULA

(73) Titular(es): Arbor Vita Corporation, Becton, Dickinson And Company

(72) Inventor(es): Johannes Schweizer, Lydia Blank, Nancy Hasse, Peter Lu, Stephen Lovell, Virginia Crews

(57) Resumo: Métodos para produzir um extrato de proteína de células, tais como células contendo proteínas virais, são fornecidos. Em termos gerais, os métodos envolvem: aumentar o pH das células a um pH pelo menos em torno do pH 10,0 para produzir uma composição intermediária, e depois, na presença de um detergente não iônico, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteína. Kits e composições para praticar os métodos objetos são também fornecidos.



PI0805220-4

1

“MÉTODOS PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA A PARTIR DE CÉLULAS FIXAS E PARA DETECTAR UMA PROTEÍNA, SISTEMA E KIT PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA, E, MÉTODO PARA EXTRAIR UMA PROTEÍNA VIRAL ALVO DE UMA

5 AMOSTRA DE CÉLULA”

REFERÊNCIA CRUZADA

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº 60/747.076, depositado em 11 de maio de 2006, pedido este que é aqui incorporado por referência.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Em muitos métodos de diagnóstico, as células são tiradas de um paciente e depositadas em um meio líquido contendo um fixador. As células são fixadas no meio e examinadas citologicamente de modo a fornecer um diagnóstico. Por exemplo, a detecção de células pré cancerosas ou cancerosas em tecido cervical é rotineiramente realizada pela avaliação microscópica de células do colo do útero esfoliadas. Este método, desenvolvido por George N. Papanicolaou e conhecido como o teste “Pap”, envolve esfoliar células do colo do útero de uma mulher usando um dispositivo de amostragem, depositando as células esfoliadas em um meio de 15 transporte que contenha um fixador e depois depositando as células sobre uma lâmina. As células são depois tingidas e examinadas pela microscopia ótica quanto às anormalidades celulares por um profissional médico treinado. Mais de 20 55 milhões de testes Pap são realizados a cada ano apenas nos Estados Unidos.

A despeito do sucesso de tais testes citológicos, os testes são propensos a erro. Por exemplo, foi estimado que até 40 % dos testes de Pap convencionais são comprometidos pela presença de contaminantes tais como muco, células sanguíneas e células inflamatórias obscurecidas. Estes contaminantes levam a resultados falso negativos, resultados falso positivos e

uma quantidade significante de trabalho de seguimento. Ver, por exemplo, Koss, L. G. (1989), The Papanicolaou Test for Cervical Cancer Detection: A Triumph and a Tragedy, JAMA 261: 737-743; ver também DeMay, "Problems in Pap Smear Interpretation", Arch. Pathol. Lab. Med. 121: 229-23
5 (1997).

Em vista do acima, existe uma necessidade quanto a métodos de diagnóstico molecular complementares para a análise de células que estão presentes em um meio líquido contendo um fixador. Tais métodos não são diretos, entretanto, porque não é sempre possível realizar tais métodos em
10 células fixas. Por exemplo, certos fixadores (por exemplo, aqueles meios de transporte utilizados nos sistemas de teste THINPREP® ou SUREPATH®) podem fazer com que as proteínas celulares particulares precipitem ou agreguem, tornando deste modo estas proteínas insolúveis e difíceis ou impossíveis de detectar confiavelmente usando meios convencionais, por
15 exemplo, usando um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) ou um outro teste imunológico.

Existe portanto uma necessidade enorme quanto a métodos e composições para extrair proteínas de células fixas em uma maneira que permita que elas sejam adequadas para o uso em ensaios moleculares, por
20 exemplo, imunológicos, de detecção. A invenção aqui descrita atinge esta necessidade e outras.

Literatura

A literatura de interesse inclui: Patentes U.S. 6.890.729, 6.337.189 e pedido de patente U.S. publicada 20050032105.

25 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os métodos para produzir um extrato de proteína de células, preferivelmente células fixas, são fornecidos. Em termos gerais, os métodos envolvem: aumentar o pH das células a um pH pelo menos em torno do pH 10,0 para produzir uma composição intermediária e depois, na presença de

um detergente não iônico, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteína. O método pode incluir: a) contatar as células com um reagente de extração para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e b) contatar a composição intermediária com um reagente de neutralização para neutralizar o pH da composição intermediária e produzir o extrato de proteína. Um ou ambos do reagente de extração e do reagente de neutralização contém o detergente não iônico. Em certas formas de realização, as células fixas podem ser células cervicais esfoliadas fixas.

10 DEFINIÇÕES

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como habitualmente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual esta invenção pertence. Ainda, certos elementos são definidos abaixo por causa de clareza e facilidade de referência.

O termo “amostra celular” como aqui usado diz respeito a uma composição líquida contendo uma ou mais células de interesse. Uma amostra celular pode ser uma amostra clínica contendo células removidas de (por exemplo, dissecadas ou esfoliada de) um indivíduo, incluindo mas não limitadas a, por exemplo, células de plasma, soro, fluido espinhal, sêmen, fluido linfóide, as seções externas da pele, tratos respiratório, intestinal e genitourinário, lágrimas, saliva, leite, células sangüíneas, tumores ou órgãos. Em outras formas de realização, a amostra celular pode conter células cultivadas *in vitro* (incluindo mas não limitadas às células em meio de cultura de célula, células viralmente infectadas, células recombinantes, etc.). Em certas formas de realização, a amostra celular pode conter células que estão em mais risco de serem infectadas pelo HPV. Nestas formas de realização, as células podem ser obtidas de um colo do útero, vulva, vagina, ânus, pênis, boca ou garganta. Em certas formas de realização, as células são de

membrana mucosa e podem ser epiteliais na origem. Uma amostra celular pode conter ou não contaminantes outros que não células esfoliadas ou dissecadas. Por exemplo, muco ou células bacterianas, de levedura ou sanguíneas podem estar presentes em uma amostra celular.

5 “HPV” é Papilomavírus humano, incluindo mas não limitado às cepas do HPV 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48, 50, 16, 18, 31, 35, 30, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 58, 33, 66, 68, 69, 26, 53, 73 e 82.

10 Uma “cepa do HPV oncogênica” é uma cepa do que é conhecida causar câncer cervical como determinado pelo National Cancer Institute (NCI, 2001).

15 Uma “proteína E6 oncogênica” é uma proteína E6 codificada por uma cepa do HPV oncogênica. As cepas oncogênicas exemplares são: HPV 26, HPV 53, HPV 66, HPV 73, HPV 82, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 35, HPV 30, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 59, HPV 58, HPV 33, HPV 66, HPV 68, HPV 69 e HPV 82. As seqüências de aminoácido de proteínas E6 oncogênicas são depositadas na base de dados do GenBank da NCBI. Embora não se deseje estar ligado pela teoria, acredita-se no geral que as cepas do HPV 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48 e 50 não sejam oncogênicas.

20 Os termos “polipeptídeo” e “proteína” são usados intercambiavelmente. O termo “polipeptídeo” inclui polipeptídeos em que a cadeia principal convencional foi substituída com cadeias principais que não ocorrem naturalmente ou sintéticas e peptídeos em que um ou mais dos aminoácidos convencionais foram substituídos com um ou mais aminoácidos 25 que não ocorrem naturalmente ou sintéticos.

O termo “proteína de fusão” ou equivalentes gramaticais deste faz alusão a um composto de proteína de uma pluralidade de componentes de polipeptídeo, que embora não ligado em seu estado nativo, são unidos pelos seus respectivos terminais amino e carboxila através de uma ligação de

peptídeo para formar um único polipeptídeo contínuo. As proteínas de fusão podem ser uma combinação de dois, três ou mesmo quatro ou mais proteínas diferentes. O termo polipeptídeo inclui proteínas de fusão, incluindo, mas não limitadas a, proteínas de fusão com uma seqüência de aminoácido heteróloga, fusões com seqüências líder heterólogas e homólogas, com ou sem resíduos de metionina de termina N; proteínas imunologicamente alvejadas; proteínas de fusão com parceiros de fusão detectáveis, por exemplo, proteínas de fusão incluindo como um parceiro de fusão uma proteína fluorescente, β -galactosidase, luciferase e outros.

No geral, os polipeptídeos podem ser de qualquer comprimento, por exemplo, maiores do que 2 aminoácidos, maiores do que 4 aminoácidos, maiores do que cerca de 10 aminoácidos, maiores do que cerca de 20 aminoácidos, maiores do que cerca de 50 aminoácidos, maiores do que cerca de 100 aminoácidos, maiores do que cerca de 300 aminoácidos, usualmente até cerca de 500 ou 1000 ou mais aminoácidos. “Peptídeos” são no geral maiores do que 2 aminoácidos, maiores do que 4 aminoácidos, maiores do que cerca de 10 aminoácidos, maiores do que cerca de 20 aminoácidos, usualmente até cerca de 50 aminoácidos. Em algumas formas de realização, os peptídeos estão entre 5 e 30 aminoácidos no comprimento. Os polipeptídeos podem ser naturais em que eles podem ser codificados pelo genoma de um organismo ou vírus ou não naturais em que eles não são de ocorrência natural.

O termo “agente de captura” refere-se a um agente que liga uma proteína através de uma interação que é suficiente para permitir que o agente se ligue e concentre a proteína de uma mistura homogênea de proteínas diferentes. Conseqüentemente, o termo “agente de captura” refere-se a uma molécula ou um complexo multi-molecular que pode especificamente ligar um analito, por exemplo, especificamente ligar um analito para o agente de captura, com uma constante de dissociação (K_D) de menos do que cerca de 10^{-7}

⁶ M sem ligar-se a outros alvos. A interação de ligação pode ser mediada por uma região de afinidade do agente de captura. Os agentes de captura representativos incluem anticorpos (incluindo fragmentos e miméticos destes) e proteínas contendo domínio PDZ, etc.

5 O termo “ligação específica” refere-se à capacidade de um agente de captura para preferencialmente ligar a uma proteína particular que está presente em uma mistura homogênea de proteínas diferentes. Em certas formas de realização, uma interação de ligação específica discriminará entre uma proteína particular e outras proteínas em uma amostra, em algumas 10 formas de realização mais do que cerca de 10 a 100 vezes ou mais (por exemplo, mais do que cerca de 1000 ou 10.000 vezes).

O termo “complexo de agente de captura/proteína” é um complexo que resulta da ligação específica de um agente de captura com uma 15 proteína, isto é, um “par de parceiro de ligação”. Um agente de captura e uma proteína para o agente de captura especificamente ligam-se entre si sob “condições adequadas para a ligação específica”, onde tais condições são aquelas condições (em termos de concentração salina, pH, detergente, concentração de proteína, temperatura, etc.) que permite que a ligação ocorra entre agentes de captura e proteínas para que se liguem em solução. Tais 20 condições, particularmente com respeito aos anticorpos e seus抗ígenos, são bem conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Harlow e Lane (*Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Em certas formas de realização, a afinidade entre um agente de captura e proteína que são especificamente ligados em um complexo de 25 agente de captura/proteína é caracterizado por um KD (constante de dissociação) de menos do que 10^{-6} M, menos do que 10^{-7} M, menos do que 10^{-8} M, menos do que 10^{-9} M ou menos do que cerca de 10^{-10} M.

“Parceiros de ligação” e equivalentes referem-se aos pares de moléculas que podem ser encontrados em um complexo de agente de

captura/analito, isto é, exibem ligação específica entre si.

Os termos “anticorpo” e “imunoglobulina” são usados intercambiavelmente aqui para se referir a um agente de captura que tem pelo menos um domínio de ligação de epítopo de um anticorpo. Estes termos são bem entendidos por aqueles no campo e referem-se a uma proteína contendo um ou mais polipeptídeos que especificamente liga um antígeno. Uma forma de anticorpo constitui a unidade estrutural básica de um anticorpo. Esta forma é um tetrâmero e consiste de dois pares idênticos de cadeias de anticorpo, cada par tendo uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Em cada par, as regiões variáveis de cadeia leve e pesada são juntas responsáveis pela ligação a um antígeno e as regiões constantes são responsáveis pelas funções efetoras de anticorpo.

Os polipeptídeos de imunoglobulina reconhecidos incluem as cadeias leves capa e lambda e as cadeias pesadas alfa, gama (IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4), delta, epsilon e mu ou equivalentes em outras espécies. As “cadeias leves” de imunoglobulina de tamanho natural (de cerca de 25 kDa ou cerca de 214 aminoácidos) compreendem uma região variável de cerca de 110 aminoácidos no término NH_2 e uma região constante capa ou lambda no terminal COON. As “cadeias pesadas” de imunoglobulina de tamanho natural (de cerca de 50 kDa ou cerca de 446 aminoácidos), similarmente compreendem uma região variável (de cerca de 116 aminoácidos) e uma das regiões constantes de cadeia pesada anteriormente mencionadas, por exemplo, gama (de cerca de 330 aminoácidos).

Os termos “anticorpos” e “imunoglobulina” incluem anticorpos ou imunoglobulinas de qualquer isótipo, fragmentos de anticorpos que retêm a ligação específica ao antígeno, incluindo, mas não limitados aos fragmentos Fab, Fv, scFv e Fd, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia única e proteínas de fusão que compreendem uma porção de ligação de antígeno de uma proteína de

anticorpo e uma que não de anticorpo. Os anticorpos podem ser detectavelmente rotulados, por exemplo, com um radioisótopo, uma enzima que gera um produto detectável, uma proteína fluorescente e outros. Os anticorpos podem ser ainda conjugados a outras porções, tais como membros de pares de ligação específica, por exemplo, biotina (membro de par de ligação específica biotina-avidina) e outros. Os anticorpos também podem estar ligados a um suporte sólido, incluindo, mas não limitados a, placas ou pérolas de poliestireno e outros. Também abrangidos pelos termos são Fab', Fv, F(ab')₂ e ou outros fragmentos de anticorpo que retêm a ligação específica ao antígeno.

Anticorpos podem existir em uma variedade de outras formas incluindo, por exemplo, Fv, Fab e (Fab)₂, assim como anticorpos híbridos bifuncionais (isto é, bi-específicos) (por exemplo, Lanzavecchia *et al.*, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) e em cadeias únicas (por exemplo, Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) e Bird *et al.*, Science, 242, 423-426 (1988), que são aqui incorporadas por referência). (Ver, no geral, Hood *et al.*, "Immunology", Benjamin, N.Y., 2^a ed. (1984) e Hunkapiller e Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)). Os anticorpos monoclonais e anticorpos de "demonstração de fago" são bem conhecidos na técnica e abrangidos pelo termo "anticorpos".

O termo "avaliar" inclui qualquer forma de medição e inclui determinar se um elemento está presente ou não. Os termos "determinar", "medir", "avaliação", "avaliar" e "ensaiar" são usados intercambiavelmente e podem incluir determinações quantitativas e/ou qualitativas. A avaliação pode ser relativa ou absoluta. "Avaliar a presença de inclui determinar a quantidade de alguma coisa presente, e/ou determinar se a mesma está presente ou ausente.

Por "localização remota" é intencionado uma localização outra que não a localização em que as células são obtidas e depositadas em um

líquido contendo fixador. Por exemplo, uma localização remota pode ser uma sala diferente no mesmo edifício em que as células são obtidas (por exemplo, um outro laboratório), um edifício diferente no mesmo complexo de edifício como as células são obtidas ou uma localização diferente na mesma cidade, 5 estado ou país, etc. Quando uma amostra celular é indicada como sendo “recebida” de uma localização remota, a amostra celular pode ser obtida da localização remota ou entregue pessoalmente, enviada pelo correio ou mensageiro da localização remota, por exemplo.

“Comunicar” informação refere-se a qualquer meio de obter 10 esta informação de uma localização para a seguinte, seja por material impresso fisicamente transportado ou meio legível por computador contendo a informação (por exemplo, pelo correio) ou pela transmissão da informação. Se a informação é transmitida, um sinal digital ou analógico representando a informação (por exemplo, um sinal eletromagnético tal como um sinal de luz 15 ou elétrico) é transmitida em um canal de comunicação adequado (por exemplo, uma rede privada, pública ou sem fio). Quaisquer meios convenientes podem ser utilizados para transmitir os dados, por exemplo, fac-símile, modem, internet, e-mail, etc.

Como aqui usado, o termo “meio de transporte” é usado para 20 descrever líquidos adequados para a coleta de células e a preservação destas células em um maneira que permita que elas estejam adequadas para estudos citológicos com base em líquido. Os meios de transporte são habitualmente utilizados no teste Pap. As células depositadas no meio de transporte podem ser transportadas ou não de uma localização a uma outra neste meio. Os meios 25 de transporte contêm fixador. A deposição de células em um meio de transporte fixa as células para produzir células fixas. Os meios de transporte representativos incluem os meios de transporte SUREPATH® ou PRESERVCYT®.

Uma “célula fixa” é uma célula que foi tratada com e

citologicamente preservada por um fixador químico. As células fixas são usualmente adequadas para tingimento e análise morfológica e/ou citológica subsequentes pela microscopia ótica.

INCORPORAÇÃO POR REFERÊNCIA

5 Todas as publicações e pedidos de patente mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência no mesmo grau como se cada publicação ou pedido de patente individuais fosse específica e individualmente indicados como sendo incorporados por referência.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 Embora as formas de realização preferidas da presente invenção tenham sido mostradas e aqui descritas, estará óbvio àqueles habilitados na técnica que tais formas de realização são fornecidas apenas por via de exemplo. Numerosas variações, mudanças e substituições ocorrerão agora àqueles habilitados na técnica sem divergir da invenção. Deve ser entendido que várias alternativas para as formas de realização da invenção aqui descritas podem ser utilizadas na prática da invenção. É intencionado que as seguintes reivindicações definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam por meio desta abrangidos.

15

20 Os métodos para produzir um extrato de proteína a partir de células fixas são fornecidos. Em termos gerais, os métodos envolvem: aumentar o pH das células fixas a um pH pelo menos em torno do pH 10,0 para produzir uma composição intermediária e depois, na presença de um detergente não iônico, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteína. O método pode incluir: a) contatar as células fixas com um reagente de extração para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e b) contatar a composição intermediária com um reagente de neutralização para neutralizar o pH da composição intermediária e produzir o extrato de proteína. Um ou

25

ambos do reagente de extração e do reagente de neutralização contêm o detergente não iônico. Em certas formas de realização, as células fixas podem ser células cervicais esfoliadas fixas. Kits e composições para praticar os métodos objetos são também fornecidos. Os métodos objetos encontram uso 5 em uma variedade de aplicações diferentes, incluindo testes de diagnóstico que detectam proteínas particulares no extrato de proteína resultante.

Antes que a invenção objeto seja descrita mais adiante, deve ser entendido que a invenção não é limitada às formas de realização particulares da invenção descritas abaixo, visto que variações das formas de 10 realização particulares podem ser feitas e ainda caem dentro do escopo das reivindicações anexas. Também deve ser entendido que a terminologia utilizada é com o propósito de descrever formas de realização particulares e não é intencionada a ser limitante. Ao invés, o escopo da presente invenção será estabelecido pelas reivindicações anexas.

15 Neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um,” “uma” e “o”, “a” incluem referências plurais a menos que o contexto claramente dite de outro modo.

Onde uma faixa de valores é fornecida, é entendido que cada valor interposto, até o décimo da unidade do limite inferior a menos o 20 contexto claramente dite de outro modo, entre o limite superior e inferior desta faixa e qualquer outro valor estabelecido ou interposto em que a faixa estabelecida, é abrangida dentro da invenção. Os limites superiores e inferiores destas faixas menores podem ser independentemente incluídos nas faixas menores e também estão abrangidos dentro da invenção, sujeitos a 25 qualquer limite especificamente excluído na faixa estabelecida. Onde a faixa estabelecida inclui um ou ambos dos limites, faixas excluindo cada um ou ambos daqueles limites incluídos também estão incluídos na invenção.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como habitualmente

entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos, dispositivos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste da invenção, os métodos, dispositivos e materiais preferidos são agora descritos.

5 Todas as publicações aqui mencionadas são aqui incorporadas por referência para o propósito de descrever e divulgar componentes que estão descrito nas publicações que seriam usadas em conexão com a invenção presentemente descrita.

10 Como resumido acima, a invenção objeto fornece métodos e composições para produzir um extrato de proteína a partir de células fixas. Na descrição da invenção em maiores detalhes, os métodos são descritos primeiro seguidos por uma descrição dos kits e sistemas para o uso na práticas dos métodos objetos.

15 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Como mencionado acima, a invenção fornece um método para produzir um extrato de proteína a partir de células fixas. No geral, os métodos envolvem duas etapas: a) contatar as células fixas com um reagente de extração tendo um pH que seja maior do que em torno do pH 10,0 para produzir uma composição intermediária e b) contatar a composição intermediária com um reagente de neutralização. O reagente de extração e/ou o reagente de neutralização contém um detergente não iônico. O extrato de proteína resultante contém um detergente não iônico e tem um pH que é neutro (isto é, entre cerca do pH 7,0 e cerca do pH 8,0). Os métodos no geral produzem um extrato de proteína contendo proteínas que são facilmente detectáveis usando agentes de captura para estas proteínas. Como tal, um extrato de proteína produzido pelos presentes métodos é no geral adequado para o uso em ensaios de ligação, por exemplo, ensaios imunológicos, para a detecção destas proteínas.

Em certas formas de realização os métodos podem incluir:
aumentar o pH das células fixas a um pH pelo menos em torno do pH 10,0 para produzir uma composição intermediária e depois, na presença de um detergente não iônico, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteína. Visto que, como mencionado acima, o detergente não iônico pode estar presente no reagente de extração ou no reagente de neutralização (ou tanto no reagente de extração quanto no reagente de neutralização), certas formas de realização dos presentes métodos incluem: a) contatar células fixas com um reagente de extração para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e b) contatar a composição intermediária com um reagente de neutralização que compreenda um detergente não iônico; para neutralizar o dito pH da composição intermediária e produzir o extrato de proteína. Em outras formas de realização, o método pode incluir: a) contatar as células fixas com um reagente de extração que compreenda um detergente não iônico para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e, b) contatar a composição intermediária com um reagente de neutralização; para neutralizar o pH da composição intermediária e produzir o extrato de proteína.

Em certas formas de realização, o extrato de proteína produzido pelos presentes métodos pode conter mais proteína que seja acessível aos agentes de captura do que um extrato de proteína fabricado usando outros métodos, por exemplo, métodos que não utilizam: uma etapa de extração de pH alto (isto é, uma etapa que aumenta o pH a mais do que em torno do pH 10,0 ou pH 11,0), uma etapa de neutralização (isto é, uma etapa que aumente o pH até em torno do pH 7,0 até em torno do pH 8,0) e um detergente não iônico. Nem o pH alto sozinho nem o detergente não iônico sozinho produzem um tal extrato de proteína. Em formas de realização particulares, o reagente de extração de pH alto solubiliza proteínas nas células

fixas, ao passo que o detergente não iônico impede as proteínas solubilizadas na composição intermediária de re-agregar ou precipitar conforme o pH da composição intermediária é neutralizado.

Os reagentes utilizados nos presentes métodos e o extrato de 5 proteína produzido pelos presentes métodos são descritos em maiores detalhes abaixo, como é uma descrição de como os reagentes podem ser usados para produzir o extrato de proteína. Como será debatido abaixo, a concentração e pH ideais dos reagentes usados nos presentes métodos podem variar dependendo de quais reagentes são usados. Entretanto, a concentração e pH 10 ideais dos reagentes são facilmente determinados, experimental ou empiricamente.

As células a partir das quais a proteína é extraída usando-se o método da invenção

A metodologia de acordo com a presente invenção pode ser 15 usada para extrair uma proteína alvo ou proteína de interesse de uma amostra de células. A amostra de células pode ser uma população homogênea de células ou uma mistura heterogênea de células de tipo diferente. A amostra de célula também pode conter “contaminantes” tais como muco, células sangüíneas e células inflamatórias que não são de interesse para o propósito 20 de extração da proteína alvo ou não contém a proteína alvo.

Em algumas formas de realização, a proteína alvo é uma proteína viral presente em células infectadas com um vírus, preferivelmente um vírus patológico e as células são preferivelmente aquelas isoladas de um mamífero, por exemplo, um ser humano.

O vírus patogênico pode ser qualquer vírus patogênico que 25 causa efeitos patogênicos ou doença em seres humanos ou outros animais. O vírus patogênico pode ser de várias cepas do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tais como HIV-1 e HIV-2. A proteína viral pode ser uma glicoproteína do HIV (ou antígeno de superfície) tal como HIV GP120 e

GP41 ou uma proteína capsídica (ou proteína estrutural) tal como a proteína P24 do HIV.

O vírus patogênico pode ser o vírus Ebola ou Marburg. A proteína viral pode ser uma glicoproteína do Ebola ou antígeno de superfície 5 tal como as proteínas GP1 ou GP2 do Ebola.

O vírus patogênico pode ser o vírus da hepatite tal como os vírus hepatite A, B, C, D ou E. Por exemplo, a proteína viral pode ser um antígeno de superfície ou proteína de núcleo do vírus B da hepatite tal como o antígeno de superfície da hepatite B pequeno (SHBsAg) (também aludido 10 como o antígeno australiano), o antígeno de superfície da hepatite B médio (MHBsAg) e o antígeno de superfície da hepatite B grande (LHBsAg). O antígeno viral pode ser um antígeno de superfície ou proteína de núcleo do vírus da hepatite C tal como os抗ígenos NS3, NS4 e NS5.

O vírus patogênico pode ser um vírus sincicial respiratório 15 (RSV). Por exemplo, a proteína viral do RSV pode ser a glicoproteína (proteína G) ou a proteína de fusão (proteína F) de RSV.

O vírus patogênico pode ser um vírus simplex do herpes (HSV) tal como HSV-1 e HSV-2. Por exemplo, o antígeno viral do HSV pode ser a glicoproteína D de HSV-2.

A proteína alvo pode ser um antígeno de tumor, tal como Her2 20 de células do câncer mamário e CD20 em células de linfoma, um oncogene viral tal como E6 e E7 do vírus do papiloma humano ou um oncogene celular tal como ras mutado.

Em algumas formas de realização, a amostra de células contêm 25 células fixas em que a proteína alvo está presente. As células fixas utilizadas nos presentes métodos são no geral obtidas depositando-se uma amostra de células (obtidas removendo-se as células de um paciente pela dissecação, esfoliação ou lavagem, por exemplo) em um meio líquido. A amostra de células pode ser depositada em um meio líquido que já contenha um fixador

químico ou um fixador químico pode ser adicionado ao meio líquido depois que as células tenham sido colocadas no meio. Um meio líquido contendo um fixador e as células fixas é aqui chamado uma “amostra celular”.

Os fixadores químicos representativos que podem ser utilizados nos presentes métodos incluem: álcoois (por exemplo, metanol ou etanol), aldeídos (por exemplo, glutaraldeído ou formaldeído) e cetonas (por exemplo, acetona), assim como tetróxido de ósmio, ácido acético, ácido pírico e sais iônicos de metal pesado. Outros exemplos de fixadores que podem ser utilizados nos presentes métodos incluem fixadores com base em bissulfito (que também podem incluir ácido acético), fixadores com base em PVP (que também podem conter propileno glicol e metanol) assim como aqueles descritos na Patente U.S. 3.546.334, 4.578.282, 4.857.300, 5.104.640, 5.256.571, 5.432.056 e 5.196.182. Os exemplos de fixadores que podem ser utilizados nos presentes métodos, incluindo as concentrações de trabalho destes fixadores, podem ser encontrados em Baker, (Principles of Biological Microtechnique: A Study of Fixation and Dyeing, 1959) e Williams (“Tissue preparation for immunocytochemistry.” J Clin. Pathol. 1997 50: 422).

De interesse particular nos presentes métodos são os meios líquidos que são chamados de “meio de transporte” e rotineiramente usados para a coleta, preservação (isto é, fixação) e transporte de células cervicovaginais (por exemplo, células cervicais esfoliadas) como parte de uma exame ginecológica. Os meios de transporte aprovados pelo FDA são de interesse particular.

Os exemplos de meio de transporte comercialmente disponíveis que podem ser utilizados incluem: meio de transporte PRESERVCYT® com base em metanol (que é vendido como parte do kit de amostragem ginecológica THINPREP® da Cytac, Inc., Marlborough, Mass.), meio de transporte SUREPATH® com base em etanol formalmente conhecido como CYTORICH® (TriPath, Inc. Burlington, N.C.) e meio de transporte

CYTOLYT® com base em metanol (Cytac, Inc., Marlborough, Mass.) por exemplo.

As células podem ser obtidas por qualquer método conveniente, incluindo mas não limitado à esfoliação (por exemplo, raspagem), dissecação e lavagem. De interesse particular são as células epiteliais de origem cervical, células estas que são tipicamente obtidas pelos métodos de esfoliação usando uma escova, espátula ou raspador adaptados e depositadas em um meio líquido contendo fixador.

Reagente de extração

O reagente de extração utilizado nos presentes métodos contém componentes que estão presentes em quantidades suficientes em concentração para produzir um extrato de proteína tendo um pH que seja pelo menos o pH 10,0, na adição do reagente de extração às células fixas. Conseqüentemente, o reagente de extração no geral tem um pH pelo menos 15 em torno do pH 10,0.

O reagente de extração é contatado com as células fixas para produzir a composição intermediária. O pH do reagente de extração e a composição intermediária resultante está no geral pelo menos em torno do pH 10,0, por exemplo, na faixa em torno do pH 10,0 até em torno do pH 13,0 ou 20 em torno do pH 11,0 até em torno do pH 12,0. Em certas formas de realização, o reagente de extração pode ter um pH em torno do pH 10,0 até em torno do pH 10,5, pH 10,5 até em torno do pH 11,0, pH 11,0 até em torno do pH 11,5, pH 11,5 até em torno do pH 12,0, pH 12,0 até em torno do pH 12,5 ou pH 12,5 até em torno do pH 13,0. O reagente de extração pode ser 25 fabricado usando qualquer fonte adequada de íons hidróxido, por exemplo, hidróxido de sódio ou potássio ou carbonato de cálcio, por exemplo.

Em certas formas de realização, o reagente de extração pode não conter nenhuma quantidade significante de desnaturante. Entretanto, em outras formas de realização, além de ter um pH de pelo menos 10,0, o

reagente de extração também pode conter um desnaturante, por exemplo, um detergente iônico tal como dodecil sulfato de sódio (SDS) ou *sarkosyl* ou um agente caotrópico tal como uréia. Nestas formas de realização, o desnaturante, se presente, pode estar presente em uma concentração que não diminui 5 significantemente diminui a sensibilidade de ensaios futuros. A concentração de desnaturante, em certas formas de realização, pode ser diminuída durante o processamento da amostra, por exemplo, diluindo-se o desnaturante usando tampão de neutralização ou pela adição de um diluente, por exemplo, tampão ou água ao extrato de proteína antes do uso.

10 Dependendo da concentração do desnaturante usado e do pH do tampão de extração, o desnaturante pode estar presente no tampão de extração a uma concentração de cerca de 0,01 M a cerca de 0,05 M, de cerca de 0,05 M a cerca de 0,1 M, de 0,1 M a cerca de 0,2 M, de cerca de 0,2 M a cerca de 0,5 M, de cerca de 0,5 M a cerca de 1,0 M, de cerca de 1,0 M a cerca 15 de 2,0 M, de cerca de 2,0 M a cerca de 4,0 M ou de cerca de 4,0 M a cerca de 8,0 M. O desnaturante, se presente no reagente de extração, pode estar presente em uma concentração que esteja bem abaixo da concentração de desnaturante tipicamente utilizada para desnaturar proteína. Em outras palavras, o reagente de extração pode conter desnaturante a uma concentração 20 que permita a detecção de uma proteína usando um agente de captura para esta proteína, depois produzindo um extrato de proteína de acordo com os métodos objetos. A concentração de desnaturante utilizada é no geral suficiente para produzir um extrato de proteína contendo proteínas que são facilmente detectáveis em um ensaio de ligação que utilize um agente de 25 captura, por exemplo, em um ensaio de detecção de anticorpo.

Os desnaturantes exemplares e as suas concentrações em um reagente de extração objeto: dodecil sulfato de sódio (SDS): de cerca de 0,01 % a cerca de 2 %, por exemplo, 0,05 %, *sarkosyl*: de cerca de 0,01 % a cerca de 5 %, por exemplo, 0,5 %, guanidina: de cerca de 0,1 M a cerca de 6 M, por

exemplo, cerca de 0,5 M e uréia: de cerca de 0,1 M a cerca de 8 M, por exemplo, cerca de 0,5 M, peso/vol.)

SDS é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 0,1 % a 0,5 %, *sarkosyl* é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 2 % p/v, a uréia é tipicamente utilizada para desnaturar proteínas em uma concentração de 2 M a 8 M, o cloridreto de guanidina é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 3 M a 8 M, o cloreto de N-cetil trimetilamônio é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 5 % p/v e N-octilglicosídeo é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 2 %, p/v (Ver Protein purification Handbook, Amersham Pharmacia Biotech, p. 71 (1999)).

Se nenhum desnaturante está presente em um reagente de extração, o reagente pode ter um pH pelo menos em torno do pH 11,0. Se o reagente de extração contém detergente, então o pH do reagente de extração pode ter um pH pelo menos em torno do pH 10,0.

Como será descrito em maiores detalhes abaixo, o reagente de extração, em certas formas de realização, também pode conter um detergente não iônico.

Em certas formas de realização, o reagente de extração pode conter um tampão para manter o reagente em um pH desejado. Se um tampão está presente em um reagente de extração objeto, o tampão pode ter um pK_a na faixa de cerca de 9,0 a cerca de 12,5 a 25° C. os tampões exemplares que podem ser utilizados em um reagente de extração de proteína objeto incluem CABS, piperidina, fosfato, CAPS, glicina ou etanolamina, por exemplo. Tampões que têm pouca ou nenhuma capacidade de tamponamento em um pH acima pH de cerca de 10,0 (por exemplo, tris, tricina, hepes, etc.) no geral não são utilizados para tamponar o pH do reagente de extração, mas não obstante pode estar presente em um reagente de extração.

O reagente de extrato de proteína objeto pode conter outros componentes por exemplo, queladores de íon salino, inibidores de protease, etc., além dos componentes declarados acima.

O reagente de extração de proteína pode ser uma composição líquida ou sólida e, em certas formas de realização, pode conter uma combinação de desnaturantes diferentes.

Os desnaturantes que podem ser utilizados no presente tampão de extração são no geral desnaturantes fortes e incluem mas não são limitados a: agentes caotrópicos (por exemplo, uréia, cloridreto de guanidina ou um sal de tiocianato tal como tiocianato de sódio ou tiocianato de guanidínio, iodeto de sódio, perclorato de sódio e outros; ver K. Hamaguchi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 62: 1129-1136, 1962) e detergentes iônicos (por exemplo, dodecil sulfato de sódio (SDS), *sarkosyl* ou cloreto de N-cetil trimetilamônio), incluindo detergentes catiônicos, aniônicos e zwitteriônicos (tais como CHAPS ou CHAPSO). Outros desnaturantes que podem ser utilizados nos presentes métodos são listados nas colunas 7 e 8 da patente U.S. 6.488.671, patente esta que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Em certas formas de realização, um desnaturante fraco tal como LiCl, LiClO₄, LiBr, CaCl₂ ou NaCl não é utilizado como um desnaturante no tampão de extração, embora um tal composto possa estar presente em um tampão de extração ou extrato de proteína além de um desnaturante listado no parágrafo anterior.

Como mencionado acima, o reagente de extração é contatado com (por exemplo, combinado ou misturado com) células fixas. Em certas formas de realização, uma amostra celular contendo as células fixas (por exemplo, um meio de transporte contendo células fixas) pode ser diretamente adicionado ao reagente de extração. Em outras formas de realização, as células fixas podem ser isoladas da amostra celular (por exemplo, por métodos de sedimentação, centrifugação, filtração ou afinidade), antes da sua

adição ao reagente de extração de proteína. As células podem ser lavadas ou contatadas com outros reagentes antes da sua adição ao reagente de extração.

Todas ou uma porção das células fixas disponíveis podem ser combinadas com o reagente de extração. Por exemplo, em certas formas de realização, uma porção das células fixas pode ser utilizada em teste de citologia e uma porção das células fixas pode ser contatada com o reagente de extração para produzir a composição intermediária. As células fixas e o reagente de extração podem ser combinados e mantidos sob temperatura adequada (por exemplo, em gelo, em torno da temperatura ambiente ou a cerca de 37° C) e por um tempo adequado (por exemplo, de 10 segundos a 24 horas) para produzir a composição intermediária. Em certas formas de realização, o reagente de neutralização é contatado com a composição intermediária imediatamente depois das células fixas terem sido contatadas com o reagente de extração.

15 *Reagente de neutralização*

O reagente de neutralização utilizado nos presentes métodos tem um pH que é suficiente para neutralizar o pH da composição intermediária debatida acima, no contato com a composição intermediária. Em outras palavras, o reagente de neutralização contém um detergente não iônico e tem um pH que é suficiente para neutralizar o pH da composição intermediária debatida acima quando o reagente de neutralização é misturado com a composição intermediária. Como será descrito em maiores detalhes abaixo, o reagente de neutralização, em certas formas de realização, pode conter um detergente não iônico.

25 O pH do reagente de neutralização é suficiente para neutralizar a composição intermediária fabricada contatando-se células fixas com um reagente de extração objeto. Dependendo do pH do reagente de extração e se tampões são utilizados, o pH do reagente de neutralização pode estar entre o pH 4,0 a pH 8,0. Em certas formas de realização, o reagente de neutralização

pode ter um pH em torno do pH 4,0 até em torno do pH 4,5, pH 4,5 até em torno do pH 5,0, pH 5,0 até em torno do pH 5,5, pH 5,5 até em torno do pH 6,0, pH 6,0 até em torno do pH 6,5, pH 6,5 até em torno do pH 7,0 ou pH 7,0 até em torno do pH 7,5. O reagente de neutralização pode ser fabricado 5 usando qualquer fonte adequada de íons hidrogênio, por exemplo, ácido clorídrico ou ácido acético, por exemplo. Em certas formas de realização, o reagente de neutralização pode ter um pH menor do que o pH 4,0.

O reagente de neutralização pode ser tamponado ou não tamponado. Se o reagente de neutralização é tamponado, então o reagente de 10 neutralização pode ser tamponado usando qualquer tampão tendo um pK_a de cerca de 6 a cerca de 8, por exemplo, tris, hepes ou tricina, por exemplo.

Como mencionado acima, o reagente de extração e/ou o reagente de neutralização podem conter um detergente não iônico.

Em certas formas de realização, o detergente não iônico 15 utilizado pode ser nonidet P-40, n-octilglicosídeo, um detergente TRITON® tal como TRITON® X-100, octil β -tioglicopiranosídeo, um detergente TWEEN® tal como TWEEN-20 ou NP-40). Dependendo da concentração do detergente usado, o detergente pode estar presente no tampão de extração ou no tampão de neutralização a uma concentração de cerca de 0,01 M a cerca de 20 0,05 M, de cerca de 0,05 M a cerca de 0,1 M, de 0,1 M a cerca de 0,2 M, de cerca de 0,2 M a cerca de 0,5 M, de cerca de 0,5 M a cerca de 1,0 M, de cerca de 1,0 M a cerca de 2,0 M, de cerca de 2,0 M a cerca de 4,0 M ou de cerca de 4,0 M a cerca de 8,0 M. Outros detergentes que podem ser utilizados nos presentes métodos são listados nas colunas 7 e 8 da patente U.S. 6.488.671, 25 patente esta que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Em certas formas de realização, o detergente pode estar presente tanto no tampão de extração quanto no de neutralização.

Os detergentes exemplares e as suas concentrações em um reagente de neutralizar e/ou extração incluem: Triton X-100: de cerca de 0,1

% a cerca de 10 %, por exemplo, cerca de 1 %, NP40: de cerca de 0,1 % a cerca de 10 %, por exemplo, cerca de 1 % e Tween-20: de cerca de 0,1 % a cerca de 10 %, por exemplo, cerca de 1 %, peso/vol.

Como mencionado acima, o reagente de neutralização é contatado com (por exemplo, combinado ou misturado com) a composição intermediária para produzir um extrato de proteína tendo um pH neutro (isto é, um pH na faixa em torno do pH 6,5 até em torno do pH 8,0, por exemplo, na faixa em torno do pH 7,0 e em torno do pH 7,8). O extrato de proteína contém ainda proteína de células fixas, um detergente não iônico em uma concentração listada acima e em certas formas de realização, um tampão para manter o extrato de proteína em uma faixa de pH particular. Se um desnaturante é adicionado às células fixas, o extrato de proteína pode conter ainda este desnaturante. O pH, a escolha de detergente e a concentração do detergente utilizado (e, se um desnaturante é utilizado, a identidade e a concentração do desnaturante) são suficientes para permitir que o extrato de proteína seja diretamente utilizado em um ensaio de ligação para detectar proteínas presentes no extrato de proteína.

A neutralização do extrato de célula também pode ser realizada passando-se o extrato através de um filtro ou ponta de filtro que estejam impregnados com reagente de neutralização. Conforme o extrato passa através do material filtrante, o reagente de neutralização é solubilizado e o pH do extrato aproxima-se da neutralidade.

Um método alternativo para neutralizar o extrato de célula é passar o extrato através de uma coluna BioSpin (BioRad) pré-equilibrada com uma solução no pH neutro. O extrato também pode ser colocado em uma seringa ou aparelho similar que contenha gel (ou material de filtração) contendo neutralizador e liberado da seringa pela pressão positiva.

Em certas formas de realização, o extrato de proteína objeto contém proteína E6 do HPV solubilizada (particularmente proteína E6 de

cepas oncogênicas de HPV) que seja acessível e facilmente detectável por um agente de captura sem tratamento adicional do extrato de proteína (por exemplo, sem outra adição de desnaturante, mudanças de pH ou aquecimento). O extrato de proteína também pode conter membranas solubilizadas ou insolúveis, proteínas outras que não proteína E6 do HPV e outros conteúdos celulares tais como DNA, RNA, carboidratos, etc. Outros contaminantes tais como aqueles derivados da contaminação mucal da amostra celular original também podem estar presentes. Os componentes do extrato de proteína no geral não contém células integrais (isto é, citologicamente intactas).

O extrato de proteína pode ser usado imediatamente ou armazenado, por exemplo, na forma congelada, antes do uso.

Em formas de realização particulares, os extratos de proteína produzidos pelos métodos apresentados acima podem ser utilizados em métodos de detecção de proteína, métodos estes que são descritos em maiores detalhes abaixo.

Como estaria evidente a partir do acima, uma variedade de concentrações de desnaturantes, detergentes, tampões, pHs e componentes diferentes pode ser utilizada nos reagentes descritos acima. A concentração de 20 desnaturante, detergente, tampão ou pH ou componente em qualquer reagente é facilmente determinada usando métodos de rotina.

Depois da neutralização do extrato de célula, a proteína E6 pode ser concentrada a partir do extrato de célula pela incubação com o extrato com as partículas contendo aglutinante para a E6. O aglutinante pode 25 compreender PDZ, Proteína Associada com E6 (E6AP) ou fragmentos destes ou Proteína de Ligação de E6 (E6BP) ou fragmentos desta. Depois que E6 é capturada pelas partículas, as partículas são lavadas e E6 é então liberado das partículas pela incubação com tampão em pHs maiores do que 10. As partículas são separadas da solução de eluição e a solução remanescente é

depois neutralizada pelos procedimentos anteriormente descritos. Alternativamente, a proteína E6 pode ser detectada sem a liberação das partículas de captura.

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE PROTEÍNA

5 O extrato de proteína fabricado pelos métodos debatidos acima pode ser utilizado direta ou indiretamente (isto é, depois da adição de reagentes adicionais) em um método em que a presença de uma ou mais proteínas no extrato de proteína é avaliada. Os métodos de detecção de proteína no geral envolvem um agente de captura que especificamente se liga 10 a uma proteína. A identidade das proteínas a serem detectadas pode ser de identidade conhecida (isto é, pré-determinada) ou desconhecida no momento de executar o método.

15 As proteínas que podem ser detectadas usando os métodos de detecção de proteína objetos incluem proteínas que são marcadores de diagnóstico para uma doença ou condição, por exemplo, câncer, doença inflamatórias ou infecção por vírus, bactérias ou fungos, por exemplo. Em certas formas de realização, uma proteína detectada usando os métodos objetos não é rotineiramente detectável a menos que os métodos de extração 20 de proteína objetos sejam utilizados.

25 As proteínas exemplares que podem ser detectadas usando os métodos presentes incluem proteínas que são codificadas por um agente infeccioso, tal como vírus do papiloma humano (HPV). Em formas de realização particulares, os métodos presentes podem ser utilizados para detectar a proteína E6 do HPV, uma proteína que tem se mostrado difícil ou impossível de se detectar em extratos de proteína fabricados a partir de células fixas por outros métodos.

Em termos gerais, os métodos de detecção de proteína são muito bem conhecidos na técnica e incluem ensaios de ligação, isto é, ensaios em que a ligação entre uma proteína e um agente de captura para a proteína é

detectada. Tais ensaios incluem imunoensaios, isto é, ensaios de ligação que utilizam um anticorpo que especificamente se liga a uma proteína, incluindo, mas não limitados a, sistemas de ensaio competitivos e não competitivos usando técnicas tais como western blots, radioimunoensaios, ELISA (ensaio 5 imunoabsorvente ligado a enzima), imunoensaios “sanduíche”, ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina, reações de precipitina de difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunorradiométrico, imunoensaios fluorescentes, e imunoensaios de proteína A, para mencionar alguns. Tais ensaios são rotina e 10 bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade). Os imunoensaios exemplares são resumidamente descritos abaixo.

Os protocolos de imunoprecipitação no geral envolvem 15 produzir um extrato de proteína, adicionar um agente de captura, por exemplo, um anticorpo, ao extrato de proteína e incubar o extrato de proteína e o agente de captura por um período adequado de tempo e temperatura. O agente de captura é depois ligado a um suporte sólido, por exemplo, um substrato de afinidade tal como pérolas ligadas à proteína A e/ou proteína G e 20 a mistura é incubada e lavada. O suporte sólido é recolocado em suspensão em tampão de amostra e a proteína de interesse pode ser detectada pela western blotting, por exemplo.

ELISAs podem envolver preparar um extrato de proteína, ligar 25 o extrato de proteína a um suporte sólido (por exemplo, um reservatório de uma placa microtituladora de reservatórios múltiplos), contatar o extrato de proteína ligado ao suporte com um agente de captura, por exemplo, um anticorpo e detectar a ligação entre o agente de captura e a proteína. Em certos métodos de ELISA, o agente de captura pode ser detectavelmente rotulado com uma porção detectável tal como um substrato enzimático (por

exemplo, râbano peroxidase ou fosfatase alcalina) antes de contatar o agente de captura com o extrato de proteína ligado ao suporte. Em outras formas de realização, entretanto, a ligação do agente de captura ao extrato de proteína pode ser detectada por um segundo agente de captura detectavelmente (por exemplo, um segundo anticorpo) que se ligue ao agente de captura contatado com o extrato de proteína.

Em outros ensaios ELISA, o agente de captura pode ser ligado a um suporte sólido e o extrato de proteína é contatado com o agente de captura ligado ao suporte sólido. A ligação de uma proteína no extrato de proteína ao anticorpo do suporte sólido pode ser detectada usando um segundo agente de captura para a proteína. Tais “ensaios sanduíche” são bem conhecidos na técnica.

Em outros ensaios, a ligação entre um agente de captura e a proteína pode ocorrer em solução antes da imobilização da superfície do agente de captura.

Em particular, os presentes métodos podem ser utilizados para detectar a proteína E6 de cepas oncogênicas do HPV. Nestas formas de realização, o agente de captura utilizado no método de detecção pode ser, por exemplo, um anticorpo ou um polipeptídeo que compreendam um domínio PDZ que se liga a um ligando PDZ (isto é, um sítio de ligação para um domínio PDZ) contido na proteína E6. Por exemplo, o método de ligação de detecção de E6 presente pode utilizar uma proteína contendo o domínio PDZ que contém o segundo PDZ de MAGI-1 ou o domínio PDZ de DLG ou TIP1, etc, como descrito no pedido publicado US 20040018487 (publicado em 29 de janeiro de 2004) e aqui incorporado por referência em sua totalidade. As proteínas exemplares contendo o domínio PDZ e as seqüências do domínio PDZ são mostradas na TABELA 2 e no EXEMPLO 4 do pedido US 20040018487. O termo “domínio PDZ” também abrange variantes (por exemplo, variantes que ocorrem naturalmente) das seqüências (por exemplo,

variantes polimórficas, variantes com substituições conservativas e outras) e domínios de espécies alternativas (por exemplo camundongo, rato). Tipicamente, os domínios PDZ são substancialmente idênticos àqueles mostrados no pedido de patente U.S. Ser. Nº 09/724.553 que é aqui incorporado por referência, por exemplo, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 % ou pelo menos cerca de 90 % de identidade de resíduo de aminoácido quando comparados e alinhados para a correspondência máxima. é avaliado na técnica que os domínios PDZ podem ser mutados para dar mudanças de aminoácido que podem fortalecer ou enfraquecer a ligação e alterar a especificidade, embora permaneçam domínios PDZ (Schneider *et al.*, 1998, Nat. Biotech. 17: 170-5). A menos de outro modo indicado, uma referência a um domínio PDZ particular (por exemplo um domínio MAGI-1 2) é intencionada a abranger o domínio PDZ particular e as suas variantes de ligação de E6 de HPV deste. Em outras palavras, se uma referência é feita a um domínio PDZ particular, uma referência também é feita às variantes deste domínio PDZ que liga a proteína E6 oncogênica do HPV, como descrito abaixo. A este respeito é mencionado que a numeração dos domínios PDZ em uma proteína pode mudar. Por exemplo, o domínio MAGI-1 2 (da seqüência de aminoácido PSELKGICFIHTKLRKSSRGE 20 GFTVVGGDEPDEFQIKSLVLDGPAALDGKMETGDVIVSVNDTCVLG HTHAQWKIFQSIPIGAS'VDLELCRGYPLPFDPPDN), como aqui dado como referência, pode ser dado como referência como MAGI-1 domínio 1 em outra literatura. Como tal, quando um domínio PDZ particular de uma proteína é dado como referência neste pedido, esta referência deve ser entendida em vista da seqüência deste domínio, como aqui descrito, particularmente na listagem de seqüência da Tabela 2 do Pedido US 20040018487, mostra a relação entre as seqüências da listagem de seqüência e os nomes e números de acesso do Genbank para vários domínios, onde apropriado. Como aqui usado, o termo “proteína PDZ” refere-se a uma

proteína que ocorre naturalmente contendo um domínio PDZ. As proteínas PDZ exemplares incluem CASK, MPP1, DLG1, DLG2, PSD95, NeDLG, TIP-33, SYN1a, TIP-43, LDP, LIM, LIMK1, LIMK2, MPP2, NOS1, AF6, PTN-4, prIL16, 41,8kD, KIAA0559, RGS12, KIAA0316, DVL1, TIP-40, 5 TIAM1, MINT1, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3, KIAA0303, CBP, MINT3, TIP-2, KIAA0561 e TIP-1. Como aqui usado, o termo “polipeptídeo do domínio PDZ” refere-se a um polipeptídeo contendo um domínio PDZ, tal como uma proteína de fusão incluindo uma seqüência de domínio PDZ, uma proteína PDZ que ocorre naturalmente ou um peptídeo do domínio PDZ isolado. Um polipeptídeo do domínio PDZ portanto pode ter cerca de 60 10 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 70 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 80 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 90 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 100 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 200 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 300 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 500 aminoácidos ou mais 15 no comprimento, cerca de 800 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 1000 aminoácidos ou mais no comprimento, usualmente até cerca de 2000 aminoácidos ou mais no comprimento, cerca de 50 a 2000 aminoácidos no comprimento, cerca de 50 a 1500 aminoácidos no comprimento, cerca de 50 a 2000 aminoácidos no comprimento, cerca de 60 a 1000 aminoácidos no comprimento, cerca de 70 a 1000 aminoácidos no comprimento. Os peptídeos 20 do domínio PDZ usualmente não têm mais do que cerca de 200 aminoácidos (por exemplo 50 a 200 aminoácidos, 60 a 180 aminoácidos, 80 a 120 aminoácidos ou 90 a 110 aminoácidos) e codificam um domínio PDZ.

25 Os anticorpos adequados para detectar a proteína E6 do HPV são descritos na 20050142541 (publicado em 30 de junho de 2005), por exemplo. Os métodos detalhados para identificar a proteína E6 de cepas oncogênicas do HPV são encontrados no pedido de patente U.S. publicado US20040018487, métodos estes que são aqui incorporados em sua totalidade.

Estes métodos publicados são facilmente adaptados para aplicação nos presentes métodos.

Em certas formas de realização, um anticorpo anti-E6 pode ser ligado a um suporte sólido e um extrato de proteína produzido pelos métodos 5 objetos é contatado com o anticorpo ligado ao suporte sólido. A ligação da proteína E6 oncogênica no extrato de proteína pode ser detectada usando uma proteína contendo o domínio PDZ. Em outras formas de realização, uma proteína contendo o domínio PDZ pode ser ligado a um suporte sólido e um extrato de proteína produzido pelos métodos objetos é contatados com a 10 proteína contendo o domínio PDZ ligada ao suporte sólido. A ligação de proteína E6 oncogênica no extrato de proteína pode ser detectado usando um anticorpo anti-E6. Em métodos alternativos, a ligação entre o anticorpo de proteína contendo o domínio PDZ pode ocorrer em solução (isto é, na ausência da ligação do anticorpo ou proteína contendo o domínio PDZ a um 15 suporte sólido), e, depois da ligação, o anticorpo ou proteína contendo o domínio PDZ podem ser ligados a um suporte sólido (por exemplo, pérolas ou semelhante). Nestas formas de realização, a proteína contendo o domínio PDZ pode ser uma proteína de fusão tendo um domínio de afinidade que liga ao suporte sólido. A presença da proteína E6 pode ser detectada usando um 20 segundo agente de captura que reconheça a proteína E6.

Os resultados obtidos dos métodos de ensaio descritos acima podem ser comparados aos resultados obtidos de controles adequados, por exemplo, um controle positivo (em que um extrato de proteína conhecido por conter a proteína à qual o agente de captura se liga pode ser utilizado) ou um 25 controle negativo (por exemplo, em que um reagente de extração de proteína que não foi contatado com uma amostra celular pode ser utilizado).

Os resultados obtidos dos métodos de ensaio descritos acima podem indicar a presença, ausência ou, em certas formas de realização, a quantidade de uma proteína em um extrato de proteína.

Em certas formas de realização, os resultados obtidos dos métodos de ensaio descritos acima podem ser comunicados de volta a uma localização remota, por exemplo, por telefone, fax, e-mail, correio ou quaisquer outros meios. Os resultados podem ser comunicados ao paciente ou 5 um médico do paciente, por exemplo.

Os métodos acima de detecção de proteína podem ser realizados em combinação com um teste diferente, tal como um teste citológico, por exemplo, um teste Pap para identificar células cervicais cancerosas ou pré-cancerosas ou outros testes moleculares. Nestas formas de 10 realização, a amostra celular pode ser dividida em partes antes do uso. A primeira parte pode ser usada em ensaios citológicos e a segunda parte pode ser usada nos métodos descritos acima.

De acordo com o acima, certas formas de realização da invenção também fornecem um sistema para produzir um extrato de proteína. 15 O sistema no geral contém: a) uma amostra celular contendo células fixas; b) um reagente de extração que tem um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e c) um reagente de neutralização, onde as células fixas, reagente de extração e agente de neutralização podem ser utilizados nos métodos acima para produzir um extrato de proteína adequado para o uso em um ensaio de 20 ligação. O reagente de extração e/ou o reagente de neutralização contém um detergente não iônico.

KITS

Já em um outro aspecto, a presente invenção fornece kits para praticar os métodos objetos, por exemplo, para produzir um extrato de 25 proteína a partir de células fixas, em certas formas de realização, para testar quanto a presença de uma proteína no extrato de proteína. Os kits objetos incluem pelo menos um reagente de extração que tenha um pH pelo menos em torno do pH 10,0 e um reagente de neutralização. O reagente de extração e/ou o reagente de neutralização contém um detergente não iônico. Além

disso, os kits podem incluir um agente de captura para a detecção de uma proteína, e, em certas formas de realização, reagentes (por exemplo, tampões e reagentes de detecção) para a detecção desta proteína usando o agente de captura. Os componentes acima podem estar presentes em recipientes separados ou um ou mais componentes podem ser combinados em um único recipiente, por exemplo, um frasco de vidro ou plástico.

Além dos componentes acima, os kits objetos podem incluir ainda instruções para praticar os métodos objetos. Estas instruções podem estar presentes nos kits objetos em uma variedade de formas, uma ou mais das quais podem estar presentes no kit. Uma forma em que estas instruções podem estar presentes é como informação impressa em um meio ou substrato adequados, por exemplo, um pedaço ou pedaços de papel nos quais a informação é impressa, na embalagem do kit, em um inserto de embalagem, etc. Já um outro meio seria um meio legível por computador, por exemplo, disquete, CD, etc., no qual a informação foi gravada. Já um outro meio que pode estar presente é um endereço de sítio da web que pode ser usado por intermédio da Internet para acessar a informação em um sítio remoto. Qualquer meio conveniente pode estar presente nos kits.

UTILIDADE

O método e sistema descritos acima são facilmente utilizados em uma variedade de métodos de pesquisa e diagnóstico, incluindo métodos de diagnosticar uma doença ou condição ou infecção particulares por um agente infeccioso, tal como um vírus ou bactérias. Em uma forma de realização, o método é utilizado como parte de um diagnóstico para a detecção de células infectadas com o HPV. Visto que a presença de cepas oncogênicas de HPV está associada com células cancerosas e pré-cancerosas, os presentes métodos podem ser utilizados para detectar células cervicais cancerosas ou pré-cancerosas.

O HPV é conhecido ser um agente causativo nas seguintes

doenças: epidermodisplasia verruciforme (EV), um distúrbio de pele de vida longa que resulta em alto risco para o câncer de pele (por exemplo, escamocelular); neoplasias cervicais tais como neoplasia intraepitelial cervical (CIN) e carcinoma cervical invasivo (ICC); neoplasias vaginais tais como neoplasia intraepitelial vaginal (VAIN) e carcinoma vaginal (VC);
5 neoplasias vulvares tais como neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) e carcinoma vulvar; carcinoma peniano (incluindo papulose de Bowenoid); carcinomas anais (AC) e perianais (PC); carcinomas orofaríngeos (OS); carcinomas esofágicos (EC); canceres de pele não melanoma (por exemplo,
10 carcinoma de célula basal-BCC e carcinoma de célula escamosa-SCC); e melanoma. Como tal, em uma forma de realização, os presentes métodos podem ser utilizados como um diagnóstico para qualquer uma destas doenças.

Em uma forma de realização, as células são obtidas (por exemplo, esfoliada ou dissecadas) de um paciente e depositadas em um meio líquido contendo um fixador que, em certas formas de realização, pode ser um meio de transporte para teste citológico. As células são usualmente obtidas no consultório do médico ou clínica, a amostra celular é enviada e recebida por uma instalação de teste em que os métodos de detecção de proteína relatados acima e, opcionalmente, ensaios de citologia são realizados. Os resultados do teste são comunicados ao paciente, em algumas formas de realização por intermédio do médico e um associado deste.
15
20

O paciente do qual as células são utilizadas pode ser um mamífero, por exemplo, um cão ou gato, um roedor (por exemplo, camundongo, porquinho da Índia ou rato) ou primata (por exemplo, um ser humano, chimpanzé ou macaco). Em muitas formas de realização, o paciente será um ser humano, particularmente um do sexo masculino ou do sexo feminino. Em certas formas de realização, o paciente pode apresentar sintomas de infecção pelo HPV (por exemplo, pode ter verrugas em uma ou mais partes do corpo), pode ser suspeito de estar infectado pelo HPV (por
25

exemplo, pode conter células que estão citologicamente compatíveis com uma tal infecção) ou pode já ter sido testado positivo para o HPV. Em certas formas de realização, o paciente pode não ter nenhuma indicação de infecção pelo HPV e os métodos acima podem ser utilizados como parte de uma 5 triagem de rotina.

Em uma forma de realização, os presentes métodos podem ser utilizados para detectar qualquer cepa de HPV oncogênico, por exemplo, HPV 26, HPV 53, HPV 66, HPV 73, HPV 82, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 35, HPV 30, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 59, 10 HPV 58, HPV 33, HPV 66, HPV 68 ou HPV 69, (particularmente qualquer uma da maioria das cepas do HPV predominantes, por exemplo, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 e HPV 45) pela detecção da proteína E6 desta cepa. Em uma forma de realização, no ponto de iniciar os presentes métodos, 15 não é conhecido se as células fixas contêm a proteína E6 oncogênica ou de qual cepa uma proteína E6 oncogênica é. Se um ensaio de detecção indica a presença de uma proteína E6 oncogênica em células fixas, então a identidade da cepa de HPV que infectou estas células pode ser determinada por outros ensaios moleculares, por exemplo, aqueles que utilizam anticorpos específicos 20 a uma proteína E6 particular ou outra proteína codificada pelo vírus ou pelo seqüenciamento de DNA viral.

Os seguintes exemplos são oferecidos por via de ilustração e não por via de limitação.

EXPERIMENTAL

Extração de amostras clínicas bloqueadas

As células transfetadas com o gene E6 do HPV16 (C33A+) 25 foram fixadas com meio THINPREP® e adicionadas (isto é, “bloqueadas”) em porções das amostras clínicas fixadas com THINPREP® como listado abaixo. As células foram bloqueadas em metade de cada uma das cinco amostras clínicas (cada metade da amostra clínica tendo 20 milhões de células C33A+).

Esquema de Extração:

- Células C33A(+) ThinPrep / 20 M de células por ml
 1 a 20 M de células C33A(+) ThinPrep em 1/2 #229 negativo clínico (1,0 ml de extração)
- 5 2 a 20 M de células C33A(+) ThinPrep em 1/2 de #230 negativo clínico (1,0 ml de extração)
- 3 a 20 M de células C33A(+) ThinPrep em 1/2 #231 negativo clínico (1,0 ml de extração)
- 4 a 20M de células C33A(+) ThinPrep em 1/2 #232 negativo clínico (1,0 ml de extração)
- 10 5 a 20 M de células C33A(+) ThinPrep em 1/2 #233 negativo clínico (1,0 ml de extração)
- 6 a 20 M de células C33A(+) ThinPrep (1,0 ml de extração)

Reagente de extração:

- 15 Triton X-100 / Lote 092K0171 - (1 % = 250 µl)
 5M de NaCl / Lote 5701-53 - (0,15M = 750 µl)
 0,5 M de Tris Base / Lote 5708-20 - (0,1 M = 5 ml)
 0,5 M de Glicina / Lote 5708-9 - (0,1 M = 5 ml)
 10 % de SDS / Lote 5708-8 - (0,05 % = 125 µl)
- 20 8 M de Uréia / Lote 5678-83 - (0,25 M = 781 µl)
 Adicionar RO/DI a 20 ml - (8,1 ml)
 NaOH 5 N / Lote A09522 - (525 µl)
 Adicionar RO/DI a 25 ml - (4,475 ml)
 pH Final - 11,48
- 25 Formulação final: 0,1 M Tris / 0,1 M de glicina / 0,15 M de NaCl / 1 % de Triton X-100 / 0,05 % de SDS / 0,25 M de uréia pH 11,48

Procedimento de extração de proteína:

1. Adicionar a suspensão de célula a tubo de centrífuga de 50 ml

2. Girar a 3000 rpm por 10 a 15 minutos
3. Cuidadosamente remover o sobrenadante
4. Transferir os conteúdos a um tubo nunc de 1,5 ml
5. Girar a 3000 rpm por 10 a 15 minutos
6. Cuidadosamente remover o sobrenadante
7. Adicionar a quantidade requerida de reagente de extração à pelota
8. Recolocar em suspensão para romper a pelota de célula
 - a. Aditivos (DTT @ 1:100)
9. Checar o pH, ajustar a 11,5
10. Misturar na temperatura ambiente (ou temperatura apropriada para a extração) por 30 minutos
 11. Girar a 14.000 rpm por 10 a 15 minutos
 12. Remover o sobrenadante clarificado
13. Adicionar DTT @ 1:100
14. Neutralizar ao pH 8,0 com HCl 5 N e testar no ELISA
(Neutralizar ao pH 8,0 com 31,0 µl de HCl 5 N / 1 ml)
100 mM de DTT / NR 5701-90 / DOM 2/7/05

Método ELISA

- 20 1 - Revestir a placa (Nunc 439454 Maxisorp F96 / lote 542043) com 5 µg/ml de GST-Magi-PDZ (lote 88,18 / 0,65 µg/µl) em PBS (lote 021405) - 100 µl por reservatório
 $11 \text{ ml} \times 5 \text{ } \mu\text{g/ml} = 55 \text{ } \mu\text{g} \times 1 \text{ } \mu\text{l}/0,65 \text{ } \mu\text{g} = 84,6 \text{ } \mu\text{l}$ de GST-Magi-PDZ
- 25 2 - Incubar durante a noite a 4° C
- 3 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
- 4 - Bloquear a placa com 250 µl de tampão de bloqueio (lote 033005)
- 5 - Incubar por 2 horas a 25° C

- 6 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
7 - Adicionar 100 µl de MBP-E6 / amostra de lisado aos reservatórios apropriados
8 - Incubar por 1 hora a 25° C
5 9 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
10 10 - Adicionar 100 µl de anticorpo anti-E6 (4C6 - 2,85 mg/ml - lote 02) cerca de 5 µg/ml aos reservatórios apropriados em 2 % de tampão BSA HNTG (lote 031805B). O peptídeo de terminal N (HPVI6E6 lote #PN3952-2) é adicionado às amostras apropriadas a 10 µg/ml para verificar a especificidade de sinal (o peptídeo é pré-incubado com o anticorpo anti-E6 por 45 minutos antes da adição).
11 - Incubar por 2 horas a 25° C
12 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
13 - Preparar uma diluição 1:5000 de IgG-HRP anti-15 camundongo de cabra (Jackson GxM IgG-HRP / catálogo #115-035062 / lote 60988) em 2 % de BSA / 0,05 % de tampão Tween 20 (lote 040505).
 $10,0 \text{ ml} \times 1/5000 = 0,002 \text{ ml} \times 1000 \mu\text{l/ml} = 2,0 \mu\text{l}$ de IgG-HRP anti-camundongo de cabra
14 - Adicionar 100 µl da diluição 1:5000 de IgG-HRP anti-20 camundongo de cabra aos reservatórios apropriados
(Remover o Substrato TMB e colocar na temperatura ambiente)
15 - Incubar por 1 hora a 25° C
16 - Lavar 5x (TBS-Tween) com lavador de placa
25 17 - Adicionar 100 µl de Substrato Neogen K-Blue TMB (lote 041018)
18 - Incubar por 30 minutos a 25° C
19 - Adicionar 100 µl de Solução de Parada (lote 030705) e
Ler a A450

Formulação:

2 % de BSA / 0,05 % de tampão Tween - (lote 040505)

2 % de bloqueador BSA lote 033005 (49,975 ml)

Tween 20 lote A016759301 (0,025 ml)

5 Resultados

	Seqüencial (nenhum peptídeo)			Seqüencial (peptídeo de terminal N)		
			Média	Média		
20 M de células C33A(+) TP em 1/2 #229 negativo clínico*	1,294	1,220	1,257	0,464	0,516	0,411
20M de células C33A(+) TP em 1/2 #230 negativo clínico*	1,140	1,103	1,122	0,631	0,630	0,632
20 M de células C33A(+) TP em 1/2 #231 negativo clínico*	1,136	1,178	1,157	0,443	0,451	0,434
20M de células C33A(+) TP em 1/2 #232 negativo clínico*	0,946	0,924	0,935	0,580	0,585	0,574
20M de células C33A(+) TP em 1/2 #233 negativo clínico*	1,288	1,169	1,229	0,843	0,843	0,843
20 M de células C33A(+) TP células C33A(+) / 2M / LB (+ve)	1,762	1,601	1,727	0,345	0,334	0,356
células C33A(-) / 2M / LB (-ve)	2,052	2,134	2,093			
Anti-4C6 + N-Term (-ve)	0,167	0,188	0,178			
Anti-4C6 (-ve)	0,056	0,062	0,059			
	0,106	0,115	0,111			

*Volume de Extração - 1 ml

Como pode ser observados a partir dos resultados mostrados na tabela acima, a ligação de E6 foi detectada para todas as amostra clínicas bloqueadas.

Está evidente que a partir dos resultados e debates acima que 10 os métodos objetos fornecem várias vantagens distintas para a análise molecular de células fixas. Em particular, os métodos fornecem um método de rotina para a produção de um extrato de proteína a partir de células fixas em que as proteínas no extrato de proteína são detectáveis em ensaios de ligação. Visto que no geral é difícil detectar certas proteínas em células fixas, 15 a invenção objeto representa uma contribuição significante para a técnica.

Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência como se cada publicação ou pedido de patente individuais fossem específica e individualmente indicados como sendo incorporado por referência. A citação 20 de qualquer publicação é para esta divulgação anterior à data de depósito e não deve ser interpretada como uma admissão de que a presente invenção não

é designada para preceder tal publicação em virtude da invenção anterior.

Embora a invenção precedente tenha sido descrita em alguns detalhes por via de ilustração e exemplo para propósitos de clareza de entendimento, está facilmente evidente àqueles de habilidade comum na técnica considerando-se as divulgações desta invenção que certas mudanças e modificações podem ser feitas a ela sem divergir do espírito ou escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um extrato de proteína a partir de células fixas, caracterizado pelo fato de que compreende:
 - a) contatar as ditas células fixas com um reagente de extração para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e
 - b) contatar a dita composição intermediária com um reagente de neutralização para neutralizar o dito pH da dita composição intermediária e produzir o dito extrato de proteína,
- 10 em que um ou ambos do dito reagente de extração e do dito reagente de neutralização compreende um detergente não iônico.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:
 - a) contatar as ditas células fixas com um reagente de extração para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e
 - b) contatar a dita composição intermediária com um reagente de neutralização que compreende um detergente não iônico;
- 15 para neutralizar o dito pH da dita composição intermediária e produzir o dito extrato de proteína.
- 20 3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:
 - a) contatar as ditas células fixas com um reagente de extração que compreenda um detergente não iônico para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e,
 - b) contatar a dita composição intermediária com um reagente de neutralização;
- 25 para neutralizar o dito pH da dita composição intermediária e produzir o dito extrato de proteína.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

receber uma amostra celular que compreenda as ditas células fixas antes da etapa a).

5 5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as ditas células são células cervicais fixas.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as ditas células fixas estão presentes no meio de transporte SUREPATH®, CYTOLYT® ou PRESERVCYT®.

10 7. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita amostra celular é recebida de uma localização remota.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito pH está na faixa em torno do pH 11,0 até cerca do pH 13.

15 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito reagente de extração compreende um desnaturante.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o dito desnaturante é dodecil sulfato de sódio (SDS), uréia ou *sarkosyl*.

20 11. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito detergente não iônico compreende um detergente TRITON® ou TWEEN®.

12. Método para detectar uma proteína, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 a) produzir um extrato de proteína a partir de células fixas de acordo com o método como definido na reivindicação 1; e

b) testar quanto a presença da dita proteína no dito extrato de proteína.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito teste utiliza um agente de captura para a dita proteína.

14. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito teste inclui um ensaio imunológico.

15. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima 5 (ELISA).

16. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é uma proteína do papilomavírus humano (HPV).

10 17. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é uma proteína E6 do HPV.

18. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que as ditas células fixas são células cervicais esfoliadas.

15 19. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que as ditas células fixas são recebidas de uma localização remota antes da dita etapa de contato a).

20. 20. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

d) comunicar resultados do dito teste a uma localização remota.

20. 21. Sistema para produzir um extrato de proteína, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) uma amostra celular que compreende células fixas;

b) um reagente de extração que tem um pH pelo menos em torno do pH 10,0, e

25 c) um reagente de neutralização,
em que um ou ambos do dito reagente de extração e do dito reagente de neutralização compreende um detergente não iônico e onde o dito reagente de extração e agente de neutralização podem ser utilizados no método como definido na reivindicação 1 para produzir um extrato de

proteína adequada para o uso em um ensaio de ligação.

22. Sistema de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que compreende ainda reagentes para detectar uma proteína no dito extrato de proteína.

5 23. Kit para produzir um extrato de proteína a partir de células fixas, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) um reagente de extração que tem um pH pelo menos em torno do pH 10,0,

b) um reagente de neutralização; e

10 c) instruções para realizar o método como definido na reivindicação 1 usando o dito reagente de extração e o dito reagente de neutralização;

em que um ou ambos do dito reagente de extração e do dito reagente de neutralização compreendem um detergente não iônico.

15 24. Kit de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que compreende ainda reagentes para detectar uma proteína no dito extrato de proteína.

20 25. Kit de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que os ditos reagentes incluem um agente de captura para a dita proteína.

26. Kit de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a dita proteína é a proteína E6 do HPV.

27. Método para extrair uma proteína viral alvo de uma amostra de célula, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 a) contatar uma amostra de célula contendo células em que uma proteína viral alvo está presente ou suspeita de estar presente com um reagente de extração para produzir uma composição intermediária tendo um pH pelo menos em torno do pH 10,0; e

b) contatar a dita composição intermediária com um reagente

de neutralização para neutralizar o dito pH da dita composição intermediária e produzir um extrato da proteína viral alvo.

5 28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou ambos do dito reagente de extração e do dito reagente de neutralização compreende um detergente não iônico.

29. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que as células na amostra de célula são fixadas com um fixador químico.

10 30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o fixador químico é selecionado do grupo que consiste de álcoois, aldeídos, cetonas, tetróxido de ósmio, ácido acético, ácido pícrico, sais iônicos de metal pesado e propileno glicol.

15 31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o álcool é metanol ou etanol; o aldeído é glutaraldeído ou formaldeído; e a cetona é acetona.

32. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

receive a amostra de célula que compreende células fixas antes da etapa a).

20 33. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a proteína viral é codificada por um vírus patogênico.

25 34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o vírus patogênico é selecionado do grupo que consiste do HIV, vírus Ebola, vírus Marburg, vírus da hepatite, vírus sincicial respiratório (RSV), vírus simplex do herpes (HSV), vírus do papiloma humano (HPV).

35. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a proteína viral é a proteína E6 ou E7 do HPV.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o HPV é a cepa 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48, 50, 16, 18, 31, 35,

30, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 58, 33, 66, 68, 69, 26, 53, 73 ou 82 do HPV.

37. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o HPV é uma cepa do HPV oncogênica selecionada do grupo que consiste de HPV 26, HPV 53, HPV 66, HPV 73, HPV 82, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 35, HPV 30, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 59, HPV 58, HPV 33, HPV 66, HPV 68, HPV 69 e HPV 82.

38. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

detectar a presença da proteína viral alvo no extrato.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a detecção utiliza um agente de captura para a proteína viral alvo.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a proteína viral é a proteína E6 do HPV; e o agente de captura é um anticorpo contra a proteína E6.

41. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a proteína viral é a proteína E6 do HPV; e o agente de captura compreende um polipeptídeo contendo um domínio PDZ.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o domínio PDZ é o segundo domínio de MAGI-1, o domínio PDZ de DLG ou TIP1.

43. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a amostra de célula contém ainda muco ou sangue.

44. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a amostra de célula contém células cervicais esfoliadas.

P10803220-4

RESUMO

“MÉTODOS PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA A PARTIR DE CÉLULAS FIXAS E PARA DETECTAR UMA PROTEÍNA, SISTEMA E KIT PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA, E,
5 MÉTODO PARA EXTRAIR UMA PROTEÍNA VIRAL ALVO DE UMA AMOSTRA DE CÉLULA”

Métodos para produzir um extrato de proteína de células, tais como células contendo proteínas virais, são fornecidos. Em termos gerais, os métodos envolvem: aumentar o pH das células a um pH pelo menos em torno 10 do pH 10,0 para produzir uma composição intermediária, e depois, na presença de um detergente não iônico, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteína. Kits e composições para praticar os métodos objetos são também fornecidos.