



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

(11) PI 0820177-3 B1



(22) Data do Depósito: 14/11/2008

(45) Data de Concessão: 02/07/2019

(54) Título: MÉTODOS PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA A PARTIR DE CÉLULAS FIXADAS OU NÃO-FIXADAS

(51) Int.Cl.: C07K 1/36; C12N 5/071.

(30) Prioridade Unionista: 14/11/2007 US 11/985547.

(73) Titular(es): BECTON, DICKINSON AND COMPANY; ARBOR VITA CORPORATION.

(72) Inventor(es): ADRIEN P. MALICK; VIRGINIA M. CREWS; JULIE L. ROSALES; CARRIE S. FERGUSON; JEFFEREY H. BRUTON; ROBERT J. BEADENKOPF; JOHN MANTLO.

(86) Pedido PCT: PCT US2008083707 de 14/11/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/065091 de 22/05/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 14/05/2010

(57) Resumo: "MÉTODOS PARA PRODUZIR UM EXTRA TO DE PROTEÍNA A PARTIR DE CÉLULAS FIXADAS OU NÃO-FIXADAS, E, SISTEMA PARA PRODUZIR UM EXTRA TO DE PROTEÍNA" São fornecidos métodos para produzir um extrato de proteína de células, tais como células ou amostras celulares contendo proteínas virais. Em termos gerais, os métodos podem envolver: aumentar o pH das células para um pH de pelo menos cerca de pH 10,0 para produzir uma composição intermediária, e então, na presença de um detergente não-iônico tal como um polióxietileno-álquil-éter, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteína. Tais métodos podem ser usados conjuntamente com métodos para detectar uma ou mais proteínas alvo em uma amostra, tais como proteínas virais. Sistemas, kits e composições para praticar os presentes métodos também são fornecidos.

“MÉTODOS PARA PRODUZIR UM EXTRATO DE PROTEÍNA A PARTIR DE CÉLULAS FIXADAS OU NÃO-FIXADAS”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Em muitos métodos diagnósticos, células são retiradas de
5 sujeitos e depositadas em um meio líquido contendo um fixador. As células
são fixadas no meio e examinadas citologicamente com o propósito de
fornecer uma diagnose. Por exemplo, a detecção de células pré-cancerosas ou
cancerosas em tecido cervical é rotineiramente realizada por exame
microscópico de células cervicais esfoliadas. Este método, desenvolvido por
10 George N. Papanicolaou e conhecido como o teste "Pap", envolve esfoliação
de células de colo do útero de uma mulher usando um dispositivo de
amostragem, deposição das células esfoliadas em um meio de transporte que
contém um fixador, e então deposição das células sobre uma lâmina. As
células são então tingidas e examinadas por microscopia de luz para
15 anormalidades celulares por um profissional médico treinado. Mais de 55
milhões de testes Pap são realizados por ano apenas nos Estados Unidos.

Apesar do sucesso de tais testes citológicos, os testes são
propensos ao erro. Por exemplo, tem sido estimado que até 40% dos testes
Pap convencionais estão comprometidos pela presença de contaminantes tais
20 como células mucosais, células sanguíneas e células inflamatórias obscuras.
Estes contaminantes acarretam resultados falso-negativos, resultados falso-
positivos, e uma quantidade significativa de trabalho de catamnésia. Veja,
e.g., Koss, L. G. (1989), "The Papanicolaou Test for Cervical Cancer
Detection: A Triumph and a Tragedy", JAMA 261:737-743; veja também

DeMay, "Problems in Pap Smear Interpretation", Arch. Pathol. Lab. Med. 121:229-23 (1997).

Em vista do apresentado acima, há uma necessidade de métodos diagnósticos moleculares complementares para a análise de células que estão presentes em um meio líquido contendo um fixador. Tais métodos não são diretos, contudo, porque nem sempre é possível realizar tais métodos com células fixadas. Por exemplo, certos fixadores (e.g., aqueles meios de transporte utilizados em sistemas de teste THINPREP™ ou SUREPATH™) podem causar a precipitação ou a agregação de proteínas celulares específicas, tornando deste modo aquelas proteínas insolúveis e difíceis ou impossíveis de serem confiavelmente detectadas usando os meios convencionais, e.g., utilizando o ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) ou outro teste imunológico.

Portanto há uma necessidade de métodos e composições para extração de proteínas de células fixadas e não fixadas em uma maneira que permita que elas sejam adequadas para uso em ensaios de detecção molecular, e.g., imunológicos. A invenção aqui descrita atende a esta necessidade, e outras.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Métodos para produzir um extrato de proteínas de células são fornecidos. Em termos gerais, os métodos envolvem: contatar uma amostra de células com um reagente extrativo de pH alto (de pelo menos cerca de pH 10) compreendendo um polióxietileno-alquil-éter (e.g. Brij™35) para produzir uma composição intermediária, e então, na presença de um agente neutralizador, neutralizar o pH da composição intermediária, por exemplo, para um valor de pH de cerca de 6-9, opcionalmente um valor de pH de 7-8,5, para produzir o extrato de proteínas. Em certas modalidades, um ou ambos de o reagente extrativo e o reagente neutralizador contém um polióxietileno-alquil-éter. As células podem ser células cervicais esfoliadas fixadas ou não-

fixadas. Em certas modalidades, os métodos envolvem extrair uma proteína viral alvo tal como uma proteína E6 de HPV de uma amostra de células. A invenção também fornece métodos para detectar a presença de uma proteína, tal como uma proteína viral alvo, compreendendo produzir um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas de acordo com o método descrito acima e testar para a presença de dita proteína em dito extrato de proteínas. Em adição, a invenção fornece um sistema para produzir um extrato de proteínas compreendendo: a) uma amostra celular compreendendo células fixadas ou não-fixadas; b) um reagente extrativo que tem um pH de pelo menos cerca de pH 10,0, e c) um reagente neutralizador no qual um ou ambos de dito reagente extrativo e dito reagente neutralizador compreende(m) um polióxietileno-alkil-éter e onde ditos reagente extrativo e reagente neutralizador podem ser utilizados no método descrito acima para produzir um extrato de proteínas adequado para uso em um ensaio de ligação. Ademais, a invenção fornece um kit para produzir um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas. O kit pode adicionalmente compreender componentes e/ou reagentes para detectar a proteína alvo no extrato de proteínas.

DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

FIG. 1A demonstra o efeito sinérgico sobre a detecção de proteína E6 de HPV extraída pelo uso de um reagente extrativo com um pH alto combinado com certos aditivos. Proteína E6 de HPV recombinante previamente purificada (MBP-E6) foi suspensa em reagente extrativo e então neutralizada pelo reagente neutralizador seguindo o protocolo aqui descrito. A proteína E6 foi capturada usando um ensaio de fluxo lateral (LF) aqui descrito e detectada com um leitor UMM.

FIG. 1B confirma que a introdução de aditivos no estágio de neutralização não tem um efeito tão forte quanto um efeito de introdução durante o estágio de extração sobre a detecção de proteína E6 de HPV16

extraída.

FIG. 2 demonstra a detecção de proteína E6 de HPV16 extraída de Células SiHa expressando HPV16 usando vários aditivos no reagente extrativo.

5 FIG. 3 demonstra um efeito de que a titulação da concentração de células tem sobre a detecção de proteína E6 de HPV16 extraída. Foram usadas duas linhagens celulares uma positiva para HPV outra negativa para HPV.

10 FIG. 4 demonstra que uma extração de proteína E6 de HPV16 de amostras clínicas negativas não-fixadas inoculadas com células SiHa expressando HPV16.

15 FIG. 5 demonstra que um efeito sobre a detecção de proteína E6 de HPV extraída quando a concentração de Brij™35 no reagente extrativo é aumentada e quando o Brij™35 é combinado com outros detergentes não-iônicos tal como Triton™X-100 ou Tween™-20.

FIG. 6 demonstra um efeito sobre a detecção de proteína E6 de HPV extraída quando são usados tempos variados de extração e/ou de neutralização.

20 FIG. 7 demonstra um uso de Tampão 2 de pH alto / 4% de Brij™35 para a extração de proteína E6 derivada de cepas 18 e 45 de HPV.

FIG. 8 demonstra um efeito de dose-resposta sobre a detecção de proteína E6 derivada de cepas 16 e 18 de HPV.

FIG. 9 demonstra uma otimização adicional da concentração de Brij™35 (com ou sem outros aditivos não-iônicos) no reagente extrativo.

25 FIG. 10 demonstra uma otimização adicional da concentração de Brij™35 (com ou sem outros aditivos não-iônicos) no reagente extrativo e o efeito sobre a extração de proteína E6 de HPV16 de amostras clínicas negativas não-fixadas inoculadas com células expressando HPV.

FIG. 11 demonstra um formato de citometria com esferas

ordenadas (*cytometric bead array*, CBA) para detectar proteína E6 de HPV16 extraída de células SiHa expressando HPV16.

FIG. 12 demonstra o uso de Tampão 2 de pH alto / 4% de BrijTM35 na extração de proteína E6 de HPV16 de células quer fixadas quer não-fixadas.

FIG. 13 demonstra que a filtração de amostra através de um filtro de seringa de PVDF Millipore de 5,0 µm não diminui significativamente o sinal de amostra.

DEFINIÇÕES

Salvo indicação em contrário, todos os termos científicos e técnicos aqui usados têm os mesmos significados como comumente entendidos por uma pessoa ordinariamente experiente na arte à qual esta invenção pertence. Ainda, certos elementos são definidos abaixo em prol de clareza e facilidade para referência.

Os termos amostra celular ou amostra de células como aqui usados referem-se a uma composição líquida contendo uma ou mais células de interesse. Uma amostra celular pode ser uma amostra clínica contendo células removidas de (e.g., dissecadas ou esfoliadas de) um indivíduo, incluindo mas não limitadas a, por exemplo, células de plasma, soro, fluido espinhal, sêmen, fluido linfático, as seções externas da pele, tratos respiratório, intestinal, e genitourinário, lágrimas, saliva, leite, células sanguíneas, tumores, ou órgãos. Em outras modalidades, a amostra celular pode conter células crescidas *in vitro* (incluindo mas não limitadas às células em meio de cultura celular, células viralmente infectadas, células recombinantes, etc.). Em certas modalidades, a amostra celular pode conter células que estão sob risco mais elevado de serem infectadas por HPV. Nestas modalidades, as células podem ser obtidas de um colo uterino, da vulva, da vagina, do ânus, do pênis, da boca ou da garganta. Em certas modalidades, as células são de membrana mucosal e podem ser de origem epitelial. Uma

amostra celular pode ou não conter contaminantes diferentes de células esfoliadas ou dissecadas. Por exemplo, células mucosais, ou bacterianas, de levedura ou sanguíneas podem estar presentes em uma amostra celular.

"HPV" é o vírus do Papiloma de humano, incluindo mas não limitado às cepas 4, 6, 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 de HPV

Uma "cepa de HPV oncogênica" é uma cepa de HPV que conhecidamente causa câncer cervical conforme determinado pelo National Cancer Institute (NCI, 2001).

Uma "proteína E6 oncogênica" é uma proteína E6 codificada por uma cepa de HVP oncogênica. Cepas oncogênicas 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 sequências de aminoácidos de proteínas E6 oncogênicas estão depositadas no banco de dados GenBank de NCBI. Sem o desejo de se ligar à teoria, é geralmente crido que as cepas 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48, e 50 de HPV não são oncogênicas.

Os termos "polipeptídeo" e "proteína" são usados intercambiavelmente. O termo "polipeptídeo" inclui polipeptídeos nos quais a estrutura principal (*backbone*) tem sido substituída por estruturas principais (*backbones*) não-naturalmente ocorrentes, e peptídeos nos quais um ou mais aminoácidos têm sido substituídos por um ou mais aminoácidos sintéticos não-naturalmente ocorrentes.

O termo "proteína de fusão" ou seus equivalentes gramaticais refere-se a uma proteína composta de uma pluralidade de componentes polipeptídicos, que embora não estejam ligados em seus estado nativo, estão unidos por suas respectivas terminações amino e carboxila para formarem um único polipeptídeo contínuo. Proteínas de fusão podem ser uma combinação de duas, três ou mesmo quatro ou mais proteínas diferentes. O termo

polipeptídeo inclui proteínas de fusão, incluindo, mas não limitadas às, proteínas de fusão com uma sequência de aminoácidos heteróloga, fusões com sequências líderes homólogas e heterólogas, com ou sem resíduos de metionina N-terminais; proteínas imunologicamente etiquetadas; proteínas de fusão com parceiros de fusão detectáveis, e.g., proteínas de fusão incluindo como um parceiro de fusão uma proteína fluorescente, β -galactosidase, luciferase, e semelhantes.

Em geral, polipeptídeos podem ser de qualquer comprimento, e.g., 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, costumeiramente até cerca de 500 ou ,000 ou mais aminoácidos. "Peptídeos" são geralmente maiores do que 2 aminoácidos, maiores do que 4 aminoácidos, maiores do que cerca de 10 aminoácidos, maiores do que cerca de 20 aminoácidos, costumeiramente até cerca de 50 aminoácidos. Em algumas modalidades, peptídeos estão entre 5 e 30 aminoácidos em comprimento. Polipeptídeos podem ser naturais, isto é, podem ser codificados pelo genoma de um organismo ou vírus, ou não-naturais, isto é, são não-naturalmente ocorrentes.

O termo "agente capturador" refere-se a um agente que se liga em uma proteína por meio de uma interação que é suficiente para permitir que o agente se ligue e concentre a proteína de uma mistura homogênea de proteínas diferentes. Consequentemente, o termo "agente capturador" refere-se a uma molécula ou a um complexo molecular que pode se ligar especificamente em um analito, e.g., se ligar especificamente em um analito para o agente capturador, com uma constante de dissociação (K_D) menor do que cerca de 10^{-6} M sem se ligar em outros alvos. A interação de ligações pode ser mediada por uma região de afinidade do agente capturador. Agentes capturadores representativos incluem anticorpos (incluindo seus fragmentos e

miméticos) e proteínas contendo o domínio PDZ, etc.

O termo "ligação específica" refere-se à capacidade de um agente capturador preferencialmente se ligar em uma proteína específica que está presente em uma mistura homogênea de proteínas diferentes. Em certas modalidades, uma interação de ligações específicas discriminará entre uma proteína específica e outras proteínas em uma amostra, em algumas modalidades mais do que cerca de 10 a 100 vezes ou mais (e.g., mais do que cerca de 1.000- ou 10.000-vezes).

O termo "complexo de proteína / agente capturador" é um complexo que resulta da ligação específica de um agente capturador com uma proteína, i.e., um "par de parceiros de ligação". Um agente capturador e uma proteína para o agente capturador se ligam especificamente um no outro sob "condições adequadas para ligação específica", onde tais condições são aquelas condições (em termos de concentração de sal, pH, detergente, concentração de proteína, temperatura, etc.) que permitem que a ligação ocorra entre os agentes capturadores e as proteínas a serem ligadas em solução. Tais condições, particularmente com respeito aos anticorpos e seus antígenos, são bem conhecidas na arte (veja, e.g., Harlow e Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory", Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Em certas modalidades, a afinidade entre um agente capturador e a proteína que são especificamente ligados em um complexo de proteína / agente capturador é caracterizada por uma K_D (constante de dissociação) menor do que $10^{-6}M$, menor do que $10^{-7}M$, menor do que $10^{-8}M$, menor do que $10^{-9}M$, ou menor 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 analito / agente capturador, i.e., exibem ligação específica de um com o outro.

Os termos "anticorpo" e "imunoglobulina" são aqui usados intercambiavelmente para se referirem a um agente capturador que tem pelo

menos um domínio de ligação de epítipo de um anticorpo. Estes termos serão bem entendidos por aquelas pessoas na arte, e se referem a uma proteína contendo um ou mais polipeptídeos que se liga especificamente em 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 cadeias leve e pesada são juntas responsáveis pela ligação em um antígeno, e as regiões constantes são responsáveis pelas funções efetoras de anticorpo.

Os polipeptídeos de imunoglobulina reconhecidos incluem as cadeias leve kapa e lambda e as cadeia pesadas alfa, gama (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, epsilon, mu ou equivalentes em outras espécies. "Cadeias leves" de imunoglobulina de comprimento total (de cerca de 25 kDa ou cerca de 214 aminoácidos) compreendem uma região variável de cerca de COOH. As "cadeias pesadas" de imunoglobulina de comprimento total (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 acima mencionadas, e.g., gama (de cerca de 330 aminoácidos).

Os termos "anticorpos" e "imunoglobulina" incluem anticorpos e imunoglobulinas de qualquer isótipo, fragmentos de anticorpo que retêm a ligação específica em um antígeno, incluindo, mas não limitados aos, fragmentos Fab, Fv, scFv, e Fd, anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia única, e proteínas de fusão compreendendo uma porção ligante de antígeno de um anticorpo e uma proteína de não-anticorpo. Os anticorpos podem ser detectavelmente marcados, e.g., com um radioisótopo, uma enzima que gera um produto detectável, uma proteína fluorescente, e semelhantes. Os anticorpos podem adicionalmente serem conjugados em outros grupos, tais como membros de pares de ligação específicos, e.g., biotina (membro de par de ligação específica de biotina-avidina), e semelhantes. Os anticorpos

também podem estar ligados em um suporte sólido, incluindo, mas não limitado a, placas ou esferas de poliestireno, partículas de ouro coloidal, e semelhantes. Também estão incluídos nos termos Fab', Fv', F(ab')₂, e/ou outros fragmentos de anticorpo que retêm a ligação específica em antígeno.

5 Anticorpos também poderiam ser usados em conjugação com partículas detectoras amplificáveis.

Anticorpos podem existir em uma variedade de outras formas, por exemplo, Fv, Fab, e (Fab')₂, bem como anticorpos híbridos bifuncionais (i.e. bi-específicos) (e.g., Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105
10 (1987)) e em cadeias únicas (e.g., 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 como referências). (Veja, geralmente, Hood *et al.*, "*Immunology*", Benjamin, N.Y., 2nd ed. (1984), e Hunkapiller e Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986)). Anticorpos monoclonais e anticorpos de "exibição de
15 fago" são bem conhecidos na arte e estão incluídos no termo "anticorpos".

O termo "estimar" inclui qualquer forma de medição, e inclui determinar se um elemento está ou não presente. Os termos "determinar", "medir", "avaliar", "estimar" e "ensaiar" são usados intercambiavelmente e podem incluir determinações quantitativas e/ou qualitativas. Estimativa pode
20 ser relativa ou absoluta. "Estimar a presença de" inclui determinar a quantidade de algo presente, e/ou determinar se está presente ou ausente.

"Localização remota" significa uma localização diferente da localização na qual as células são obtidas e depositadas em um líquido contendo fixador. Por exemplo, uma localização remota poderia ser uma sala
25 diferente no mesmo prédio no qual as células são obtidas (e.g., outro laboratório), um prédio diferente no mesmo complexo de prédios onde as células são obtidas, ou uma localização diferente na mesma cidade, no mesmo estado ou no mesmo 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 manualmente, por correio ou por mensageiro especial da localização remota, por exemplo.

"Comunicar" informação refere-se a qualquer meio de transmitir aquela informação de uma localização para a seguinte, seja por material impresso fisicamente transportado seja por meios legíveis por computador contendo a informação (e.g., por correio), ou por transmissão de informação. Se informação é transmitida, um sinal digital ou analógico representando a informação (e.g., um sinal eletromagnético tal como um sinal luminoso ou elétrico) é transmitido através de um canal de comunicação adequado (por exemplo, uma rede privada, pública ou sem fio). Qualquer meio conveniente pode ser utilizado para transmitir dados, e.g., fac-símile, modem, internet, e-mail, etc.

Como aqui usado, o termo "meio de transporte" é utilizado para descrever o líquido adequado para a colheita de células e a preservação daquelas células em uma maneira que permita que elas sejam apropriadas para estudos citológicos baseados em líquido. Meios de transporte são comumente utilizados em teste Pap. Células depositadas em meio de transporte podem ou não ser transportadas de uma localização para outra naquele meio. Meios de transporte contêm fixador. Deposição de células em um meio de transporte fixa as células para produzir células fixadas. Meios de transporte representativos incluem meios de transporte SUREPATH™ ou PRESERVCYT™.

Uma "célula fixada" é uma célula que tem sido tratada com e citologicamente preservada por um fixador químico. Células fixadas são costumeiramente adequadas para coloração e subsequente análise morfológica e/ou citológica por microscopia de luz.

INCORPORAÇÃO COMO REFERÊNCIA

Todas as publicações e pedidos de patente mencionadas(os) neste relatório descritivo são aqui incorporadas(os) como referências na

mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicada(o) para ser incorporada(o) como referência.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

5 Embora modalidades preferidas da invenção tenham sido aqui mostradas e descritas, será óbvio para aquelas pessoas experientes na arte que tais modalidades são fornecidas apenas por meio de exemplo. Numerosas variações, mudanças, e substituições irão agora ocorrer para aquelas pessoas experientes na arte sem se desviarem da invenção. Deve ser entendido que

10 várias alternativas às modalidades 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 as estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes sejam cobertos através delas.

15 Métodos para produzir um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas são fornecidos. Em termos gerais, os métodos envolvem: contatar uma amostra de células com um reagente extrativo de pH alto (de pelo menos cerca de pH 10) compreendendo um polióxietileno-álquil-éter (e.g. BrijTM35) para produzir uma composição intermediária, e então, na

20 presença de um agente neutralizador, neutralizar o pH da composição intermediária para produzir o extrato de proteínas. Um ou ambos de o reagente extrativo e o reagente neutralizador contém o polióxietileno-álquil-éter. Em certas modalidades, as células podem ser células cervicais esfoliadas fixadas ou não-fixadas. Kits e composições para praticar os presentes métodos

25 também são fornecidos. Os presentes métodos encontram uso em uma variedade de aplicações diferentes, incluindo testes diagnósticos que detectam proteínas específicas no extrato de proteínas resultante.

Antes de a presente invenção ser descrita adiante, é para ser entendido que a invenção não é limitada às modalidades particulares da

invenção descritas abaixo, porque variações das modalidades particulares podem ser feitas e ainda caírem dentro do escopo das reivindicações anexadas. Também é para ser entendido que a terminologia utilizada é para o propósito de descrever as modalidades particulares, e não é intencionada para ser limitante. Pelo contrário, o escopo da presente invenção será estabelecido pelas reivindicações anexadas.

Neste relatório descritivo e nas reivindicações anexadas, as formas no singular de "um", "uma", "o" e "a" incluem as referências no plural a não ser que o contexto dite claramente o contrário.

Onde uma faixa de valores for fornecida, é entendido que cada valor intermediário, até um décimo da unidade do limite inferior a não ser que o contexto dite claramente o contrário, entre os limites superior e inferior daquela faixa, e qualquer outro valor intermediário ou indicado naquela faixa indicada, está incluído dentro da invenção. Os limites superior e inferior destas faixas menores podem ser independentemente o incluídos dentro das faixas menores, e também estão incluídos dentro da invenção, sujeitos a qualquer limite especificamente excluído na faixa indicada. Onde a faixa indicada inclui um ou ambos os limites, faixas excluindo qualquer um dos ou ambos aqueles limites incluídos também estão incluídas na invenção.

Salvo indicação em contrário, todos os termos científicos e técnicos aqui usados têm os mesmos significados que comumente entendidos por uma pessoa ordinariamente experiente na arte à qual esta invenção pertence. Embora alguns métodos, dispositivos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou no teste da invenção, os métodos, dispositivo e materiais preferidos são agora descritos.

Todas as publicações aqui mencionadas são aqui incorporadas como referências para o propósito de descrever e de revelar os componentes que são descritos nas publicações que possam ser usados em conexão com a

invenção presentemente descrita.

Como resumido acima, a presente invenção fornece métodos e composições para produzir um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas. Na descrição da invenção com mais detalhes, os métodos são
5 primeiro descritos seguidos por uma descrição dos kits e sistemas para uso na prática dos presentes métodos.

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Como observado acima, a invenção fornece um método para produzir um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas. Em geral,
10 os métodos envolvem duas etapas: a) contatar as células fixadas ou não-fixadas com um reagente extrativo tendo um pH que é maior do que cerca de pH. 10,0 para produzir uma composição intermediária e b) contatar a composição intermediária com um reagente neutralizador. O reagente extrativo e/ou o reagente neutralizador compreende um polióxietileno-alkil-
15 éter. O extrato de proteínas resultante contém um polióxietileno-alkil-éter e tem um pH que é neutro (i.e., entre cerca de pH 7,0 e cerca de pH 8,0). Os métodos geralmente produzem um extrato de proteínas contendo proteínas que são prontamente detectáveis usando agentes capturadores para aquelas proteínas. Como tal, um extrato de proteínas produzido pelos presentes
20 métodos é geralmente adequado para uso em ensaios de ligação, e.g., ensaios imunológicos, para detecção daquelas proteínas.

Em certas modalidades os métodos incluem: a) contatar as células com um reagente extrativo compreendendo um polióxietileno-alkil-éter e um pH alto para produzir uma composição intermediária tendo um pH
25 de pelo menos cerca de pH 10,0, e b) contatar a composição intermediária com um reagente neutralizador para neutralizar dito pH da composição intermediária e produzir o extrato de proteínas. Visto que, como mencionado acima, o polióxietileno-alkil-éter pode estar presente quer no reagente extrativo quer no reagente neutralizador (ou em ambos o reagente extrativo e

o reagente neutralizador), certas modalidades dos presentes métodos incluem a) e b) contatar a composição intermediária com um reagente neutralizador compreendendo um polióxietileno-alkil-éter para neutralizar dito pH da composição intermediária e produzir o extrato de proteínas.

5 Em certas modalidades, o extrato de proteínas produzido pelos presentes métodos pode conter mais proteínas que são acessíveis aos agentes capturadores do que um extrato de proteínas preparado usando outros métodos, e.g., métodos que não utilizam: uma etapa de extração de pH alto (i.e., uma etapa que aumenta o pH para maior do que cerca de pH 10,0 ou pH 10 11,0), uma etapa de neutralização (i.e., uma etapa que ajusta o pH para de cerca de pH 6,0 a cerca de pH 9,0) e um polióxietileno-alkil-éter. Nem pH alto sozinho nem um polióxietileno-alkil-éter sozinho não produz um tal extrato de proteínas. Em modalidades particulares, o reagente extrativo de pH alto solubiliza as proteínas nas células fixadas ou não-fixadas, enquanto que o 15 polióxietileno-alkil-éter previne que as proteínas solubilizadas na composição intermediária se reagregarem ou se precipitem à medida que o pH da composição intermediária é neutralizado.

Os reagentes utilizados nos presentes métodos e no extrato de proteínas produzido pelos presentes métodos são descritos com mais detalhes 20 abaixo, que é uma descrição de como os reagentes podem ser utilizados para produzir o extrato de proteínas. Como será discutido abaixo, a concentração e o pH ótimos dos reagentes usados nos presentes métodos podem variar dependendo de quais reagentes são utilizados. Contudo, a concentração e o pH ótimos dos reagentes são prontamente determinados, quer 25 experimentalmente quer empiricamente.

As células das quais a proteína é extraída pelo uso do método da invenção

A metodologia de acordo com a presente invenção pode ser 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 tipos diferentes. A amostra de células também pode conter "contaminantes" tais como células mucosais, sanguíneas e inflamatórias que não são de interesse para o propósito de extração da proteína alvo ou não contém a proteína alvo.

- 5 Em algumas modalidades, a proteína alvo é uma proteína viral nas células infectadas com um vírus, preferivelmente um vírus patológico, e as células são preferivelmente aquelas isoladas de um mamífero, e.g., um humano.

10 O vírus patogênico pode ser qualquer vírus patogênico que causa doença ou efeitos patogênicos em humanos ou outros animais. Os vírus patogênicos podem ser várias cepas de vírus da imunodeficiência humana (HIV), tais como HIV-1 e HIV-2. O proteína viral pode ser uma glicoproteína (ou um antígeno de superfície) de HIV tal como GP120 e GP41 de HIV, ou uma proteína de capsídeo (ou proteína estrutural) tal como proteína P24 de
15 HIV.

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

20 O vírus patogênico pode ser o vírus da hepatite tais como o vírus de hepatite A, B, C, D ou E. Por exemplo, a proteína viral pode ser um antígeno de superfície ou uma proteína de núcleo de vírus da hepatite B tal como o antígeno de superfície pequeno da hepatite B (SHBsAg) (também chamado de antígeno Austrália), o antígeno médio de superfície de hepatite B (MHBsAg) e o antígeno grande de superfície de hepatite B (LHBsAg). O
25 antígeno viral pode ser um antígeno de superfície ou uma proteína de núcleo de vírus da hepatite C tais como os antígenos NS3, NS4 e NS5.

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

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

5 A proteína alvo pode ser um antígeno de tumor, tal como Her 2 de células de câncer de mama e CD20 sobre células de linfoma, um oncogene viral tal como E6 e E7 de vírus do papiloma de humano, ou um oncogene celular tal como ras mutado.

10 Em algumas modalidades, a amostra de células contém células fixadas nas quais a proteína alvo está presente. As células fixadas utilizadas nos presentes métodos são geralmente obtidas por deposição de uma amostra de células (obtida pela remoção das células de um sujeito por dissecação, esfoliação ou lavagem, por exemplo) para dentro de um meio líquido. A amostra de célula pode ser depositada em um meio líquido que já contém um fixador químico, ou um fixador químico pode ser adicionado no meio líquido
15 após as células terem sido adicionadas no meio. Um meio líquido contendo um fixador e as células fixadas está incluído aqui, juntamente com células não-fixadas, dentro do termo "amostra celular".

Fixadores químicos representativos que podem ser utilizados nos presentes métodos incluem: alcoóis (e.g., metanol ou etanol), aldeídos
20 (e.g., glutaraldeído ou formaldeído) e cetonas (e.g., acetona), bem como tetróxido de ósmio, ácido acético, ácido pícrico e sais de íon de metal pesado. Outros exemplos de fixadores que podem ser utilizados nos presentes métodos incluem fixadores baseados em bissulfito (que também podem incluir ácido acético), fixadores baseados em PVP (que também podem conter
25 propileno-glicol e metanol) bem como aqueles descritos em Patentes U.S. de N^{os} 3.546.334, 4.578.282, 4.857.300, 5.104.640, 5.256.571, 5.432.056 e 5.196.182. Exemplos de fixadores que podem ser utilizados nos presentes métodos, incluindo as concentrações de trabalho daqueles 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 "meios de transporte" e rotineiramente usados para a colheita, a preservação (i.e. fixação) e o transporte de células cervicovaginais (e.g., células cervicais esfoliadas) como parte de um exame ginecológico. FDA aprovou meios de transporte de interesse particular.

Exemplos de meios de transporte comercialmente disponíveis que podem ser utilizados incluem: meio de transporte baseado em metanol PRESERVCYT™ (que é vendido como parte do kit de amostragem ginecológica THINPREP™ da Cytyc, Inc., Marlborough, Mass.), meio de transporte baseado em etanol SUREPATH™ formalmente conhecido como CYTORICH™ (TriPath, Inc. Burlington, N.C.), e meio de transporte baseado em metanol CYTOLYT™ (Cytyc, Inc., Marlborough, Mass.) por exemplo.

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

Reagente extrativo

O reagente extrativo utilizado nos presentes métodos contém componentes que estão presentes em quantidades suficientes em concentração para produzir um extrato de proteínas tendo um pH que é pelo menos pH 10,0, sob adição do reagente extrativo nas células. Consequentemente, o reagente extrativo geralmente tem um pH de pelo menos cerca de pH 10,0.

O reagente extrativo é contatado com as células para produzir a composição intermediária. O pH do reagente extrativo e da composição intermediária é geralmente pelo menos cerca de pH 10,0, e.g., está dentro da

faixa de cerca de pH 10,0 a cerca de pH 13,0 ou cerca de pH 12,0 a cerca de pH 13,0. Em certas modalidades, o reagente extrativo pode ter um pH de cerca de pH 10,0 a cerca de pH 10,5, pH 10,5 a cerca de pH 11,0, pH 11,0 a cerca de pH 11,5, pH 11,5 a cerca de pH 12,0, pH 12,0 a cerca de pH 12,5 ou pH 12,5 a cerca de pH 13,0. Em certas modalidades preferidas, o reagente extrativo tem um pH de cerca de pH 12,5 a cerca de pH 12,9. Reagente extrativo pode ser preparado usando qualquer fonte adequada de íons hidróxido, e.g. hidróxido de sódio ou de potássio ou carbonato de cálcio, por exemplo.

10 Em certas modalidades, o reagente extrativo pode conter um tampão para manter o reagente em um pH desejado. Se um tampão estiver presente em um tal reagente extrativo, o tampão pode ter um pK_a , dentro da faixa de cerca de 9,0 a cerca de 12,5 a 25°C. Tampões exemplares que podem ser utilizados em um presente reagente extrativo de proteína incluem CABS, 15 piperidina, fosfato, CAPS, glicina ou etanol-amina, por exemplo. O reagente extrativo utilizado nos presentes métodos contém componentes que estão presentes em quantidades suficientes em concentração para produzir um extrato de proteínas tendo um pH que é pelo menos pH 10,0, sob adição do reagente extrativo nas células fixadas ou não-fixadas. Consequentemente, o 20 reagente extrativo geralmente tem um pH de pelo menos cerca de pH 10,0.

Em modalidades preferidas o reagente extrativo compreende Citrato de Trissódio e NaOH. Por exemplo, um reagente extrativo pode compreender NaOH 0,1, 0,2, 0,3,0,4, 0,5,1,0 ou 2,0N. Um reagente extrativo exemplar compreende NaOH de cerca de 0,1N, cerca de Citrato de Trissódio 25 50 mM, e um pH de 12,5 a 12,9.

Em algumas modalidades preferidas, a quantidade ou pH de reagente extrativo necessária(o) para trazer a amostra para o pH alvo, e.g. pH maior do que pH 10, será pré-determinada(o) empiricamente antes da adição do reagente extrativo. Em tais modalidades, o reagente extrativo

empiricamente determinado será adicionado na amostra celular. Em outras modalidades, após a adição do reagente extrativo, o pH da composição intermediária será medido. Após tal medição, o pH será ajustado, se necessário, para alcançar o pH alvo.

5 O reagente extrativo também pode compreender um ou mais de, ou mistura de: HEPES, Triton™X-100, NaCl, glicerol e EGTA. Um reagente extrativo exemplar pode compreender HEPES cerca de 50 mM, pH cerca de pH 7,5, Triton™X-100 cerca de 1,1%, NaCl cerca de 150 mM, glicerol cerca de 10%, e EGTA cerca de 1 mM.

10 Em certas modalidades, em adição ao ter um pH de pelo menos 10,0, o reagente extrativo também pode conter um polióxietileno-alquil-éter de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{n1}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n2}\text{OH}$. Tais polióxietileno-alquil-éteres, também conhecidos como polióxietileno-alcoóis, são comumente usados como emulsificadores, agentes umectantes, agentes de solubilização, desespumantes, detergentes e/ou lubrificantes em aplicações industriais, cosméticas, e farmacêuticas. (Veja, e.g. "The Merck Index". 13th Edition, 7659). Em certas modalidades o polióxietileno-alquil-éter é um tensoativo Brij™ tal como Brij™35 ou outro membro da família Brij™ aqui descrito.

20 Brij™35 CAS [9002-92-0] é um tensoativo não-iônico comumente usado em aplicações de Cromatografia Líquida de Desempenho Alto (HPLC) para o isolamento de complexos de membrana. É frequentemente utilizado para prevenir a ligação não específica em suportes cromatográficos. Tem um Número de Balanço Hidrofílico-Lipofílico (HLB) de 16,9, indicando que é um composto hidrofílico capaz de ser usado como um agente de solubilização, tal como a solubilização não-desnaturante de proteínas de membrana, ou como um emulsificador. (Veja, e.g. Umbreit, J.N., e Strominger, J.L. 1973. "Relation of detergent HLB number to solubilization and stabilization of D-alanine carboxypeptidase from Bacillus subtilis

25

membreanes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2997).

BrijTM35, contém um grupo laurila ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2$) e 23 unidades de etileno-oxila (OCH_2CH_2) e tem a fórmula química $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$. Outros sinônimos químicos incluem:

5 polióxietileno-lauril-éter; LAURETH-23; polióxietileno-(23)-lauril-éter $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$; Poli(óxietileno-glicol)-dodecil-éter; Óxido de Etileno de Lauril-Álcool, Lauril-Álcool Etoxilado, Lauril-álcool, etoxilado; lauril-(poli(etileno-glicol)-éter; alfa-Dodecil-ômega-hidróxi-polióxietileno; Poli(etileno-glicóis), monododecil-éter; Etoxilato de dodecanol; Dodecanol, polietoxilado;

10 Dodecil-poli(óxietileno)-éter; Lauromacrogol; Lauril-poli(óxietileno)-éter; Dodecil-álcool óxietilenado; Poli(óxido de etileno)-dodecil-éter; alfa-dodecil-ômega-hidróxi-poli(óxi-1,2-etanodiil); Poli(óxietileno)-monolauril-éter; Dodecanol polietoxilado; Poli(etileno-glicol)-dodecil-éter; Poli(etileno-glicol)-lauril-éter; Polióxietileno-dodecanol; Polióxietileno-álcool láurico; e

15 Polióxietileno-lauril-álcool; 3,6,9,12,15,18,21,24,27-Nonaoxanonatriacontan-1-ol; Dodecil-álcool, etoxilado; Laureth4 [USAN]; Laureth 9 [USAN]; Laureth-11; Lauromacrogol 400 [INN]; PEG-11 Lauril-éter; Polidocanol, 40L (poliéter); Actinol L 7; Actinol L3; Adeka Carpol M 2; Adeka Carpol MBF 100; Adekatol LA 1275; Aethoxysklerol; Akyporox RLM 160; Akyporox

20 RLM 22; Akyporox RLM 230; Akyporox RLM 40; Aldosperse L 9; Alkasurf LAN 1; Alkasurf LAN 3; Arapol 0712; Atlas G 2133; Atlas G 3705; Atlas G 3707; Atlas G 4829; Atlas G-2133; Atlas G-3705; B 205; BASE LP 12; BL 9; BL 9 (poliglicol); Base LP 12; BrijTM22; BrijTM 23; BrijTM 30; BrijTM 30ICI; BrijTM 30SP; BrijTM 35; BrijTM 35L; BrijTM36T; CCRIS 3397; Calgene 40L;

25 Carsonol L 2; Carsonol L 3; Chemal LA 23; Chimipal AE 3; Cimagel; Conion 275-100; Conion 275-20; Conion 275-30; Conion 275-80; Conion 2P80; Dodecil-álcool-polióxietileno-éter; Du Pont WK; Ethosperse LA 12; Ethosperse LA 23; G 3707; Glicóis, polietileno-monododecil-éter; HSDB 4351; Hidróxi-polietóxi-dodecano; LA (Alcohol); LA 7; Laureth; Laureth 9;

Lipal 4LA; Lubrol 12A9; LubrolPX; Marlipal 1217; Mergital LM 11; NCI-C54875; Newcol 1203; Nikkol BL; Noigen ET 160; Noigen ET 170; Noigen YX 500; Noniolite AL 20; Pegnol L 12; Poli(óxi-1,2-etanodiil), alfa-dodecil-
 5 ômega-hidróxi-; Poli(etileno-glicol)-monododecil-éter; Poli(etileno-glicol)-monododecil-éter, o nome seguindo por a; número (400) correspondendo aproximadamente à massa molecular média, da porção de poli(etileno-glicol); Poli(etileno-glicol)-monolauril-éter; Polióxietileno-lauril-éter; Rokanol L; Romopal LN; Simulsol P 23; Simulsol P 4; Siponic L; Slovasol S; Standamul LA 2; Stmer 135; Surfactant WK; Texofor B 9; Thesat; Thesit; alfa-Dodecil-
 10 ômega-hidróxi-poli(óxi-1,2-etanodiil); ou alfa-Dodecil-ômega-hidróxi-poli(óxietileno).

Outros polióxietileno-alquil-éteres Brij incluem: Brij 30 polióxietileno-(4)-lauril-éter $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 4$); Brij™ 52, polióxietileno-(2)-cetil-éter $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 2$); Brij™ 56
 15 polióxietileno-(10)-cetil-éter $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 10$); Brij™ 58, polióxietileno-(20)-cetil-éter $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 20$); Brij™ 72 polióxietileno-(2)-estearil-éter, $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 2$); Brij™ 76, polióxietileno-(10)-estearil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 10$); Brij™ 78 polióxietileno-(20)-estearil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 20$); Brij™ 92,
 20 polióxietileno-(2)-oleil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 2$); Brij™ 93, polióxietileno-(2)-oleil-éter; $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 2$); Brij™ 97, polióxietileno-(10)-oleil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 10$); Brij™ 98, polióxietileno-(20)-oleil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 20$); Brij™ 700, Polióxietileno(100)-estearil-éter, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 100$; e Brij™ 721,
 25 Polióxietileno-(21)-estearil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n \sim 21$).

O polióxietileno-alquil-éter, se presente, pode estar presente em uma concentração que não significativamente decresce a sensibilidade de ensaios futuros. A concentração de polióxietileno-alquil-éter pode, em certas modalidades, ser decrescida durante o processamento da amostra, e.g., por

diluição do polióxietileno-alquil-éter usando tampão neutralizador ou pela adição de um diluente, e.g., tampão ou água no extrato de proteínas antes do uso.

Dependendo da concentração do polióxietileno-alquil-éter usado e do pH do tampão de extração, o polióxietileno-alquil-éter pode estar presente no tampão de extração em uma concentração (v/v) de cerca de 0,05% a cerca de 0,1%, de cerca de 0,1% to 0,5%, de cerca de 0,5% a cerca de 1%, de cerca de 1% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 10%, ou de cerca de 10% a cerca de 20%.

Em uma modalidade preferida, um polióxietileno-alquil-éter, e.g. BrijTM35, está presente no reagente extrativo em uma concentração (v/v) de cerca de 2% a cerca de 10%. Em outras modalidades, dito polióxietileno-alquil-éter está presente no reagente neutralizador. Em ainda outras modalidades, dito polióxietileno-alquil-éter está presente em ambos os reagentes extrativo e neutralizador.

Em outras modalidades preferidas, o reagente extrativo e/ou reagente neutralizador compreende detergentes não-iônicos em adição ao polióxietileno-alquil-éter. Os detergentes não-iônicos poderiam quer estar presentes no reagente extrativo ou no reagente neutralizador, quer em ambos o reagente extrativo e o reagente neutralizador. Em certas modalidades, o detergente não-iônico utilizado pode ser nonidet P-40, n-octil-glicosídeo, um detergente TRITONTM tal como TRITONTM X-100, octil- β -tio-glucopiranosídeo, um detergente TWEENTM 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 em uma concentração de cerca de 0,01 M a cerca de 0,05 M, cerca de 0,05M a cerca de 0,1 M, 0,1 M a cerca de 0,2 M, cerca de 0,2 M a cerca de 0,5 M, cerca de 0,5 M a cerca de 1,0 M, cerca de 1,0 M a cerca de 2,0 M, cerca de 2,0 M a cerca de 4,0 M, ou cerca de 4,0 M a cerca de 8,0 M. O detergente pode estar

presente no tampão de extração em uma concentração de cerca de 0,1%-20%, preferivelmente 0,5%-10%, 1%-6% ou 2%-5%. Outros detergentes que podem ser utilizados nos presentes métodos são listados em colunas 7 e 8 de Patente U.S. 6.488.671, cuja patente é aqui incorporada em sua totalidade como referência.

Detergentes exemplares e suas concentrações em um presente reagente neutralizador e/ou extrativo incluem: Triton X-100: cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g., cerca de 1%, NP40: cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g., cerca de 1% e Tween-20: cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g., cerca de 1%, peso/volume.

Em modalidades preferidas, o reagente extrativo e/ou o reagente neutralizador compreende um polióxietileno-alkil-éter em combinação com outros detergentes não-iônicos. O polióxietileno-alkil-éter pode ser um tensoativo Brij™ e pode estar combinado com um ou ambos de detergente Tween™ ou detergente Triton™. Em certas modalidades preferidas, o tensoativo Brij™ é Brij™35 em combinação com um ou mais dos seguintes detergentes não-iônicos: Tween™ -20, cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g. cerca de 2%; ou Triton™ X-100, cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g. cerca de 2%.

Em certas modalidades, o reagente extrativo pode não conter quantidade significativa de desnaturante. Contudo, em outras modalidades, em adição ao ter um pH de pelo menos 10,0 e um polióxietileno-alkil-éter tal como Brij™35, o reagente extrativo também pode conter um desnaturante, e.g., um detergente iônico tal como dodecil-sulfato de sódio (SDS) ou sarcosil, ou um agente caotrópico tal como uréia. Nestas modalidades, o desnaturante, se presente, pode estar presente em uma concentração que não significativamente decresce a sensibilidade dos futuros ensaios. A concentração de desnaturante, pode, em certas modalidades, ser decrescida durante o processamento da amostra, e.g., por diluição do desnaturante

usando tampão de neutralização ou pela adição de um diluente, e.g., tampão ou água no extrato de proteínas antes do uso. O desnaturante também pode estar presente sozinho, na ausência de polióxietileno-alquil-éter.

Dependendo da concentração de desnaturante utilizada e do pH do tampão de extração, o desnaturante pode estar presente no tampão de extração em uma concentração de cerca de 0,01 M a cerca de 0,05 M, cerca de 0,05M a cerca de 0,1 M, 0,1 M a cerca de 0,2 M, cerca de 0,2 M a cerca de 0,5 M, cerca de 0,5 M a cerca de 1,0 M, cerca de 1,0 M a cerca de 2,0 M, cerca de 2,0 M a cerca de 4,0 M, ou cerca de 4,0 M a cerca de 8,0 M.

Desnaturante, se presente no reagente extrativo, pode estar presente em uma concentração que está bem abaixo da concentração do desnaturante tipicamente utilizada para desnaturar a proteína. Em outras palavras, o reagente extrativo pode conter desnaturante em uma concentração que permite a detecção de uma proteína usando um agente capturador para aquela proteína, após produzir um extrato de proteínas de acordo com os presentes métodos. A concentração de desnaturante utilizada é geralmente suficiente para produzir um extrato de proteínas contendo proteínas que são prontamente detectáveis em um ensaio de ligação que utiliza um agente capturador, e.g., em um ensaio de detecção de anticorpo.

Desnaturantes exemplares e suas concentrações em um presente reagente extrativo são: dodecil-sulfato de sódio (SDS): cerca de 0,01% a cerca de 2%, e.g., 0,05%, sarkosyl: cerca de 0,01% a cerca de 5%, e.g., 0,5%, guanidina: cerca de 0,1 M a cerca de 6 M, e.g., cerca de 0,5 M e uréia: cerca de 0,1 M a cerca de 8 M, e.g., cerca de 0,5 M, peso/volume.

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% w/v, uréia é tipicamente utilizada para desnaturar proteínas em uma concentração de 2 M a 8 M, cloridrato de guanidina é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em

uma concentração de 3 M a 8 M, cloridrato de N-cetil-trimetil-amônio é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 5% w/v, e N-octil-glicosídeo é tipicamente utilizado para desnaturar proteínas em uma concentração de 2%, w/v (Veja "Protein purification Handbook", Amersham Pharmacia Biotech, p,71 (1999)).

O presente reagente extrator de proteína pode conter outros componentes e.g., agentes quelantes de íon de sal, inibidores de protease, etc., em adição aos componentes acima citados.

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

Desnaturantes que podem ser utilizado no presente tampão de extração são geralmente desnaturantes fortes e podem incluir mas não são limitados a: agentes caotrópicos (e.g., uréia, cloridrato de guanidina, ou um sal de tiocianato tal como tiocianato de sódio ou tiocianato de guanidínio, iodeto de sódio, perclorato de sódio e semelhantes; veja K. Hamaguchi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 62: 1129-1136, 1962) e detergentes iônicos (e.g., dodecil-sulfato de sódio (SDS), sarcosyl ou cloridrato de N-cetil-trimetil-amônio), incluindo detergentes catiônicos, aniônicos e zwitteriônicos (tais como CHAPS ou CHAPSO). Outros desnaturantes que podem ser utilizados nos presentes métodos estão listados em colunas 7 e 8 de Patente U.S. 6.488.671, cuja patente é aqui incorporada em sua totalidade como referência.

Em certas modalidades, 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 proteínas em adição a um desnaturante listado nos parágrafos prévios.

Como observado acima, o reagente extrativo é contatado com (e.g., combinado ou misturado com) células fixadas ou não-fixadas. Em certas

modalidades, uma amostra celular contendo células (e.g., um meio de transporte contendo célula fixadas) pode ser diretamente adicionada no reagente extrativo. Em outras modalidades, as células podem ser isoladas de uma amostra celular (e.g., por métodos de sedimentação, centrifugação, 5 filtração ou de afinidade), antes de sua adição no reagente extrativo de proteína. Células podem ser lavadas ou contatadas com outros reagentes antes de sua adição no reagente extrativo.

Todas ou uma porção das células fixadas ou não-fixadas disponíveis pode(m) ser combinada(s) com o reagente extrativo. Por exemplo, 10 em certas modalidades, uma porção das células pode ser utilizada em um teste de citologia e uma porção das células pode ser contatada com o reagente extrativo para produzir a composição intermediária. As células e o reagente extrativo podem ser combinados e incubados ou mantidos em uma temperatura adequada (e.g., sobre gelo, a cerca de a temperatura ambiente ou 15 a cerca de 37°C) e por um tempo adequado (e.g., de 10 segundos a 24 h) para produzir a composição intermediária. Por exemplo, as células e o reagente extrativo podem ser combinados por pelo menos 1,2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 minutos ou 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 horas. Como outro exemplo, as células e o reagente extrativo podem ser combinados por entre 5 minutos e 10 horas ou 20 10 minutos e 1 hora ou 10-30 minutos. Em certas modalidades, o reagente neutralizador é contatado com a composição intermediária imediatamente após as células terem sido contatadas com o reagente extrativo. As células e o reagente neutralizador podem ser combinados e incubados ou mantidos sob uma temperatura adequada (e.g., sobre gelo, a cerca da temperatura ambiente 25 ou a cerca de 37°C) e por um tempo adequado (e.g., de 10 segundos a 24 h) para produzir a composição intermediária. Por exemplo, as células e o reagente neutralizador podem ser combinados por pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 minutos ou 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 horas. Como outro exemplo, as células e o reagente neutralizador podem ser combinados por entre 5 minutos e 10

horas ou 10 minutos e 1 hora ou 10-30 minutos.

Reagente neutralizador

O reagente neutralizador utilizado nos presentes métodos tem um pH que é suficiente para neutralizar o pH da composição intermediária discutida acima, sob contato com a composição intermediária. Em outras palavras, o reagente neutralizador tem um pH que é suficiente para neutralizar o pH da composição intermediária discutida acima quando o reagente neutralizador é misturado com a composição intermediária. Como será descrito com mais detalhes abaixo, o reagente neutralizador pode, em certas modalidades, conter um polióxietileno-alquil-éter ou outro detergente não-iônico ou uma mistura de detergentes.

O pH do reagente neutralizador é suficiente para neutralizar a composição intermediária preparada pelo contato das células fixadas ou não-fixadas com um presente reagente extrativo. Dependendo do pH do reagente extrativo e se tampões são empregados, o pH do reagente neutralizador pode estar entre pH 4,0 e pH 8,0. Em certas modalidades, o reagente neutralizador pode ter um pH de cerca de pH 4,0 a cerca de pH 4,5, pH 4,5 a cerca de pH 5,0, pH 5,0 a cerca de pH 5,5, pH 5,5 a cerca de pH 6,0, pH 6,0 a cerca de pH 6,5, pH 6,5 a cerca de pH 7,0 ou pH 7,0 a cerca de pH 7,5. Reagente neutralizador pode ser preparado usando qualquer fonte adequada de íons hidrogênio, e.g., ácido clorídrico ou ácido acético, por exemplo. Em certas modalidades, o reagente neutralizador pode ter um pH de menor do que pH 4,0.

O reagente neutralizador pode estar tamponado ou não tamponado. Se o reagente neutralizador está tamponado, então o reagente neutralizador pode estar tamponado usando qualquer tampão tendo um pK_a de cerca de 6 a cerca de 8, e.g., tris, hepes ou tricina, por exemplo. Em certas modalidades preferidas, o reagente neutralizador compreende Tris-HCl 2 M, pH cerca de pH 6,0. Em outras modalidades preferidas, o reagente

neutralizador compreende Tris-HCl 0,9 M, pH cerca de pH 7,8.

Em algumas modalidades preferidas, a quantidade ou o pH do reagente neutralizador necessário para trazer a amostra para o pH alvo, e.g. pH de cerca de pH 6,0 a 9,0, ou pH 7,0 a 8,5 ou pH 7,5 a 8,5 ou pH 8,0 a 8,5, é predeterminada(o) empiricamente antes da adição do reagente neutralizador. Em tais modalidades, o reagente neutralizador empiricamente determinado é adicionado na amostra celular. Em outras modalidades, após a adição do reagente neutralizador, o pH da amostra neutralizada é medido. Após tal etapa de medição, o pH é ajustado, se necessário, para alcançar o pH neutro alvo.

Em outras modalidades o reagente neutralizador compreende um ou mais de ou umas mistura de: HEPES, TritonTMX-100, NaCl, glicerol e EGTA. Um reagente neutralizador exemplar compreende HEPES cerca de 50 mM, pH cerca de pH 7,5, TritonTMX-100 cerca de 1,1%, NaCl cerca de 150 mM, glicerol cerca de 10%, e EGTA cerca de 1 mM. Outro tampão de neutralização exemplar compreende: Tris cerca de 20 mM, pH 8, BSA cerca de 2%, TritonTMX-100 cerca de 1%, TweenTM-20 cerca de 2%, Sarcosina cerca de 0,2%, NaCl de cerca de 250 mM, e EDTA (ou EGTA) cerca de 50 mM.

Como observado acima, qualquer um de o reagente extrativo e/ou o reagente neutralizador pode conter um tensoativo ou detergente não-iônico incluindo, mas não limitado a, um polióxietileno-alquil-éter de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$. Polióxietileno-alquil-éteres exemplares são tensoativos BrijTM incluindo um ou mais de: BrijTM 35, polióxietileno-(23)-lauril-éter ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n\sim 23$); BrijTM 30 polióxietileno-(4)-lauril-éter ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n\sim 4$); BrijTM 52, polióxietileno-(2)-cetil-éter ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n\sim 2$); BrijTM 56 polióxietileno-(10)-cetil-éter ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n\sim 10$); BrijTM 58, polióxietileno-(20)-cetil-éter ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n\sim 20$); BrijTM 72 polióxietileno-(2)-estearil-éter, ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $n\sim 2$); BrijTM 76,

polióxietileno-(10)-estearil-éter ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 10$); Brij™ 78
 polióxietileno-(20)-estearil-éter ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 20$); Brij™ 92,
 polióxietileno-(2)-oleil-éter ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 2$); Brij™ 93,
 polióxietileno-(2)-oleil-éter; ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 2$); Brij™ 97,
 5 polióxietileno-(10)-oleil-éter ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 10$); Brij™ 98,
 polióxietileno-(20)-oleil-éter ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 20$); Brij™ 700,
 Polióxietileno(100)-estearil-éter, $C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 100$; ou Brij™
 721, Polióxietileno-(21)-estearil-éter ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 21$).

Dependendo da concentração do polióxietileno-alquil-éter
 10 usado e do pH do tampão de extração, o polióxietileno-alquil-éter pode estar
 presente no tampão de extração em uma concentração (v/v) de cerca de 0,05%
 a cerca de 0,1%, de cerca de 0,1% a 0,5%, de cerca de 0,5% a cerca de 1%, de
 cerca de 1% a cerca de 5%, de cerca de 5% a cerca de 10%, ou de cerca de
 10% a cerca de 20%.

15 Em certas modalidades, o detergente não-iônico utilizado pode
 ser nonidet P-40, n-octil-glicosídeo, 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 em uma
 20 concentração de cerca de 0,01 M a cerca de 0,05 M, cerca de 0,05M a cerca
 de 0,1 M, 0,1 M a cerca de 0,2 M, cerca de 0,2 M a cerca de 0,5 M, cerca de
 0,5 M a cerca de 1,0 M, cerca de 1,0 M a cerca de 2,0 M, cerca de 2,0 M a
 cerca de 4,0 M, ou cerca de 4,0 M a cerca de 8,0 M. Outros detergentes que
 podem ser utilizados nos presentes métodos são listados em colunas 7 e 8 de
 25 Patente U.S. 6.488.671, cuja patente é aqui incorporada em sua totalidade
 como referência. Em certas modalidades, o detergente pode estar presente em
 ambos o tampão de extração e o tampão de neutralização.

Detergentes exemplares e suas concentrações em um presente
 reagente neutralizador e/ou reagente extrativo incluem: Triton X-100: cerca

de 0,1% a cerca de 10%, e.g., cerca de 1%, NP40: cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g., cerca de 1% e Tween-20: cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g., cerca de 1%, peso/volume.

5 Como observado acima, o polióxietileno-alquil-éter ou outro detergente não-iônico poderia estar presente sozinho, em combinação, ou não presente no reagente neutralizador. O polióxietileno-alquil-éter pode ser um tensoativo Brij™ e pode estar combinado com um de ou ambos o detergente Tween™ ou o detergente Triton™. Em certas modalidades preferidas, o tensoativo Brij™ é Brij™35 em combinação com um ou mais dos seguintes
10 detergentes não-iônicos: Tween™ -20, cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g. cerca de 2%; ou Triton™ X-100, cerca de 0,1% a cerca de 10%, e.g. cerca de 2%.

Como observado acima, o reagente neutralizador é contatado com (e.g., combinado ou misturado com) a composição intermediária para
15 produzir um extrato de proteínas tendo um pH neutro (i.e., um pH dentro da faixa de cerca de pH 6,5 a cerca de pH 8,0, e.g., dentro da faixa de cerca de pH 7,0 e cerca de pH 7,8). O extrato de proteínas adicionalmente contém proteína de células fixadas ou não-fixadas, um polióxietileno-alquil-éter em uma concentração listada acima, e em certas modalidades, um tampão para
20 manter o extrato de proteínas em uma faixa de pH particular e/ou detergente não-iônico adicional. Se um desnaturante é adicionado nas células fixadas ou não-fixadas, o extrato de proteínas pode adicionalmente conter aquele desnaturante. O pH, escolha do detergente e da concentração do detergente utilizado (e, se um desnaturante é utilizado, a identidade e a concentração do
25 desnaturante) são suficientes para permitir que o extrato de proteínas seja diretamente utilizado em um ensaio de ligação para detectar proteínas no extrato de proteínas.

Neutralização do extrato de células também pode ser realizada pela passagem do extrato através de um filtro ou de uma extremidade de filtro

que está impregnado(a) com reagente neutralizador. À medida que o extrato passa através do material do filtro, o reagente neutralizador é solubilizado e o pH do extrato se aproxima da neutralidade.

Um método alternativo para neutralizar o extrato de células é passar o extrato através de uma coluna Bio Spin (BioRad) pré-equilibrada com uma solução de pH neutro. O extrato também pode ser posto dentro de uma seringa ou aparelho similar que contém gel (ou material filtrante) contendo neutralizador e liberado da seringa por pressão positiva.

Em certas modalidades, o presente extrato de proteínas contém proteína E6 de HPV (particularmente proteína E6 de cepas oncogênicas de HPV) que é acessível e prontamente detectável por um agente capturador sem tratamento adicional do extrato de proteínas (e.g., sem adição extra de desnaturante, mudanças de pH ou aquecimento). O extrato de proteínas também pode conter membranas solubilizadas ou insolúveis, proteínas diferentes de proteína E6 de HPV, e outros conteúdos celulares tais como DNA, RNA, carboidratos, etc. Outros contaminantes tais como aqueles derivados de contaminação mucosal da amostra celular original também podem estar presentes. Os componentes do extrato de proteínas geralmente não contêm células inteiras (i.e., citologicamente intactas).

O extrato de proteínas pode ser usado imediatamente, ou armazenado, e.g., em forma congelada, antes do uso.

Em modalidades particulares, os extratos de proteínas produzidos pelos métodos descritos acima podem ser utilizados em métodos de detecção de proteínas, cujos métodos são descritos com mais detalhe abaixo.

Como seria evidente do discutido acima, uma variedade de desnaturantes, detergentes, tampões, pHs e concentrações de componente diferentes pode ser utilizada nos reagentes descritos acima. O ótimo desnaturante, detergente, tampão, pH, ou concentração de componente em

qualquer reagente é prontamente determinado usando métodos de rotina.

Após neutralização do extrato celular, a proteína E6 pode ser concentrada do extrato celular por incubação do extrato com partículas contendo aglutinante para a E6. O aglutinante pode compreender PDZ, Proteína Associada à E6 (E6AP) ou seus fragmentos, ou Proteína Ligante de E6 (E6BP) ou seus fragmentos. Após E6 ser capturada pelas partículas, as partículas são lavadas e E6 é então liberada das partículas por incubação com tampão em pH maiores do que 10. As partículas são separadas da solução eluindo e a solução restante é então neutralizada por procedimentos previamente descritos. Alternativamente, a proteína E6 pode ser detectada sem liberação das partículas de captura.

Outros detergentes que podem ser utilizados nos presentes métodos estão listados nas colunas 7 e 8 de Patente U.S. 6.488.671, cuja patente é aqui incorporada em sua totalidade como referência. Em certas modalidades, o detergente pode estar presente em ambos os tampões de neutralização e de extração.

Em ainda outras modalidades, a amostra pode ser diluída após a etapa de neutralização. Um diluente exemplar pode incluir: HEPES cerca de 50 mM, pH cerca de pH 7,5, Triton™X-100 cerca de 1,1%, NaCl cerca de 150 mM, glicerol cerca de 10%, e EGTA cerca de 1 mM. Outro diluente exemplar pode incluir: Tris cerca de 50 mM, pH 8,2, BSA cerca de 2%, Triton™X-100 cerca de 2%, Sarcosina cerca de 0,1%, NaCl cerca de 150 mM, e EDTA (ou EGTA) cerca de 50 mM.

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

O extrato de proteínas preparado pelos métodos discutidos acima pode ser utilizado direta ou indiretamente (i.e., após adição de outros reagentes) em um método no qual é avaliada a presença de uma ou mais proteínas no extrato de proteínas. Os métodos de detecção de proteína geralmente envolvem um agente capturador que especificamente se liga em

uma proteína. A identidade das proteínas a serem detectadas pode ser conhecida (i.e., pré-determinada) ou identidade desconhecida no momento da realização do método.

Proteínas que podem ser detectadas usando os presentes métodos de detecção de proteínas incluem proteínas que são marcadores diagnósticos de uma doença ou condição, e.g., câncer, doença inflamatória, ou infecção por vírus, bactérias ou fungo, por exemplo. Em certas modalidades, uma proteína detectada usando os presentes métodos não é rotineiramente detectável a não ser que os presentes métodos de extração de proteínas sejam utilizados.

Proteínas exemplares que podem ser detectadas usando os presentes métodos incluem proteínas que são codificadas por um agente infeccioso, tal como o vírus do papiloma humano (HPV). Em modalidades particulares, os presentes métodos podem ser utilizados para detectar a proteína de HPV, uma proteína que tem se mostrado difícil ou impossível de ser detectada em extratos de proteínas preparados de célula fixadas por outros métodos.

Em termos gerais, os métodos de detecção de proteínas são muito bem conhecidos na arte e incluem ensaios de ligação, i.e., ensaios nos quais é detectada a ligação entre uma proteína e um agente capturador. Tais ensaios incluem imunoenaios, i.e., ensaios de ligação que utilizam um anticorpo que especificamente se liga em uma proteína, incluindo, mas não limitado a, sistemas de ensaio competitivo e não-competitivo usando técnicas tais como western blots, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunossorvente ligado à enzima), imunoenaios de "sanduíche", imunoenaios enzimáticos, citometria com esferas ordenadas (*cytometric bead array*, CBA), ensaios multiplexados baseados em esferas (*multiplexed bead assays*), western blot, ensaios de imuno-histoquímica, ensaios de imunoprecipitação, reações de precipitina em difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de

aglutinação, ensaios de fixação-complemento, ensaios imunorradiométricos, imunoensaios fluorescentes, e imunoensaios de proteína A, para nomear apenas uns poucos. Tais ensaios são rotineiros e são bem conhecidos na arte (veja, e.g., Ausubel *et al.*, eds, 1994, "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que é aqui incorporado como referência em sua totalidade). Imunoensaios exemplares são descritos resumidamente abaixo. Captura e liberação usando peptídeos E6 BP ou AP, anticorpos específicos, ou proteínas de domínio PDZ poderia ser usada como um método de pós-extração, pré-ensaio para concentração de E6 de HPV. Alternativamente, um formato de anticorpo monoclonal dual poderia ser utilizado.

Protocolos de imunoprecipitação geralmente envolvem a produção de um extrato de proteínas, adução de um agente capturador, e.g., um anticorpo, no extrato de proteínas e incubação do extrato de proteínas e agente capturador por um período de tempo adequado e em uma temperatura apropriada. O agente capturador é então ligado em um suporte sólido, e.g., um substrato de afinidade tal como esferas ligadas em proteína A e/ou proteína G, e a mistura é incubada e lavada. O suporte sólido é ressuspensionado em tampão de amostra e a proteína de interesse pode ser detectada por western blotting, por exemplo.

ELISAs podem envolver a preparação de um extrato de proteínas, a ligação do extrato de proteínas em um suporte sólido (e.g., uma placa de microtítulo de multicavidades), o contato do extrato de proteínas ligado em suporte com um agente capturador, e.g., um anticorpo, e a detecção da ligação entre o agente capturador e a proteína. Em certos métodos de ELISA, o agente capturador pode ser detectavelmente marcado com um grupo detectável tal como um substrato enzimático (e.g., peroxidase de rábano ou fosfatase alcalina) antes do contato do agente capturador com o extrato de proteínas ligado em suporte. Em outras modalidades, contudo, ligação do

agente capturador no extrato de proteínas pode ser detectada por um segundo agente capturador detectável (e.g., um segundo anticorpo) que se liga no agente capturador contatado com o extrato de proteínas.

Em outros ensaios ELISA, o agente capturador pode ser ligado em um suporte sólido, e o extrato de proteínas é contatado com o agente capturador ligado no suporte sólido. Ligação de uma proteína no extrato de proteínas no anticorpo do suporte sólido pode ser detectada usando um segundo agente capturador para tal proteína. Tais ensaios de "sanduíche" são bem conhecidos na arte.

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

Em particular, os presentes métodos podem ser utilizados para detectar a proteína E6 de cepas oncogênicas de HPV. Nestas modalidades, o agente capturador utilizado no método de detecção pode ser, por exemplo, um anticorpo ou um polipeptídeo compreendendo um domínio PDZ que se liga em um ligante de PDZ (i.e., um sítio de ligação para um domínio PDZ) contido na proteína E6. Por exemplo, o presente método de ligação para detecção de E6 pode utilizar uma proteína contendo um domínio PDZ que contém o segundo PDZ de MAGI-1, ou o domínio PDZ de DLG ou TIP1, etc., como descrito em Pedido Publicado US 20040018487 (publicados aos 29 de janeiro de 2004) e aqui incorporado como referência em sua totalidade. Proteínas contendo domínio PDZ exemplares e sequências de domínio PDZ exemplares são mostradas em TABELA 2 e EXEMPLO 4 do pedido US 20040018487. O termo "domínio PDZ" também inclui variantes (e.g., variantes naturalmente ocorrentes; das sequências (e.g., variantes polimórficas, variantes com substituições conservativas, e semelhantes) e domínios de espécies alternativas (e.g. camundongo, rato). Tipicamente, domínios PDZ são substancialmente idênticos àqueles mostrados em Pedido

de Patente U.S. de N° serial 09/724.553 que é aqui incorporado como referência, e.g., 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 correspondência máxima. É reconhecido na arte

5 que domínios PDZ podem ser mutados para darem mudanças de aminoácido que podem reforçar ou enfraquecer a ligação e alterar a especificidade, ainda eles permaneçam domínios PDZ (Schneider *et al.*, 1998, *Nat. Biotech.* 17:170-5). Salvo indicação em contrário, uma referência a um domínio PDZ particular PDZ (e.g. um domínio 2 de MAGI-1) é intencionada para incluir o

10 domínio PDZ particular e suas variantes de ligação de E6 de HPV. Em outras palavras, se uma referência é feita a um domínio PDZ particular, uma referência também será feita às variantes daquele domínio PDZ que se ligam em proteína E6 oncogênica de HPV, como descrito abaixo. Neste sentido, é observado que a numeração dos domínios PDZ em uma proteína pode mudar.

15 Por exemplo, o domínio 2 de MAGI-1 (de sequência de aminoácidos PSELKGKFIHTKLRKSSRGFGFTVVGGEDEFLQIKSLVL DGPAALDGKMETGDVI VSVNDTCVLGHHAQWKIFQSIPIGASVDLELCRGYPLPFDPPDPN),

20 como aqui chamado, pode ser chamado de domínio 1 de MAGI-1 em outra literatura. Como tal, quando um domínio PDZ particular de uma proteína é referido neste pedido, esta referência deve ser entendida à vista da sequência daquele domínio, como aqui descrita, particularmente na Tabela 2 de lista de sequências de Pedido US 20040018487, que mostra a relação entre as sequências de lista de sequências e os nomes e os números de acesso no

25 Genbank para vários domínios, onde apropriado. Como aqui usado, o termo "proteína PDZ" refere-se a uma proteína naturalmente ocorrente contendo um domínio PDZ. Proteínas PDZ exemplares incluem CASK, MPP1, DLG1, DLG2, PSD95, NeDLG, TIP-33, SYNL1, TIP-43, LDP, LIM, LIMK1, LIMK2, MPP2, NOS1, AF6, PTN-4, prIL16, 41,8kD, KIAA0559, RGS12,

KIAA0316, DVL1, TIP-40, TIAM1, MINT1, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3, KIAA0303, CBP, MINT3, TIP-2, KIAA0561, e TIP-1. Como aqui usado, o termo "polipeptídeo de domínio PDZ" refere-se a um polipeptídeo contendo um domínio PDZ, tal como uma proteína de fusão incluindo uma sequência de domínio PDZ, uma proteína PDZ naturalmente ocorrente, ou um peptídeo de domínio PDZ isolado. Um polipeptídeo de domínio PDZ pode ser portanto cerca de 60 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 70 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 80 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 90 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 100 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 200 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 300 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 500 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 800 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 1.000 aminoácidos ou mais em comprimento, costumeiramente até cerca de 2.000 aminoácidos ou mais em comprimento, cerca de 50-2000 aminoácidos em comprimento, cerca de 50-1500 aminoácidos em comprimento, cerca de 50-1000 aminoácidos em comprimento, cerca de 60-1000 aminoácidos em comprimento, cerca de 70-1000 aminoácidos em comprimento. Peptídeos de domínio PDZ são costumeiramente não maiores do que cerca de 200 aminoácidos (e.g. 50-200 aminoácidos, 60-180 aminoácidos, 80-120 aminoácidos, ou 90-110 aminoácidos), e codificam um domínio PDZ.

Anticorpos adequados para detectar a proteína E6 de HPV são descritos em 20050142541 [sic] (publicada aos 30 de Junho de 2005), por exemplo. Métodos detalhados para identificar a proteína E6 de cepas oncogênicas de HPV são encontrados em Pedido Publicado de Patente U.S. de N° US20040018487, cujos métodos são aqui incorporados em sua totalidade. Estes métodos publicados são prontamente adaptados para utilização nos presentes métodos .

Em certas modalidades, um anticorpo anti-E6 pode ser ligado

em um suporte sólido, e um extrato de proteínas produzido pelos presentes métodos é contatado com o anticorpo ligado no suporte sólido. Tais suportes sólidos são bem conhecidos na arte e podem incluir mas não são limitados a: partículas de ouro coloidal, partículas quimioluminescentes, partículas de látex secas, ou partículas para SERS Raman, e.g. núcleos de prata ou de ouro revestidos com sílica com corantes repórter. Em certas modalidades, um anticorpo anti-E6 pode estar conjugado em um marcador fluorescente.

Ligação da proteína E6 oncogênica no extrato de proteínas pode ser detectada usando uma proteína contendo o domínio PDZ. Em outras modalidades, uma proteína contendo o domínio PDZ pode estar ligada em um suporte sólido, e um extrato de proteínas produzido pelos presentes métodos é contatado com a proteína contendo o domínio PDZ ligada no suporte sólido. Ligação de proteína E6 oncogênica no extrato de proteínas pode ser detectada usando um anticorpo anti-E6. Em métodos alternativos, ligação entre o anticorpo anti-proteína contendo o domínio PDZ pode ocorrer em solução (i.e., na ausência de ligação de quer o anticorpo quer a proteína contendo o domínio PDZ em um suporte sólido), e, após a ligação, o anticorpo ou a proteína contendo o domínio PDZ pode ser ligado(a) em um suporte sólido (e.g., esferas ou semelhantes como aquelas descritas acima). Nestas modalidades, a proteína contendo o domínio PDZ pode ser uma proteína de fusão tendo um domínio de afinidade que se liga no suporte sólido. A presença da proteína E6 pode ser detectada usando um segundo agente capturador que reconhece a proteína E6.

Em modalidades preferidas, ensaios de fluxo lateral (LF), ensaios imunocromatográficos, testes de bastões de imersão, ou imunoensaios de fluxo-através são utilizados para detectar a proteína E6 capturada. Em modalidades preferidas, uma tira de fluxo lateral (LF) compreendendo uma "zona de captura" e proteínas contendo o domínio PDZ são adicionados em um frasco ou uma cavidade contendo a amostra extraída, na qual tem sido

adicionado um segundo agente capturador tal como anticorpos monoclonais (mAb) anti-E6 de HPV conjugados em partículas de ouro. As partículas de ouro e a amostra são então permitidas migrarem para cima via ação capilar. Uma almofada absorvente pode ser ligada na extremidade distal para facilitar o fluxo do líquido subindo pela tira. Durante a migração da amostra subindo pela tira, as proteínas contendo o domínio PDZ na zona de captura podem se ligar na proteína E6. Se ligação dos mAb's conjugados em ouro ocorreu em solução, o conjugado de ouro - anticorpo anti-E6 poderia se ligar na proteína contendo o domínio PDZ. Alternativamente, a proteína E6 poderia se ligar na proteína contendo o domínio PDZ seguido pela captura do conjugado de ouro - E6. Sob qualquer cenário, captura bem sucedida pode resultar na formação de uma linha visível e detectável sobre a tira de LF.

Em modalidades preferidas, uma citometria com esferas ordenadas (*cytometric bead array*, CBA) é utilizada para auxiliar na detecção da proteína E6 captura. Uma CBA, também conhecida como um ensaio multiplexado baseado em esferas (*multiplexed bead assay*), é uma série de partículas espectralmente discretas que podem ser usadas para capturar e quantificar analitos solúveis. O analito é então medido pela detecção de uma emissão baseada em fluorescência e análise citométrica de fluxo. A Becton Dickinson (BD)TM CBA gera dados comparáveis com os ensaios baseados em ELISA, mas em um modo "multiplexado" ou simultâneo. Como com qualquer ensaio no formato de sanduíche, o cálculo da concentração de analito desconhecido ocorre geralmente por meio do uso de padrões conhecidos e de plotagem de desconhecidos contra uma curva padrão.

Instrumentos úteis para detectar a proteína E6 capturada são bem conhecidos na arte.. Por exemplo, um instrumento refletômetro ou um leitor UMM pode ser usado para detectar a linha resultante sobre a tira de LF. Alternativamente, um leitor fluorométrico pode ser utilizado se mAbs anti-E6 fluorescentemente marcados são usados para capturar a proteína E6.

Dispositivos nos quais as partículas detectoras estão incorporadas como uma parte inerente do próprio dispositivo também poderiam ser usados. Alternativamente, o processo de extração da invenção poderia produzir uma amostra de entrada consistindo de um grupo E6 sozinho ou complexado com anticorpos, peptídeos ou proteína específicos (quer ligados quer não ligados em partículas). Tal amostra de entrada poderia ser introduzida em um fluxo baseado em membrana não-específica ou de captura específica através do dispositivo de detecção e subsequentemente detectada por sistemas baseados em partículas ou enzimáticos ou sistemas de detecção amplificada.

Numerosas abordagens poderiam ser utilizadas para intensificar a detecção de sinal. Uma tal abordagem utilizaria anticorpos monoclonais (mAbs) conjugados em enzima (e.g. peroxidase de rábano (HRP) ou fosfatase alcalina (AP)) conjugados com partículas de ouro conjuntamente com uma substrato de precipitação. Anticorpos com biotinas múltiplas seguidos por partículas de ouro - estreptavidina poderiam também resultar em sinal amplificado. Biotina-tiramida poderia ser usada para depositar mais biotina ao redor da linha de teste, seguida por ouro conjugado com estreptavidina para amplificação e detecção. Alternativamente, a intensificação de sinal poderia resultar do uso de um processo de dois níveis envolvendo uma partícula primária consistindo de biotina e uma partícula de ouro conjugada com mAb específico (ou partículas fluorescentemente marcada) seguida por uma partícula secundária conjugada com estreptavidina. A partícula primária poderia ser uma partícula etiquetada iterativamente com E6 específica seguida por uma partícula secundária anti-etiqueta. A partícula primária também poderia ser um coquetel de anticorpo capaz de reagir com proteínas E6 derivadas de algumas, ou de todas as cepas oncogênicas de HPV e/ou com um ou mais epítomos da proteína E6. Tal coquetel de anticorpos poderia estar biotinilado, conjugado em um suporte sólido (e.g. partícula de ouro) ou fluorescentemente marcado; e muitos dos métodos aqui descritos

poderiam ser usados conjuntamente com tal coquetel para detectar a proteína E6.

Em certas modalidades, o ingrediente ativo no tampão de extração pode ser aumentado com o propósito de intensificar a solubilização do espécime clínico. Tal solubilização intensificada poderia evitar a necessidade de clarificar a amostra e eliminar uma etapa no ensaio. Também pode ser possível pelletizar os complexos de ouro-mAB-anti-E6 e reconstituir em um volume pequeno com o propósito de concentrar a amostra, enriquecendo deste modo a proteína E6 e intensificando a sensibilidade do ensaio.

A amostra pode ser filtrada antes da detecção para remover material indesejado que poderia interferir com o fluxo e a detecção da amostra. Filtração pode abaixar a viscosidade de uma amostra, resultando em uma vazão de fluxo aumentada da amostra. Isto pode aumentar a eficiência na concentração da amostra para dentro de uma membrana de amostra ou a vazão de fluxo em um dispositivo de fluxo lateral. Em adição, pela redução da matéria de tamanho de partícula maior da amostra, a viscosidade de uma amostra pode ser abaixada, resultando em uma vazão de fluxo aumentada da amostra. Isto pode aumentar a eficiência na concentração da amostra para dentro de uma membrana de amostra ou a vazão de fluxo sobre um dispositivo de fluxo lateral.

Uma ampla variedade de polímeros orgânicos e inorgânicos, ambos naturais e sintéticos, pode ser usada para filtrar a amostra. Polímeros ilustrativos incluem polietileno, polipropileno, poli(4-metil-buteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), raiom, náilon, poli(butirato de vinila), poli(difluoreto de vinilideno) (PVDF), silicones, poliformaldeído, celulose, acetato de celulose, nitro-celulose, papel de fibra de vidro, poli(cloreto de vinila), poli(acetato de vinila), copolímeros de acetato de vinila e cloreto de vinila, poliamida, policarbonato, orlon, poliéster,

poliestireno, e semelhantes, ou misturas também podem ser usadas. Em uma modalidade preferida, o tamanho de poro do filtro permite que as proteínas de amostra passem através simultaneamente evitando a passagem de outros materiais. Tamanhos de poro de filtro podem variar, por exemplo, de 0,1 μm a 50 μm . Preferivelmente, o tamanho de poro varia de 0,5 a 25 μm , 1,0 a 20 μm , 2,0 a 15 μm , 3,0 a 10 μm , ou 4,0 a 6,0 μm . Por exemplo, após as etapas de extração de proteína pelo contato das células com um reagente extrativo e então uma reagente neutralizador da presente invenção, a amostra pode ser passada através de um filtro tendo um tamanho de poro de 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 ou 8,0 μm . Uma pessoa experiente na arte reconheceria que tamanhos de poro diferentes poderiam ser exigidos baseando-se na amostra a ser filtrada. A amostra pode ser forçada através do filtro (e.g. por meio de uma seringa contendo um filtro de membrana porosa ou pelo uso de uma sucção a vácuo através do filtro). Há numerosos métodos de filtração de uma amostra bem conhecidos por uma pessoa experiente na arte.

A filtração da amostra pode resultar em uma em uma vazão de fluxo aumentada para a amostra. Em algumas situações, a vazão de fluxo da amostra pode ser aumentada em comparação com uma amostra que não foi filtrada por 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ou 50%. Um tamanho de filtro apropriado pode resultar no aumento da vazão de fluxo sem qualquer perda apreciável de detecção de sinal.

Resultados obtidos dos métodos de ensaio descritos acima podem ser comparados com os resultados obtidos de controles adequados, e.g., um controle positivo (no qual um extrato de proteínas conhecidamente contendo a proteína na qual o agente capturador se liga pode ser utilizado) ou um controle negativo (e.g., no qual um reagente extrativo de proteína não tem sido contatado com uma amostra celular pode ser usado).

Resultados obtidos dos métodos de ensaio descritos acima

podem indicar a presença, a ausência, ou, em certas modalidades, a quantidade de uma proteína em um extrato de proteínas.

Em certas modalidades, os resultados obtidos dos métodos de ensaio descritos acima podem ser comunicados de volta para uma localização remota, e.g., por telefone, fax, e-mail, correio ou qualquer outro meio. Os resultados podem ser comunicados ao sujeito ou a um médico do sujeito, por exemplo.

Os métodos de detecção de proteína acima podem ser realizados em combinação com um teste diferente, tal como um teste citológico, e.g., um teste Pap para identificar células cervicais cancerosas ou pré-cancerosas, ou outros testes moleculares. Nestas modalidades, uma 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 utilizada nos métodos descritos acima.

De acordo com o discutido acima, certas modalidades da invenção também fornecem um sistema para produzir um extrato de proteínas. O sistema geralmente contém: a) uma amostra celular contendo células fixadas ou não-fixadas; b) um reagente extrativo que tem um pH de pelo menos cerca de pH 10,0; e c) um reagente neutralizador, onde as células fixadas ou não-fixadas, reagente extrativo e reagente neutralizador podem ser utilizados nos métodos acima para produzir um extrato de proteínas adequado para uso em um ensaio de ligação. O reagente extrativo e/ou o reagente neutralizador contém um polióxietileno-alquil-éter.

KITS

Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece kits para praticar os presentes métodos, e.g., para produzir um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas, em certas modalidades, para testar a presença de uma proteína no extrato de proteínas. Os presentes kits pelo menos incluem um reagente extrativo que tem um pH de pelo menos cerca de pH

10,0, e um reagente neutralizador. O reagente extrativo e/ou o reagente neutralizador contém um polióxietileno-alquil-éter. Em adição, os kits podem incluir um agente capturador para detectar uma proteína, e, em certas modalidades, reagentes (e.g., tampões e reagentes de detecção) para detectar aquela proteína usando o agente capturador. Os componentes acima podem estar presentes em recipientes separados ou um ou mais componentes podem estar combinados em um único recipiente, e.g., um frasco de vidro ou de plástico.

Em adição aos componentes acima, os presentes kits podem adicionalmente incluir instruções para praticar os presentes métodos. Estas instruções podem estar presentes nos presentes kits em uma variedade de formas, uma ou mais das quais pode estar presente no kit. Uma forma na qual estas instruções podem estar presentes é uma informação impressa sobre um meio ou substrato adequado, e.g., um pedaço ou pedaços de papel sobre o qual (os quais) a informação está impressa, na embalagem do kit, em um inserto de embalagem, etc. Ainda outro meio seria um meio legível por computador, e.g., disquete, CD, etc., sobre qual a informação tem sido gravada. Ainda outro meio que pode ser apresentado é um endereço em um *website* que pode ser usado via a internet para acessar a informação em um sítio distante. Qualquer meio conveniente pode estar presente nos kits.

UTILIDADE

O método e o sistema descritos acima são prontamente utilizados em uma variedade de métodos diagnósticos e de pesquisa, incluindo métodos de diagnose de uma condição ou doença específica, ou infecção por um agente infeccioso, tal como um vírus ou bactérias. Em uma modalidade, o método é utilizado como parte de um diagnóstico para detectar células infectadas por 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 cancerosas e pré-

cancerosas.

HPV é conhecidamente um agente causador das seguintes doenças: epidermodisplasia verruciforme (EV), um distúrbio de pele durante toda a vida que resulta em alto risco para a câncer de pele (e.g.,
5 esquamocelular); 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); neoplasias vulvais tais como neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) e carcinoma vulvar; carcinoma peniano (incluindo papulose Bowenoid); carcinomas anal
10 (AC) e perianal (PC); carcinomas orofaríngeais (OS); carcinomas esofágicos (EC); cânceres de pele de não-melanoma (e.g., carcinoma de célula basal-BCC e carcinoma de célula escamosa-SCC); e melanoma. Como tal, em uma modalidade, os presentes métodos podem ser utilizados como um diagnóstico para qualquer uma destas doenças.

15 Em uma modalidade, são obtidas células (e.g., esfoliadas ou dissecadas) de um sujeito e depositadas em um meio líquido contendo um fixador que, em certas modalidades, pode ser um meio de transporte para teste citológico. As células são costumeiramente obtidas em clínica ou consultório médico, a amostra celular é enviada para ou recebida de uma instalação de
20 teste na qual os métodos de detecção de proteína citados acima e, opcionalmente, ensaios citológicos são realizados. Resultados do teste são comunicados ao sujeito, em algumas modalidades via o médico e um seu associado.

O sujeito cujas células são utilizadas pode ser um mamífero,
25 e.g., um cão ou gato, um roedor (e.g., camundongo, porquinho-da-índia, ou rato), ou primata (e.g., um humano, chimpanzé, ou macaco). Em muitas modalidades, o sujeito será um humano, particularmente um humano masculino ou feminino. Em certas modalidades, o sujeito pode mostrar sintomas de infecção por HPV (e.g., pode ter verrugas sobre uma ou mais

partes do corpo), pode ser suspeito de estar infectado por HPV (e.g., pode conter células que são citologicamente consistentes com uma tal infecção) ou pode já ter sido testado positivo para HPV. Em certas modalidades, o sujeito pode não ter indicação de infecção por HPV, e os métodos acima podem ser utilizados como parte de um cenário de rotina.

Em uma modalidade, os presentes métodos podem ser utilizados para detectar qualquer cepa de HPV oncogênico, e.g., 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 ou HPV 69, (particularmente qualquer uma das cepas de HPV mais predominantes, e.g., HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 e HPV 45) pela detecção da proteína E6 daquela cepa. Em uma modalidade, no momento de iniciação dos presentes métodos, não é sabido se as células fixadas ou não-fixadas contêm proteína E6 oncogênica ou de qual cepa é a proteína E6 oncogênica. Se um ensaio de detecção indica a presença de uma proteína E6 oncogênica em células, então a identidade da cepa de HPV que infectou aquelas células pode ser determinada por outros ensaios moleculares, e.g., aqueles que utilizam anticorpos específicos para uma proteína E6 específica ou outra proteína codificada pelo vírus, ou por sequenciamento de DNA viral.

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

EXEMPLOS

Exemplo 1: Extração de amostras clínicas inoculadas

Células transfectadas com o gene HPV16 E6 (C33A+) foram fixadas com o meio THINPREP™ e adicionadas (i.e., "inoculadas") em porções das amostras clínicas fixadas com THINPREP™ como listado abaixo. As células foram inoculadas em metade de cada uma de cinco amostras clínicas (cada metade de amostra clínica tendo 20 milhões (20M) de

células C33A+).

Esquema de extração:

Células C33A(+) ThinPrep / 20M células por mL

1 - 20M de Células C33A(+) ThinPrep em ½ negativo clínico

5 #229 (1,0 mL de extração)

2 - 20M de Células C33A(+) ThinPrep em ½ negativo clínico

#230 (1,0 mL de extração)

3 - 20M de Células C33A(+) ThinPrep em ½ negativo clínico

#231 (1,0 mL de extração)

10 4 - 20M de Células C33A(+) ThinPrep em ½ negativo clínico

#232 (1,0 mL de extração)

5 - 20M de Células C33A(+) ThinPrep em ½ negativo clínico

#233 (1,0 mL de extração)

6 - 20M de Células C33A(+) ThinPrep (1,0 mL de extração)

15 Reagente extrativo:

Triton X-100 / Lote 092K0171 - (1% = 250 µL)

NaCl 5M / Lote 5701-53 - (0,15M = 750 µL)

Base Tris 0,5 M / Lote 5708-20 - (0,1M = 5 mL)

Glicina 0,5 M / Lote 5708-9 - (0,1M = 5 mL)

20 SDS 10% / Lote 5708-8 - (0,05% = 125 µL)

Uréia 8 M / Lote 5678-83 - (0,25M = 781 µL)

Adicionar RO/DI em 20 mL- (8,1 mL)

NaOH 5 N / Lote A09522 - (525 µL)

Adicionar RO/DI em 25 mL - (4,475 mL)

25 pH Final - 11,48

Formulação final: Tris 0,1 M / glicina 0,1 M / NaCl 0,15 M /

Triton™ X-100 1% / SDS 0,05% / uréia 0,25 M pH 11,48

Procedimento de extração de proteína:

1. Adicionar suspensão de células em tubo de centrífuga de 50

mL

2. Centrifugar a 3000 rpm por 10-15 minutos
 3. Cuidadosamente remover o sobrenadante
 4. Transferir o conteúdo para um tubo nunc de 1,5 mL
 5. Centrifugar a 3000 rpm por 10-15 minutos
 6. Cuidadosamente remover o sobrenadante
 7. Adicionar a quantidade exigida de reagente extrativo para pelotizar
 8. Ressuspender para fragmentar a pelota de células
 - 10 a. Aditivos (DTT @ 1:100)
 9. Checar pH, ajustar para 11,5
 10. Misturar na RT (temperatura ambiente) (ou temperatura apropriada para extração) por 30 minutos
 11. Centrifugar a 14.000 rpm por 10-15 minutos
 12. Remover o sobrenadante clarificado
 13. Adicionar DTT® 1:100
 14. Neutralizar para pH 8,0 com HCl 5N e testar em ELISA (Neutralizar para pH 8,0 com 31,0 µL de HCl 5 N / 1 mL)
- DTT 100 mM / NR 5701-90 / DOM 2/7/05

20 Método de ELISA

1 - Revestir 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 cavidade

$$11 \text{ mL} \times 5 \text{ µg/mL} = 55 \text{ µg} \times 1 \text{ µL} / 0,65 \text{ µg} = 84,6 \text{ µL de GST-}$$

25 Magi-PDZ

- 2 - Incubar durante a noite a 4°C
- 3 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
- 4 - Bloquear placa com 250 µL de tampão bloqueador (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 para cavidades apropriadas
- 5 8 - Incubar por 1 hora a 25°C
- 9 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
- 10 - Adicionar 100 µL de anticorpo anti-E6 (4C6 - 2,85mg/mL - lote 02) @ 5 µg/mL na cavidade apropriada em tampão BSA HNTG 2% (lote 031805B). Peptídeo N-terminal (HPV16E6 lote#PN3952-2) é
- 10 adicionado em amostras apropriadas a 10 µg/mL para verificar a especificidade de sinal (peptídeo é pré-incubado com o anticorpo anti-E6 para 45 minutos antes da adição).
- 11 - Incubar por 2 horas a 25°C
- 12 - Lavar 3x (TBS-Tween) com lavador de placa
- 15 13 - Preparar uma diluição 1:5.000 de IgG de cabra anti-camundongo conjugada com HRP (Jackson GxM IgG-HRP / catálogo #115-035-062 / lote 60988) em tampão BSA 2% / Tween 20 0,05% (lote 040505).
- $10,0 \text{ mL} \times 1/5000 = 0,002 \text{ mL} \times 1,000 \text{ µL/mL} = 2,0 \text{ µL}$ de IgG de cabra anti-camundongo conjugada com HRP
- 20 14 - Adicionar 100 µL de diluição 1:5000 de IgG de cabra anti-camundongo conjugada com HRP em cavidades apropriadas
- (Remover Substrato TMB e deixar em 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 Stop (lote 030705) e Ler em A450

Formulação:

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

Bloqueador BSA 2% lote 033005 (49,975 mL)

Tween 20 lote A016759301 (0,025 mL)

5 Resultados

	Sequência (SEM peptídeos)			Sequência (Peptídeo N-terminal)		
	OD		Média	Média	OD	
20M de células C33A(+) TP em 1/2 negativo clínico #229*	1,294	1,220	1,257	0,464	0,516	0,411
20M de células C33A(+) TP em 1/2 negativo clínico #230*	1,140	1,103	1,122	0,631	0,630	0,632
20M de células C33A(+) TP em 1/2 negativo clínico #231*	1,136	1,178	1,157	0,443	0,451	0,434
20M de células C33A(+) TP em 1/2 negativo clínico #232*	0,946	0,924	0,935	0,580	0,585	0,574
20M de células C33A(+) TP em 1/2 negativo clínico #233*	1,288	1,169	1,229	0,843	0,843	0,843
20M de células C33A(+) TP	1,762	1,691	1,727	0,345	0,334	0,356
C33A(+) / 2M de células / LB (+ve)	2,052	2,134	2,093			
C33A(-) / 2M de células / LB (-ve)	0,167	0,188	0,178			
Anti-4C6 + N-Term (-ve)	0,056	0,062	0,059			
Anti-4C6 (-ve)	0,106	0,115	0,111			

* Volume de extração -1 mL

Como pode ser visto dos resultados mostrados na tabela acima, ligação de E6 foi detectada para todas as amostras clínicas inoculadas.

Exemplo 2: Efeito do tampão de pH alto mais aditivos sobre a detecção de MBP-E6

10 O exemplo descrito em Figura1 ilustra o efeito de tampões de composição diferente sobre a detecção de proteína ligante de maltose (MBP)-proteína E6 recombinante. Ordinariamente, os tampões de extração aqui descritos seriam usados para extrair a proteína do extrato de células. Aqui, contudo, proteína recombinante previamente purificada foi usada com o

15 propósito de otimizar as condições. Resumidamente, os experimentos descritos em Figura 1A envolveram a suspensão da MBP-proteína E6 em tampões de extração recém-preparados diferindo em teor de aditivo e pH. Esta etapa de "extração" foi seguida por uma etapa de neutralização na qual o pH da amostra foi ajustado para um pH neutro. MBP-proteína E6 foi então

20 detectada usando um ensaio de fluxo lateral.

Composição dos tampões

Os tampões usados nos experimentos aqui descritos foram derivados de um dos dois tampões, quer um tampão de pH mais baixo,

"Tampão 1" quer um tampão de pH mais alto, "Tampão 2". Tampão 1 (pH de cerca de 11,5) consistiu de: Tris/Glicina cerca de 100 mM, HEPES cerca de 50 mM, NaCl cerca de 150 mM, EGTA cerca de 1 mM, Triton™ X-100 cerca de 1,1%, e NaOH cerca de 0,125-0,14 N. Tampão 2 (pH de cerca de 12-13) consistiu de NaOH cerca de 0,1 N e Citrato de Trissódio cerca de 50 mM. Cada tampão foi então suplementado, ou não, com uma quantidade "baixa" ou "alta" do aditivo indicado em Figura 1A. Os aditivos nos tampões baixos em aditivo tiveram concentrações de cerca de: uréia 0,25M; SDS 0,05%; Tween™-20 2%; Brij™ 35 2% (Sigma); saponina 2%; Tergitol NP 40 2%; ou EDTA 10 mM, pH 8. Os aditivos nos tampões altos em aditivo tiveram concentrações de uréia cerca de 2M; SDS 0,5%; Tween™-20 4%; Brij™ 35 4%; saponina 4%; Tergitol NP 40 4%; ou EDTA 50 mM, pH 8. Como indicado acima, Tampão 1 teve um nível de estoque de Triton™ X-100 1,1%, que foi usado para ambas as amostras baixa e alta. Para Tampão 2, Triton™ X-100 estava em uma concentração de 2% (baixa) ou 4% (alta).

Na maioria dos exemplos aqui descritos, os tampões foram preparados, incluindo os aditivos individuais, imediatamente antes da adição nas amostras. Contudo, em alguns casos, as amostras foram tratadas primeiro com tampão antes que um ou mais aditivos fosse(m) introduzido(s) na amostra.

Deteção da MBP-proteína E6

No experimento mostrado em Figura 1A, 520 pg de MBP-E6 foram suspensos em 1,03 - 1,13 mL do tampão de extração indicado que havia sido recém-preparado com o aditivo indicado. A suspensão foi então levemente misturada (extremidade-sobre-extremidade) na RT por cerca de 30 minutos. Para a etapa de neutralização, a suspensão foi ajustada para um pH menor (aproximadamente 7,8 a 8) usando Tris cerca de 2 M e de novo girada na RT por 30 minutos. Aproximadamente 150-200 µL da amostra foram analisados pelo ensaio de fluxo lateral (LF) aqui descrito com o propósito de

detectar a proteína recombinante MBP-E6.

Descrição do ensaio de fluxo lateral (LF)

O ensaio de fluxo lateral (LF) aqui descrito também conhecido como ensaio imunocromatográfico ou ensaio de bastão de imersão. Em resumo, o ensaio LF aqui envolve a captura de proteínas virais ligadas em partículas de ouro sobre uma "zona de captura" presente sobre um bastão LF. Captura bem sucedida resulta no surgimento de uma linha visível e detectável sobre o bastão LF. Materiais: BSA 20% (p/v) filtrado a 0,22 μm (Sigma A7906); Colloidal Gold 8G11 (BBI); tiras de fluxo lateral, captura de PDZ.

10 Método:

1) Cerca de 150-200 μL de amostra são adicionados em células em duplicata em uma placa de 96 cavidades.

2) Cerca de 20 μL de BSA 20% são adicionados em cada cavidade e misturados com uma ponta de pipeta.

15 3) Cerca de 10 μL de ouro coloidal conjugado em 8G11 são adicionados em cada cavidade e misturados com uma ponta de pipeta. 8G11 é um anticorpo monoclonal (mAb) que reconhece a E6 de HPV16.

4) Uma tira LF é deixada em cada cavidade por cerca de 120 minutos para permitir que a amostra migre ascendentemente pela tira por ação capilar. Uma almofada absorvente pode ser fixada na extremidade distal para facilitar o fluxo de líquido ascendentemente pela tira. Durante a migração da amostra, a proteína E6 de HPV16 pode se ligar no mAb ligado nas partículas e ouro coloidal. A proteína E6 é também capturada por uma zona sobre a tira LF contendo múltiplas proteínas possuindo o domínio PDZ capazes de reconhecerem a proteína E6. Tal captura resulta no surgimento de uma linha vermelha visível e detectável sobre a tira LF.

20

25

5) -As tiras LF são então analisadas por um instrumento UMM, que é um leitor de refletância instrumentalizado capaz de quantificar a saída de sinal visível. Os valores obtidos são valores de refletância relativos.

Resultados

O exemplo ilustrado pela Figura 1 mostra que a combinação de certos aditivos com o tampão de extração de pH alto (Tampão 2, pH 12,9), causa um efeito sinérgico sobre a detecção da MBP-proteína E6. Por exemplo, quando o Tampão 1 foi comparado com o Tampão 2 na ausência de aditivos, pareceu que o pH aumentado não teve efeito sobre a detecção da MBP-proteína E6 recombinante (Fig. 1A, últimas 4 colunas). Certos aditivos, notadamente SDS, TWEEN™-20, Brij™ 35 e Tergitol NP40, não aumentaram a detecção da MBP-proteína E6 mesmo quando o tampão de pH comparativamente menor, Tampão 1, pH 11,5 foi usado (Fig. 1 A). Contudo, quando os aditivos foram combinados com o tampão de pH mais alto (Tampão 2) a detecção da proteína recombinante foi sobremaneira aumentada nas amostras de SDS, TWEEN™-20, Triton™ X 100, e Brij™ 35. Por exemplo, a detecção da proteína na amostra tratada com Triton™ X-100 subiu de leitura de 0 para mais de ~ 2,4 UMM quando o pH foi aumentado. Assim é possível concluir que a combinação de um pH alto com certos aditivos durante a etapa de "extração" exerceu um efeito sinérgico sobre a detecção da proteína E6.

Figura 1B descreve experimentos que foram similares àqueles conduzidos em 1 A. Contudo, em Figura 1B, os aditivos foram introduzidos na amostra durante a etapa de neutralização em vez de na etapa inicial de "extração". Esta abordagem deu intensidades de sinal muito mais baixas do que quando os aditivos foram introduzidos durante a etapa de extração. Consequentemente, a introdução dos aditivos na etapa de neutralização não é uma abordagem ótima.

Exemplo 3: Efeito dos aditivos sobre a extração de proteína E6 das células

O exemplo ilustrado pela Figura 2 avaliou o efeito de percentagens diferentes de aditivos de tampão sobre a extração de proteína E6 de células. Neste exemplo, proteína foi extraída quer de células SiHa

expressando o gene HPV16 E6 quer de células de C33A-, que são uma linhagem de células de câncer cervical não-infectadas por HPV.

Etapas de extração

Para a etapa de extração, as pelotas de células contendo cerca de 10 milhões de células foram primeiro removidas de um congelador a -80°C e permitidas descongelarem para a RT por cerca de 10 minutos. Então, cerca de 750 µL de Tampão 2, descrito em Exemplo 2, foram adicionados na maioria das amostras. Aditivos tais como Brij™ 35, Tween™-20, ou Triton™X-100 também foram introduzidos nas amostras indicadas. Estes aditivos estavam presentes em uma concentração final de quer 2% quer 4% (v/v). Como um controle, algumas amostras foram extraídas com Tampão 673, um tampão de pH neutro contendo Tris 20 mM pH 8, BSA 2%, Triton™-X 100 1%, Tween™-20 2%, Sarcosina 0,2%, NaCl 250 mM, e EDTA 50 mM. As amostras foram brevemente agitadas e então giradas por 30 minutos na RT.

Etapas de neutralização

Para etapa de neutralização, aproximadamente 140-180 µL de Tris 2 M, pH 6,0, foram adicionados com o propósito de reduzir o pH de cada amostra para cerca de pH 7,8-8. O volume de Tris, pH 6,0, necessário para neutralizar o pH das amostras foi previamente determinado de modo empírico. Após a adição da Tris e breve agitação, as amostras foram giradas na RT por 30 minutos. As amostras foram então clarificadas por 10 minutos de centrifugação a 14K rpm. Os lisados clarificados (volume final de aproximadamente 1,09) foram então transferidos para um tubo limpo antes de serem analisados pelo ensaio LF descrito em Exemplo 2.

Resultados

A proteína E6 de HPV16 foi melhor detectada quando o Tampão 2 contendo 4% de Brij™ 35 foi usado na etapa de extração (Figura 2). Em adição, comparação do sinal das células SiHa com as células C33A-

negativas para E6 de HPV E6, indicou que esta condição também aumentou consideravelmente a razão de sinal-para-ruído do ensaio (Figura 2).

Exemplo 4: Detecção de resposta de dose de proteína E6 de HPV-16 após a extração com Tampão 2 / Brij™ 35 4%

Neste exemplo, números crescentes de células Caski e SiHa expressando E6 de HPV-16 foram extraídos com Tampão 2 / Brij™35 4% descrito em Exemplos 2 e 3. O método de extração foi similar àquele descrito em Exemplo 3, e uma concentração inicial de cerca de 9,2 milhões de células/mL foi usada. O ensaio LF diferiu, contudo, pelo fato de que números progressivamente crescentes de células foram usados por tira LF. Como indicado em Figura 3, os números de células por tira usados no ensaio LS foram cerca de 31.000; cerca de 62.000; cerca de 125.000; cerca de 250.000; cerca de 500.000; cerca de 1.000.000; ou cerca de 1.700.000. Controles negativos incluíram extração destas células com um tampão 673 de pH neutro (descrito em Exemplo 3) e extração de células C33A negativas para HPV com quer Tampão 2 / Brij™35 4% quer tampão 673.

Como ilustrado em Figura 3, não houve resposta de dose quando as células C33A foram usadas, e apenas uma resposta de dose limitada quando o tampão 673 de pH neutro foi utilizado. Contudo, quantidades crescentes de proteína E6 foram detectadas em ambas as linhagens de célula expressando E6 de HPV-16 (SiHa e Caski) como um resultado do uso de números crescentes de células. Estes resultados indicaram que o ensaio detectou uma proteína E6 de HPV-16 em uma maneira de resposta de dose.

Exemplo 5: Uso de Tampão 2 / Brij™35 4% na extração de proteína E6 de HPV-16 de amostras clínicas inoculadas

O exemplo mostrado em Figura 4 ilustra a detecção de proteína E6 de HPV16 em extrações de amostras clínicas normais PAP que haviam sido combinadas ou "inoculadas" com células SiHa expressando E6

de HPV16. As amostras clínicas usadas neste exemplo foram amostras de escova cervical, não fixadas que foram negativamente testadas pelo esfregaço Pap tradicional. As amostras foram primeiro removidas de um congelados a -80°C e permitidas descongelar na RT por cerca de 10 minutos. Cortadores de arame pequenos foram então usados para cortar cada escova, que então foi adicionada em um tubo de microcentrífuga contendo uma pelota de células congelada de cerca de 10 milhões de células SiHa. Extração, neutralização, e ensaio LF das amostras foram realizados em uma maneira similar àquelas descritas em Exemplos 3 e 4. Para este experimento, quer Tampão 2 / Brij™35 4% quer tampão 673 neutro (ambos os quais foram descritos nos exemplos prévios) foi usado durante a etapa de extração. O volume de extração para ambos os tampões foi de aproximadamente 1 mL.

Proteína E6 de HPV16 significativa foi detectada nas cinco amostras clínicas inoculadas com células SiHa extraídas usando o Tampão 2 / Brij™35 4% (Figura 4). Em contraste, extração das cinco amostras não inoculadas com SiHa resultou em um sinal comparativamente menor. Similarmente, uso de Tampão 673 para extrair qualquer tipo de célula também resultou em um sinal comparativamente menor. Estes resultados sugeriram que o Tampão 2 / Brij™35 poderia ser bem sucedidamente usado no futuro para detectar a proteína E6 de HPV16 em amostras clínicas.

Exemplo 6: Otimização adicional de Tampão 2 / Brij™35 para uso em extração de proteína

Este exemplo ilustra a otimização adicional de extração com Brij™ 35 usando percentagens diferentes de Brij™ 35 e/ou combinações diferentes de aditivos. Aqui, Tampão 2 (descrito em Exemplo 2) contendo níveis diferentes de Brij™ 35 foi usado para ajudar na extração da E6 de HPV16 das células SiHa, uma linhagem celular transfectada com o gene para E6 de HPV16 (Figura 5). Em adição, Tampão 2 contendo Brij™ 35 em combinação com outros aditivos tais como EDTA, Tween™-20, ou Triton™

X-100 também foi testado. Para este experimento, as etapas de extração, neutralização e de ensaio LF foram similares às aquelas descritas em Exemplos 2 e 3 exceto que o nível de aditivo usado no tampão de extração foi variado. A quantidade de aditivo utilizada no tampão de extração foi qualquer uma de:

4% de Brij™35, 5% de Brij™ 35, 6% de Brij™ 35, 4% de Brij™ 35 + EDTA 10 mM, 2% de Brij™ 35 + 2% de Tween-20, 2% de Brij™ 35 + 2% de Triton™X-100, 2% de Brij™ 35 + 2% de Tween™-20 + 2% de Triton™ X-100, ou 2% de Brij™ 35 + 2% de Tween™-20 + EDTA 10 mM. Como um controle, algumas amostras foram extraídas com tampão 673 de pH neutro. O número aproximado de células por tira LF foi cerca de 1.300.000.

Como mostrado em Figura 5, aumento da percentagem de Brij 35 de 4% para 6% resultou em detecção intensificada da proteína E6 de HPV16. O ensaio também foi aperfeiçoado pela adição de Triton™ X-100 e/ou Twee™n-20 no tampão com Brij™ 35.

Exemplo 7: Efeito do tempo das etapas de extração e/ou neutralização sobre a detecção de E6 de HPV16

Proteína

Este exemplo ilustra o efeito que o tempo das etapas de extração e/ou neutralização teve sobre a detecção final de proteína E6 de HPV. Neste exemplo, a proteína E6 foi extraída de células SiHa de novo geralmente seguindo os procedimentos esboçados em Exemplo 3. Contudo, neste exemplo, o tempo de incubação para as etapas de extração e/ou neutralização foi modificado (Figura 6). As células SiHa foram extraídas a cerca de 10.000.000 de células/ mL por quer 30 minutos quer 10 minutos e neutralizadas por quer 30 minutos quer 10 minutos, como indicado em Figura 6. O tempo de parada para a etapa de neutralização foi definido pelo tempo de centrifugação para a etapa de clarificação. Em adição, para o ensaio LF, quer 1.700.000 quer 500.000 células SiHa foram usadas por tira.

Não foram detectadas diferenças significativas de proteína de

HPV-16 quando tempos de incubação de extração ou de neutralização foram usados (Figura 6). Este exemplo portanto indica que o ensaio não afetou adversamente quando o tempo das etapas de extração e/ou neutralização incubação é modificado de 30 minutos para 10 minutos.

5 Exemplo 8: Uso de Tampão 2 / Brij™35 4% para extrair variantes de proteína E6 de HPV 18 e de HPV 45

Este exemplo ilustra a aplicação do sistema de extração Tampão 2 / Brij™35 4% descrito em Exemplos 2 e 3 para extrair a proteína E6 de cepas diferentes de HPV (Figura 7). Proteína E6 foi extraída quer de
10 células HeLa expressando HPV 18 quer de células MS751 expressando HPV 45. A linhagem celular C33A- negativa para HPV foi usada como um controle negativo. Os procedimentos de extração e de neutralização foram similares àqueles descritos em Exemplos 2 e 3. Para o ensaio LF, o equivalente de cerca de 1.700.000 células de cada tipo foi usado por tira LF.
15 Também, o ouro coloidal usado no ensaio LF estava conjugado com anticorpo monoclonal , F82-5A2, que reconhece as proteínas E6 de cepas HPV 18 e 45.

Como demonstrado em Figura 7, o sistema de extração Tampão 2 / Brij™35 4% pode ser bem sucedidamente utilizado para extrair proteína E6 de HPV 18 e proteína E6 de HPV45.

20 Exemplo 9: Uso do Tampão 2 / Brij™35 4% para extrair variantes de proteína E6 de HPV 16 e de HPV 18

Este exemplo compara extração com Tampão 2 / Brij™35 4% de proteína E6 de HPV16 com aquela de proteína E6 de HPV 18. As etapas de extração e de neutralização para o experimento descrito em Figura 8 foram
25 conduzidas em uma maneira similar àquelas de Exemplo 8. Contudo, este exemplo usou células SiHa expressando HPV16 e células HeLa expressando HPV 18. Como antes, células C33 A- foram usadas como um controle negativo. Para o ensaio LF, números crescentes de células (mesma faixa como em Exemplo 4) foram utilizados por tira LF. Em adição, anticorpo anti-

HPV16 ouro foi usado no ensaio LF dos extratos de célula SiHa, enquanto que anticorpo anti-HPV18 ouro foi utilizado no ensaio LF dos extratos de célula HeLa.

Proteína E6 foi detectada em extratos das células HeLa e SiHa (Figura 9). A detecção de ambas a proteína E6 de HPV16 e a proteína E6 de HPV18 ocorreu em uma maneira de dose-resposta (Figura 9).

Exemplo 10: Otimização adicional do sistema Tampão 2 / Brij™35

Este exemplo ilustra o efeito de variação do nível de Brij™35 de cerca de 4% a cerca de 10% em Tampão 2 (descrito em Exemplo 2). Para o experimento descrito em Figura 9, as etapas de extração e de neutralização foram similares àsquelas de Exemplo 3. Como naquele exemplo, as células iniciais foram quer as células SiHa infectadas por HPV16 quer as células C33A- negativas para HPV. Aqui, contudo, a percentagem de Brij™35 presente no momento da extração foi variada. Mais especificamente, as percentagens de Brij™35 usadas foram: cerca de 4%, cerca de 6%, cerca de 8% ou cerca de 10%. Em adição, Brij™35 2% / Tween™ 20 2% e Brij™ 35 2% / Tween™-202% / EDTA 10 mM também foram testados. Um ensaio LF foi realizado como aqui descrito. Cerca de 1,7 milhões de células foram utilizadas por tira LF.

Como indicado em figura 9, o sinal positivo dos extratos das células SiHa aumentou com a concentração crescente de Brij™35. Contudo, o sinal também aumentou em extratos preparados de células C33A- negativas para HPV, resultando em razões de sinal-para-ruído decrescidas em percentagens mais altas de Brij™. A razão de sinal-para-ruído do ensaio pareceu ser melhorada, contudo quando Brij™ 4% ou 6% foi usado. Em adição, combinação de Brij™ com Tween™-20 também pareceu melhorar a razão de sinal-para-ruído.

Exemplo 11: Otimização de amostras clínicas negativas inoculadas com SiHa

Este exemplo ilustra o efeito da variação das condições de

extração sobre a extração de proteína E6 de amostras clínicas negativas inoculadas com SiHa. As etapas de preparação de amostra bem de extração e de neutralização usadas aqui são similares àquelas utilizadas em Exemplo 5. Contudo, neste exemplo as amostras de sinal negativo (NCS) estavam presentes apenas sobre um esfregaço em vez de uma escova. Em adição, as condições de extração foram variadas neste experimento para incluir Tampão 2 quer com Brij™35 4%; Brij™35 2% / Tween™-20 2%, quer com ; Brij™35 2% / Tween™-20 2% / EDTA 10 mM (Figura 10). Como indicado, cerca de 1,7 milhões de células SiHa/tira foram utilizadas para o ensaio LF.

Como indicado pelos resultados mostrados em Figura 10, a condição de Tampão 2 / Brij™35 4% pode ser a condição superior para detectar a proteína E6 de HPV16 em amostras clínicas, porque as amostras inoculadas com SiHa deram sinais consistentemente relativamente positivos, enquanto que as amostras negativas resultaram em sinais relativamente mais baixos (Figura 10).

Exemplo 12: Extração de proteína E6 de HPV16 de células SiHa na presença de células negativas para HPV

Este exemplo ilustra a extração de proteína E6 de HPV16 de células SiHa na presença de células C33A- negativas para HPV. Para este exemplo, quantidades crescentes de extratos de SiHa foram tituladas em um tampão contendo uma quantidade fixa (cerca de 1 milhão/mL) de células C33A- (Figura 11). Para este experimento, cada linhagem de células foi separadamente extraída usando quer Tampão 2 / Brij™35 4% quer Tampão Arbor Vita Lysis (AVLB). AVLB consiste de HEPES cerca de 50 mM, pH cerca de pH 7,5, Triton™X-100 cerca de 1,1%, NaCl cerca de 150 mM, glicerol cerca de 10% e EGTA cerca de 1 mM. As etapas de extração e de neutralização foram conduzidas em uma maneira similar àquela do Exemplo 3. Contudo, neste experimento, diluente foi preparado consistindo de quer AVLB ou Tampão 2 / Brij™35 4% neutralizado. Extrato de C33A foi então

inoculado em cada tampão em um nível de cerca de 1 milhão de células/ml. Então, os extratos de SiHa foram serialmente diluídos nos tampões contendo C33A- indicados. As amostras foram analisadas citometria com esferas ordenadas (*cytometric bead array*, CBA) e lidas por um fluorímetro.

Resultados deste experimento revelaram que a melhor condição para detecção de proteína E6 foi extração e neutralização com Tampão 2 / Brij™35 4% seguidas por diluição em tampão AVL B (Figura 11). Em adição, o nível de detecção de proteína E6 pareceu ser cerca de 5.000 células/ mL ou 500 células/cavidade (Figura 11).

Exemplo 13: Extração de proteína E6 de HPV16 E6 de células SiHa fixadas em fixador ThinPrep™ ou SurePath™

Este exemplo ilustra que o sistema de extração Tampão 2/ Brij™35 4% pode ser usado para extrair proteína de célula fixadas. No experimento descrito em Figura 12, 10 milhões de células C33A- negativas para HPV ou de células SiHa positivas para HPV16 foram adicionados em 1 mL do fixador indicado ou meio DMEM e deixados em repouso por 1 hora na RT. As células foram então centrifugadas a 1.000 RPM por 15 minutos, pelotizadas, e ressuspensas em 1 mL de Tampão 2 / Brij™35 4% descrito em Exemplo 3. As amostras foram então submetidas às etapas de extração, neutralização e de ensaio LF descritas em Exemplo 3.

Como indicado em Figura 12, proteína E6 presente em ambas as células SiHa fixadas com ThinPrep™ e SurePath™ foi bem sucedidamente detectada quando Tampão 2 / Brij™35 4% foi usado na etapa de extração.

É evidente que dos resultados e da discussão acima os presentes métodos fornecem numerosas vantagens distintas para a análise molecular de células fixadas ou não-fixadas. Em particular, os métodos fornecem um método rotineiro para a produção de um extrato de proteínas de células fixadas ou não-fixadas no qual as proteínas no extrato de proteínas são detectáveis em ensaios de ligação. Visto que é geralmente difícil detectar

certas proteínas em células fixadas ou não-fixadas, a presente invenção representa uma contribuição significativa para a arte.

Exemplo 14: Efeito da filtração do extrato de proteínas através de um filtro de membrana sobre a vazão de fluxo da amostra

5 Neste exemplo, proteína foi extraída quer de células SiHa expressando a proteína E6 de HPV16 quer de células C33A-, que são uma linhagem celular de câncer cervical não infectada por HPV, e passada através de uma membrana de filtro antes de avaliar a vazão de fluxo da amostra resultante.

10 Etapa de extração

Para a etapa de extração, as pelotas de células contendo cerca de 10 milhões de células foi primeiro removida de um congelador a -80°C e permitida descongelar na RT por cerca de 10 minutos. Então, cerca de 750 µL de Tampão 2, descrito em Exemplo 2, foram adicionados na maioria das amostras. Aditivos tais como Brij™ 35, Tween™-20, ou Triton™X-100 foram também introduzidos nas amostras indicadas. Estes aditivos estavam presentes em uma concentração final de quer 2% quer 4% (v/v). As amostras foram brevemente agitadas e então giradas por 30 minutos na RT.

Etapa de neutralização

20 Para a etapa de neutralização, aproximadamente 140-180 µL de Tris 0,9M, pH 7,8, foram adicionados com o propósito de reduzir o pH de cada amostra para cerca de pH 8,5. O volume de Tris, pH 7,8, necessário para neutralizar o pH da amostra foi previamente empiricamente determinado. Após a adição de Tris e da breve agitação, as amostras foram giradas na RT por 30 minutos. As amostras foram então clarificadas por 10 minutos de centrifugação a 14K rpm.

Etapa de filtração

Os lisados clarificados (volume final de aproximadamente 1,09) foram filtrados através de um filtro de seringa de PVDF Millipore de

5,0 μm . As amostras foram então passadas através de um dispositivo de fluxo de amostra e foi medido o tempo necessário para a passagem da amostra inteira. As amostras também foram avaliadas para concentração de sinal de imunoenensaio e foram lidas visualmente ou com um densitômetro CAM AG. A presença de E6 de HPV E6 foi classificada visualmente em uma escala de 0-4.

Resultados

Os tempos de fluxo para a passagem de amostra através de um filtro de seringa de PVDF de 5,0 μm foram reduzidos, em alguns casos em quase 50%. Os dados são mostrados em Tabela 1 abaixo. Em adição, avaliação das amostras por leitura visual não mostrou perda significativa em sinal de SiHa após filtração através de filtro de seringa de 5,0 μm (Figura 13).

Tabela 1. Avaliação de fluxo de amostras após a filtração

Combinação de amostra	Tempos de fluxo de amostra (não filtrada) (minutos)	Tempos de fluxo de amostra (filtrada) (minutos)	Combinação de amostra	Tempos de fluxo de amostra (não filtrada) (minutos)	Tempos de fluxo de amostra (filtrada) (minutos)
1	10:41	8:52	10	12:23	10:10
2	19:12	9:37	11	8:21	6:46
3	3:33	3:22	12	>30 minutos	15:45
4	19:46	12:13	13	4:12	4:05
5	>30 minutos	27:36	14	>30 minutos	16:41
6	4:26	4:20	15	>30 minutos	28:12
7	11:56	8:24	500K SiHa	3:51	3:42
8	25:12	14:34	500K C33A-	3:57	3:37
9	17:58	10:40			

Todas as publicações e todos os pedidos de patente citadas(os) neste relatório descritivo são aqui incorporadas(os) como referências como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente incorporada(o) como referência. A citação de qualquer publicação é para sua divulgação antes da data de depósito e não deve ser entendida como uma admissão de que a presente invenção não está autorizada para preceder tal publicação em virtude da invenção anterior.

Embora a invenção mencionada acima tenha sido descrita em algum detalhe por meio de ilustração e de exemplo para propósitos de clareza de entendimento, é prontamente evidente para aquelas pessoas ordinariamente

experientes na arte à luz dos ensinamentos desta invenção que certas modificações e mudanças podem ser feitas na mesma sem se desviarem do espírito ou do escopo das reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um extrato de proteína a partir de células fixadas ou não-fixadas, caracterizado pelo fato de compreender:

a) contatar ditas células com um reagente extrativo para produzir uma composição intermediária tendo um pH maior do que pH 10,0; e

b) contatar dita composição intermediária com um reagente neutralizador para reduzir dito pH de dita composição intermediária e produzir dito extrato de proteína,

sendo que um ou ambos de dito reagente extrativo e dito reagente neutralizador compreende(m) um polióxietileno-alquil-éter.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dito método compreende:

a) contatar ditas células com um reagente extrativo para produzir uma composição intermediária tendo um pH maior do que pH 10,0, sendo que dito reagente extrativo compreende um polióxietileno-alquil-éter; e

b) contatar dita composição intermediária com um reagente neutralizador para reduzir dito pH de dita composição intermediária e produzir dito extrato de proteína em um pH de 6-9.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dito método compreende:

a) contatar ditas células com um reagente extrativo para produzir uma composição intermediária tendo um pH maior do que pH 10,0; e

b) contatar dita composição intermediária com um reagente neutralizador para reduzir dito pH de dita composição intermediária e produzir dito extrato de proteína em um pH de 6-9, sendo que dito reagente neutralizador compreende um polióxietileno-alquil-éter.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de ser para extração de uma proteína viral alvo de uma amostra celular contendo células em que uma proteína viral alvo está presente ou suspeita de estar presente.

5. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado pelo fato de que dito polióxietileno-alquil-éter é um tensoativo Brij.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dito polióxietileno-alquil-éter é Brij 35.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o polióxietileno-alquil-éter é Brij 35 e a concentração de dito Brij 35 no reagente extrativo está dentro 2-6% (v/v).

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que dito reagente extrativo adicionalmente compreende NaOH 0,1 N, Citrato de Trissódio 50 mM, e tem um pH de 12,5 a 12,9.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que dito reagente extrativo adicionalmente compreende detergente Triton ou detergente Tween, ou sua mistura, opcionalmente detergente Triton X-100 ou detergente Tween-20.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a concentração de dito detergente Triton X-100 ou TWEEN-20 ou de ambos, está dentro de 1-6% (v/v).

11. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 4, caracterizado pelo fato de que o reagente neutralizador é um tampão baseado em Tris.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as amostras são incubadas:

(a) em pelo menos 10 minutos após a adição do reagente extrativo, ou

(b) entre 10 e 30 minutos após a adição do reagente extrativo, ou

(c) pelo menos 10 minutos após a adição do reagente neutralizador, ou

(d) entre 10 e 30 minutos após a adição do reagente neutralizador.

13. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as amostras são incubadas:

(a) entre 10 e 30 minutos após a adição do reagente extrativo, ou

(b) entre 10 e 30 minutos após a adição do reagente neutralizador.

14. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que dito tensoativo Brij é um ou mais de Brij 35 polióxietileno-(23)-lauril-éter, $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=23)$; Brij 30 polióxietileno-(4)-lauril-éter $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=4)$; Brij 52, polióxietileno-(2)-cetil-éter $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=2)$; Brij 56 polióxietileno-(10)-cetil-éter $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=10)$; Brij 58, polióxietileno-(20)-cetil-éter $(\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=20)$; Brij 72 polióxietileno-(2)-estearil-éter, $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=2)$; Brij 76, polióxietileno-(10)-estearil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=10)$; Brij 78 polióxietileno-(20)-estearil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=20)$; Brij 92, polióxietileno-(2)-oleil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=2)$; Brij 93, polióxietileno-(2)-oleil-éter; $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=2)$; Brij 97, polióxietileno-(10)-oleil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=10)$; Brij 98, polióxietileno-(20)-oleil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=20)$; Brij 700, polióxietileno-(100)-estearil-éter, $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{21}\text{OH}, n=100)$; ou Brij 721, polióxietileno-(21)-estearil-éter $(\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}, n=21)$.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

as ditas células fixadas ou não-fixadas são compreendidas em

uma amostra celular, em que a amostra celular opcionalmente contem células removidas de um sujeito, e em que a amostra celular contem ou é suspeita de conter uma proteína alvo.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que dito pH está dentro da faixa de pH 11,0 a pH 13,0.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente extrativo compreende ainda um desnaturante, em que o referido desnaturante é sulfato dodecil de sódio (SDS), ureia ou sarcosil.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de filtrar o extrato proteico através de um filtro.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o filtro tem um tamanho de poro de entre 0,1 μm e 50,0 μm , ou em que o filtro é compreendido de polietileno, polipropileno, poli(4-metil-estireno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), raíom, náilon, poli(butirato de vinila), poli(difluoreto de vinilideno) (PVDF), silicones, poliformaldeído, celulose, acetato de celulose, nitro-celulose, papel de filtro de fibra de vidro, poli(cloreto de vinila), poli(acetato de vinila), copolímeros de acetato de vinila e cloreto de vinila, poliamida, policarbonato, orlon, poliéster, poliestireno ou qualquer combinação dos mesmos.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida proteína alvo é previamente conhecida ou de alguma forma descrita e o método compreende adicionalmente compreender testar a presença da referida proteína em dito extrato de proteína.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que dito teste:

utiliza um agente capturador para dita proteína alvo, ou

utiliza uma citometria com esferas ordenadas (CBA), um

ensaio multiplexado baseado em esferas ou um ensaio imunológico.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que dito ensaio:

é ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) ou

é um ensaio imunocromatográfico ou ensaio de fluxo lateral (LF), que opcionalmente utiliza partículas de ouro conjugadas a anticorpos monoclonais; ou

utiliza anticorpos monoclonais marcados fluorescentemente; ou;

utiliza partículas quimioluminescentes, partículas de látex tingidas / coloridas, partículas de SERS Raman, núcleos de ouro revestidos de sílica com vários corantes repórter, ou núcleos de prata revestidos de sílica com corantes repórter; ou

utiliza consecutivamente um ou mais anticorpos monoclonais.

23. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as células na amostra celular são fixadas com um fixador químico, opcionalmente selecionado do grupo consistindo de alcoóis, aldeídos, cetonas, tetróxido de ósmio, ácido acético, ácido pícrico, sais de íon de metal pesado, e propileno-glicol.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o álcool é metanol ou etanol; o aldeído é glutaraldeído ou formaldeído; e a cetona é acetona.

25. Método de acordo com a reivindicação 15 ou 23, caracterizado pelo fato de que as referidas células fixadas estão presentes em um meio de transporte compreendendo metanol ou etanol.

26. Método de acordo com a reivindicação 20 ou 23, caracterizado pelo fato de que as referidas células fixadas ou não fixadas são células cervicais.

27. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado

pelo fato de que ditas células fixadas ou não-fixadas são recebidas de uma localização remota antes de dita etapa de contato a), e, opcionalmente, em que o método adicionalmente compreende d) comunicar resultados de dito teste com uma localização remota.

28. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a proteína viral alvo é codificada por um vírus patogênico.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o vírus patogênico é selecionado do grupo consistindo de HIV, vírus Ebola, vírus Marburg, vírus da hepatite, vírus sincicial respiratório (RSV), vírus do herpes simples (HSV), e vírus do papiloma de humano (HPV).

30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 15 e 28, caracterizado pelo fato de que a proteína viral alvo é proteína E6 ou E7 de HPV.

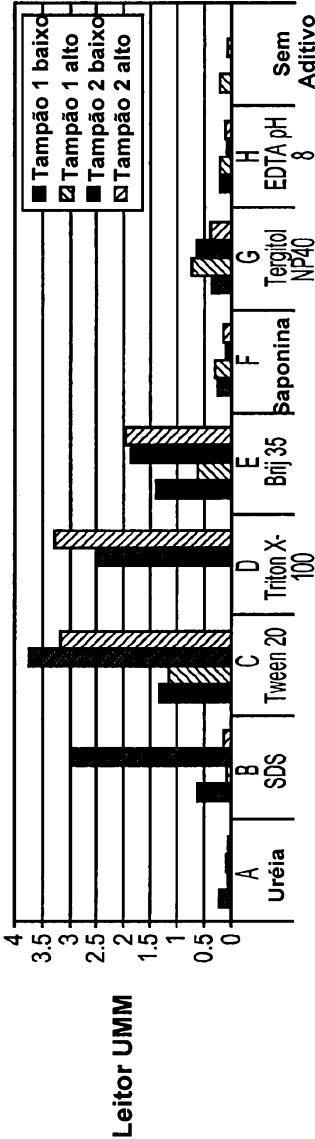
31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o HPV é uma cepa de HPV 4, 6, 11, 20, 24, 28, 36, 48, 50, 16, 18, 31, 35, 30, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 58, 33, 66, 68, 69, 26, 53, 73 ou 82; ou em que o HPV é uma cepa de HPV oncogênica selecionada do grupo consistindo de HPV 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 68, HPV 69, e HPV 82.

32. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente detectar a presença da proteína viral alvo no extrato, em que opcionalmente a detecção utiliza um agente capturador para a proteína viral alvo.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a proteína alvo é proteína E6 de vírus do HPV e o agente capturador é um anticorpo contra a proteína E6; ou que a proteína alvo é proteína E6 de HPV e o agente capturador compreende um anticorpo contra a

proteína E6 e um polipeptídeo contendo um domínio PDZ; ou que a proteína alvo é proteína E6 de HPV e o agente capturador compreende um peptídeo BP ou AP; ou o domínio PDZ é o segundo domínio de MAGI-1, ou o domínio PDZ de DLG ou TIP1.

1A Efeito de aditivos, antes da neutralização, sobre 520 pg de MPB E6 em LF, dups



Aditivo

FIG. 1A

Aditivos APÓS neutralização, média de dups, 520 pg de MBP.16E6/tira

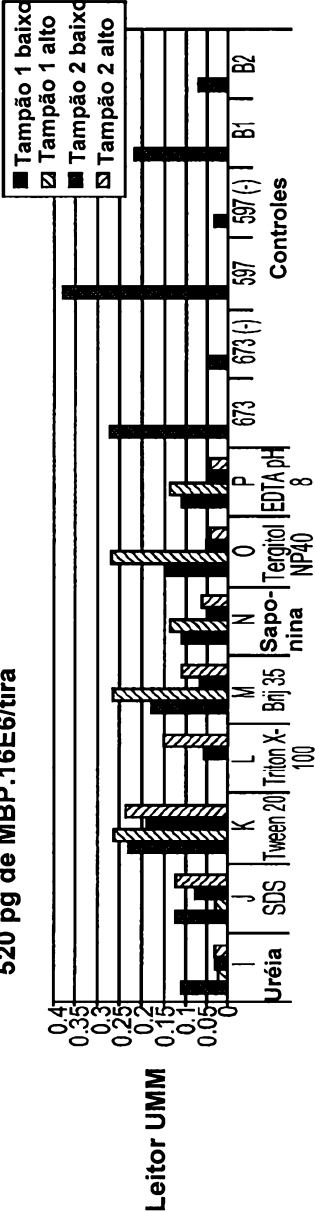


FIG. 1B

Extração em pH alto (sem Tampão 2) de células SiHa e C33A-,
1,7M/tira. Vários aditivos pré-neutralização

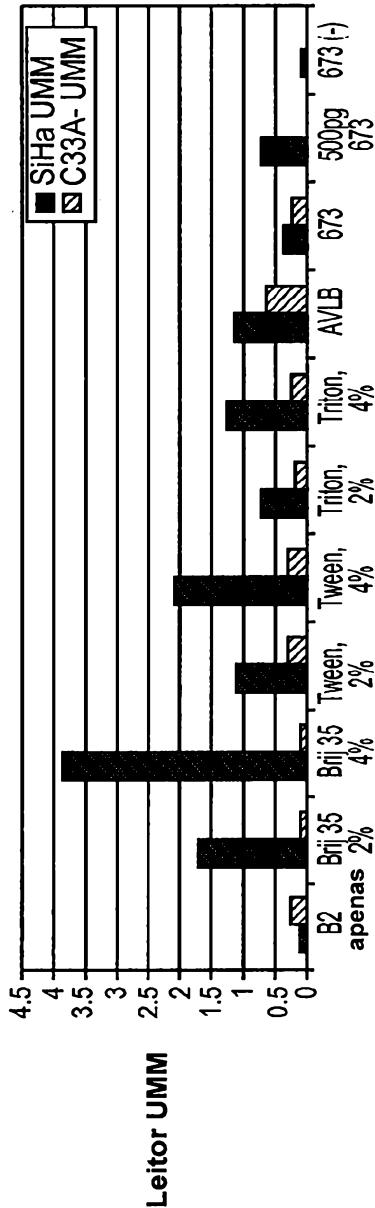
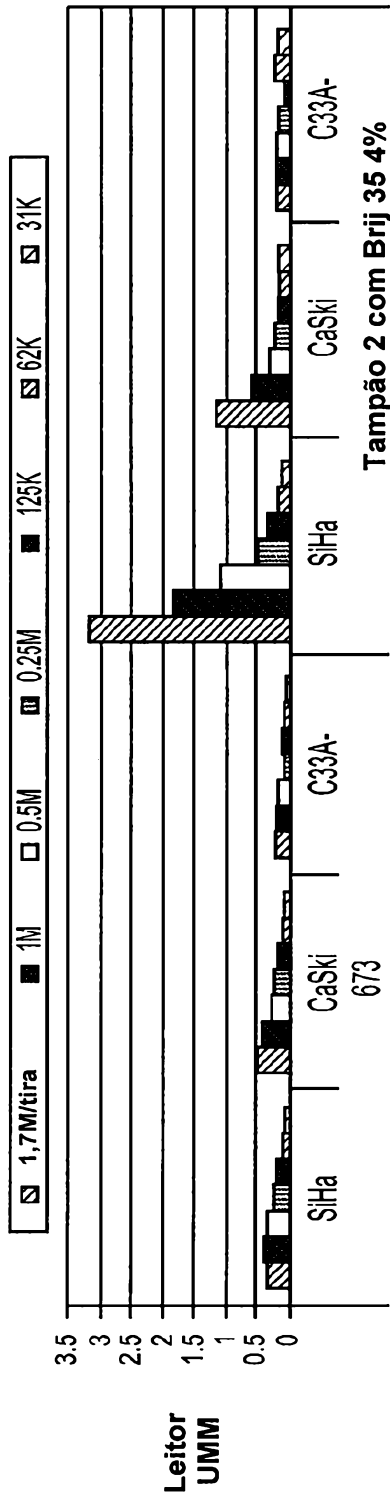


FIG. 2

Curvas de titulação sobre ensaio de fluxo lateral. Várias
linhagens celulares, e comparação de tampão de extração



Linhagem celular e reagente de extração

FIG. 3

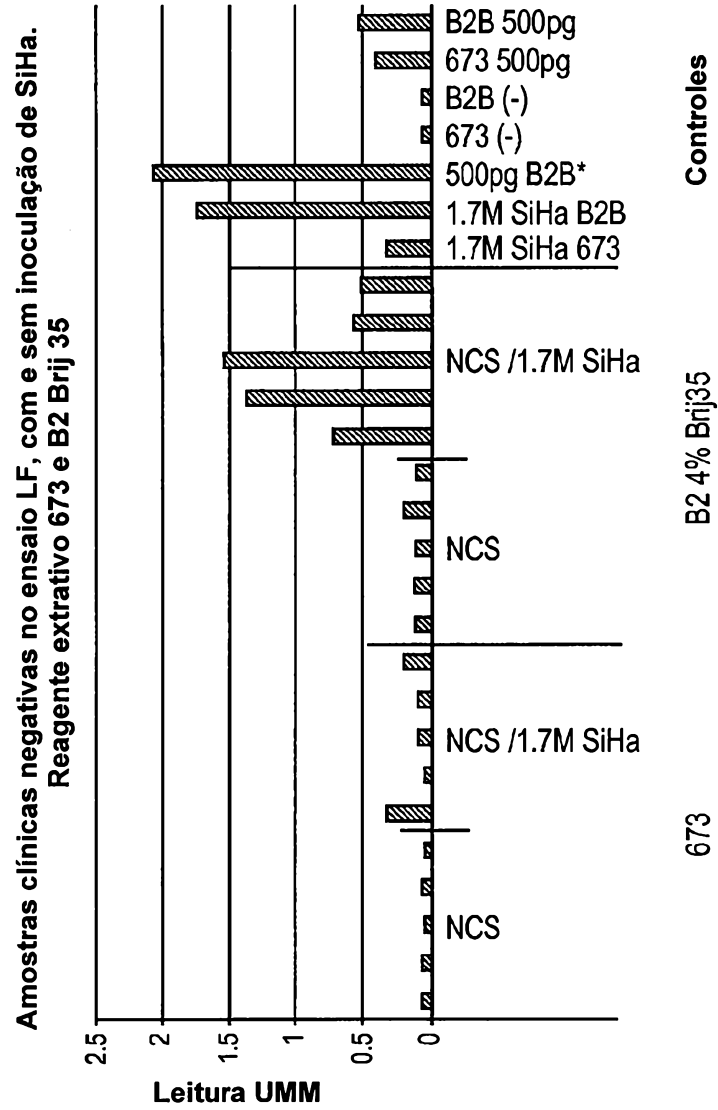


FIG. 4

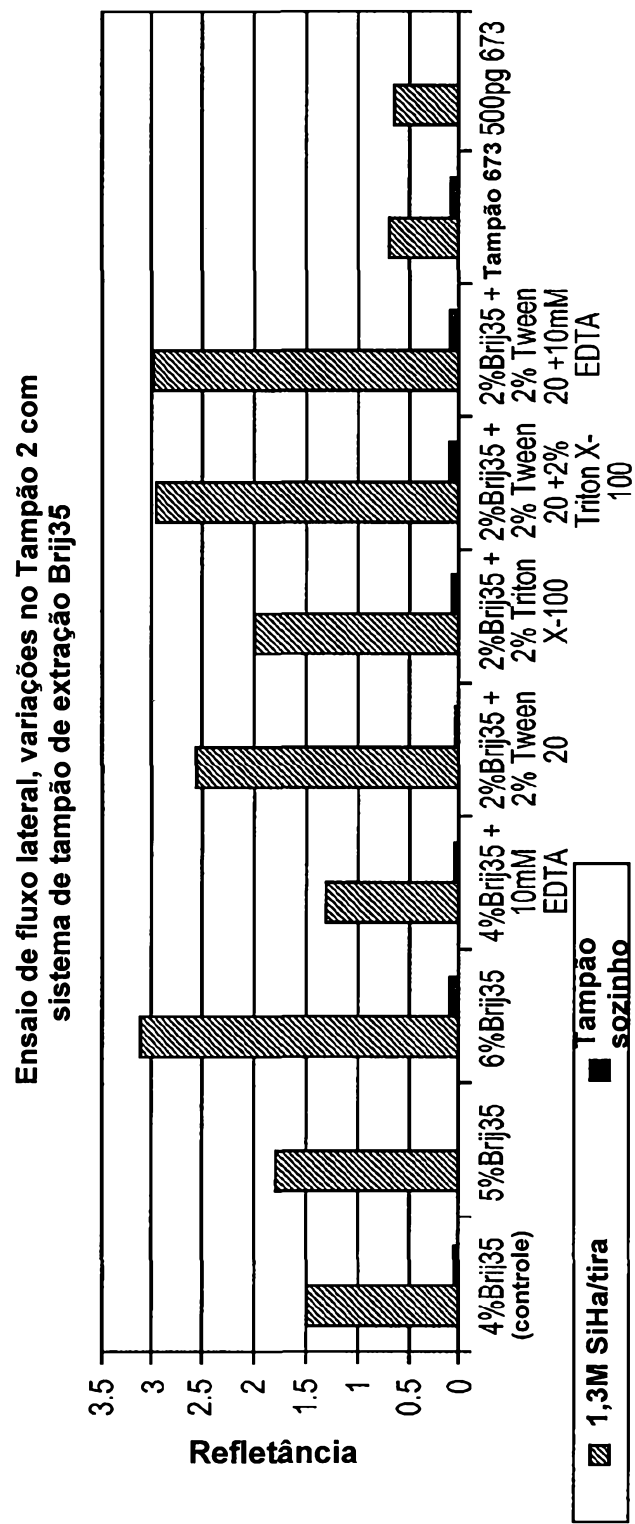


FIG. 5

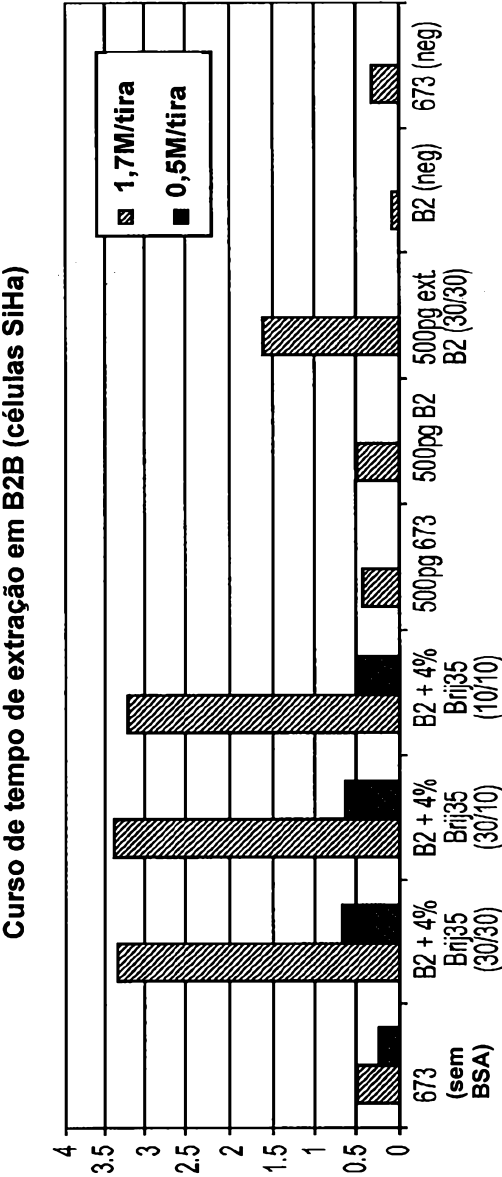
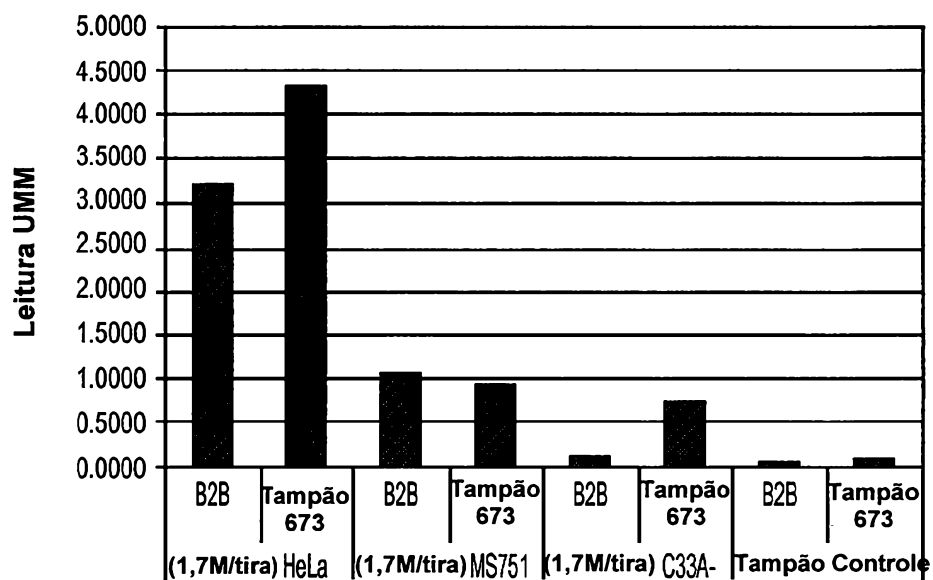


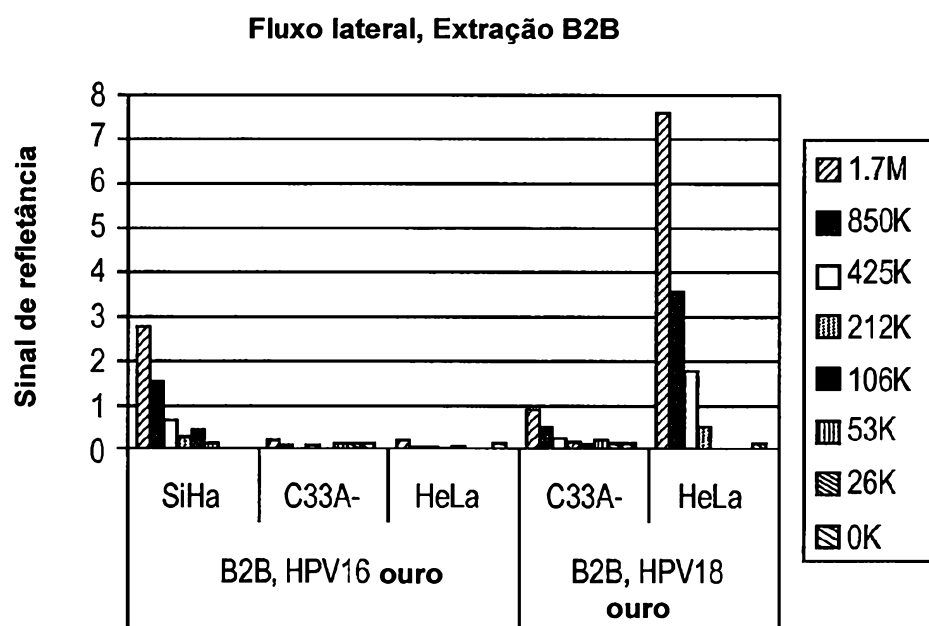
FIG. 6

Comparação de tampão de extração / HPV18 F82-5A2-Au



		Rep1	Rep2	Avg
(1,7M/tira) HeLa	B2B	2.8818	3.4913	3.1866
	Tampão 673	4.2152	4.4020	4.3086
(1,7M/tira) MS751	B2B	1.0815	0.9916	1.0366
	Tampão 673	0.9369	0.9525	0.9447
(1,7M/tira) C33A-	B2B	0.1212	0.1096	0.1154
	Tampão 673	0.7634	0.7127	0.7381
Tampão Controle	B2B	0.0242	0.0214	0.0228
	Tampão 673	0.0676	0.0688	0.0682

FIG. 7



	B2B, HPV16 ouro			B2B, HPV18 ouro	
	SiHa	C33A-	HeLa	C33A-	HeLa
1.7M	2.7635	0.1758	0.1603	0.8636	7.5196
850K	1.4815	0.0777	0.0371	0.4619	3.4994
425K	0.6864	0.0563	0.0535	0.2534	1.6621
212K	0.3145	0.09	0.0316	0.1708	0.5117
106K	0.4132	0.0125	0.0319	0.0892	
53K	0.1072	0.0262	0.0164	0.1804	
26K	0.0662	0.0498	0.0234	0.1006	
0K	0.03316	0.0332	0.03316	0.10485	0.10485

FIG. 8

Tampão 2 com otimização de tampão com Brij35 usando
1,7M de células SiHa ou C33A-/tira

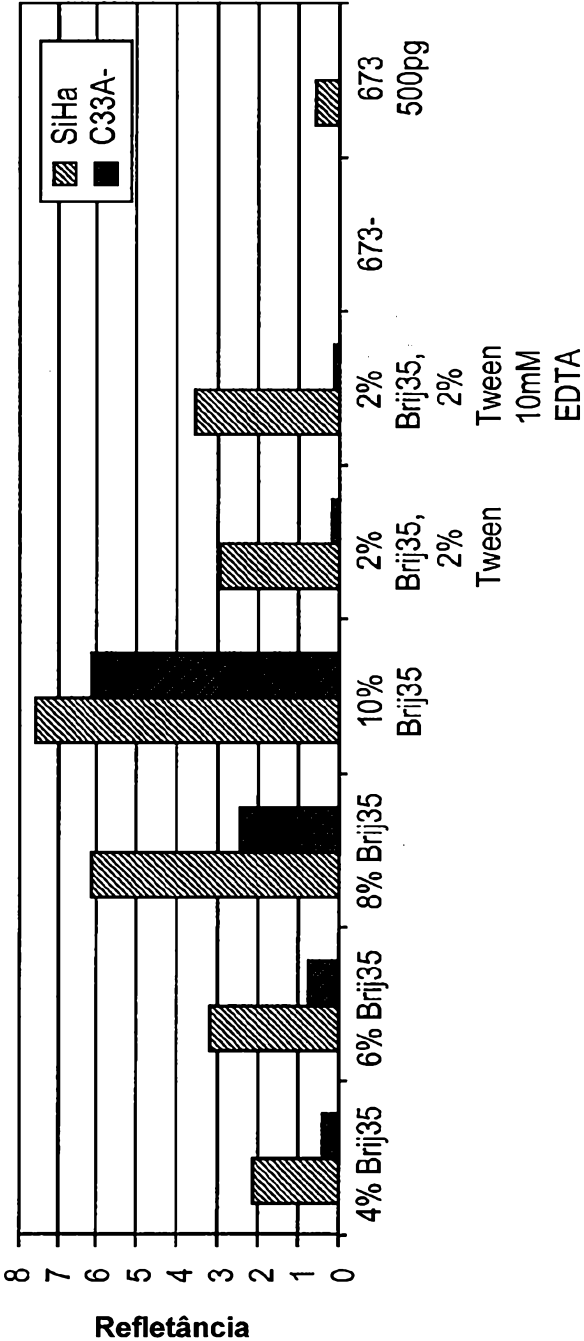
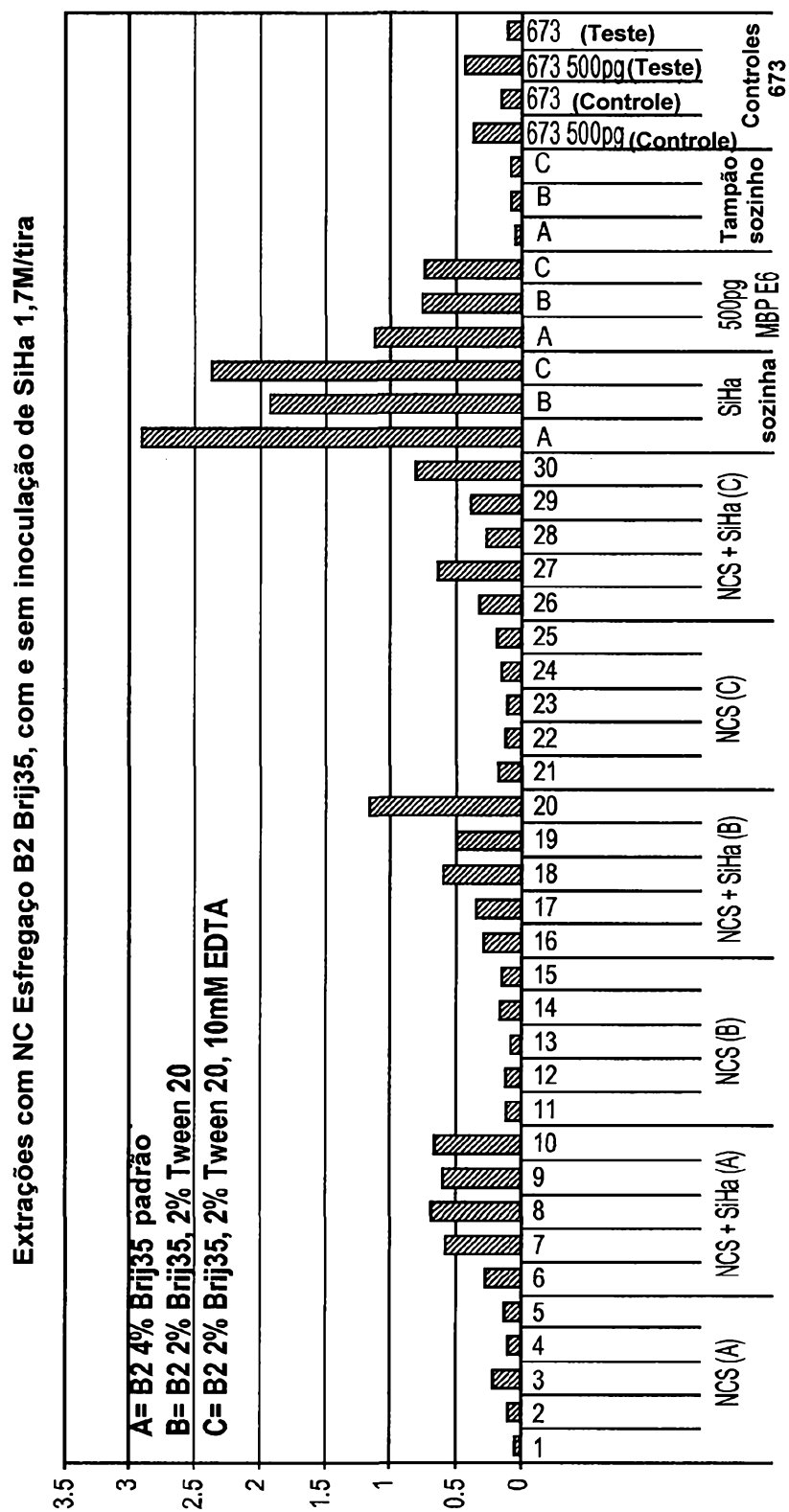


FIG. 9

**FIG. 10**

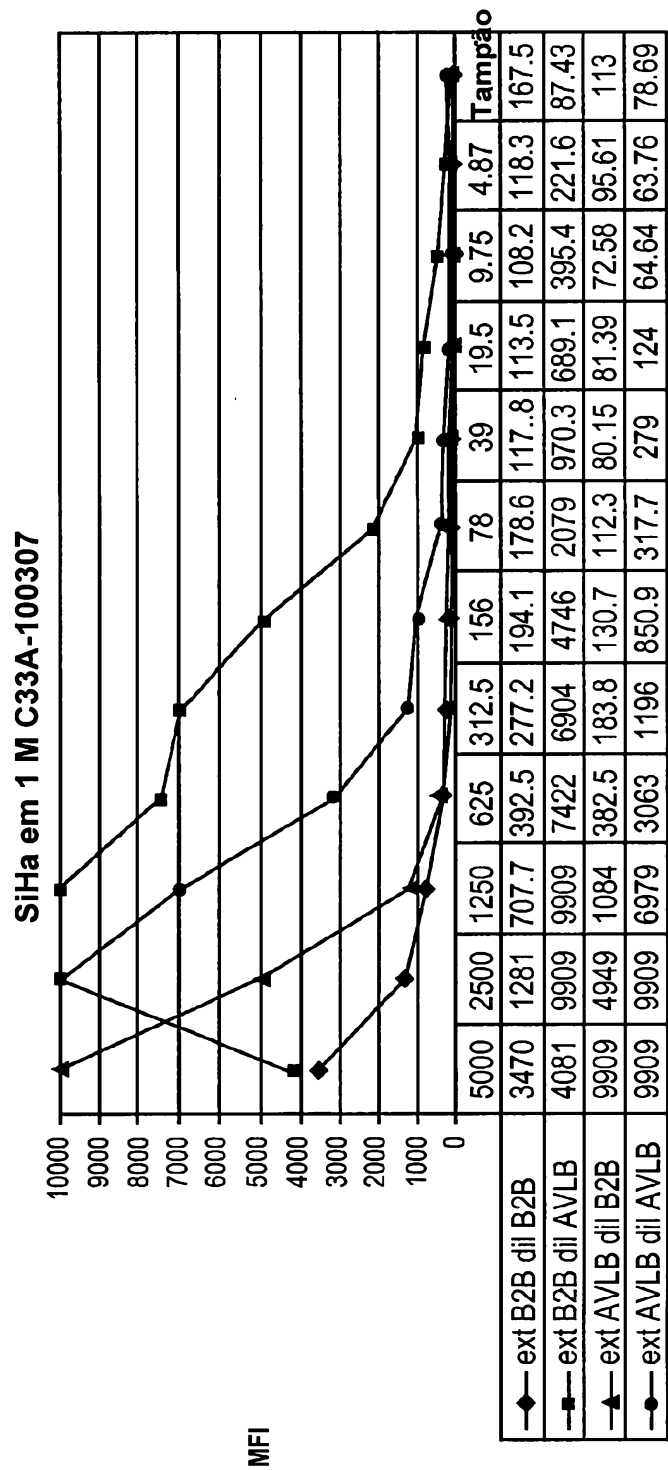


FIG. 11

Extração B2B de células fixadas em ensaio LF

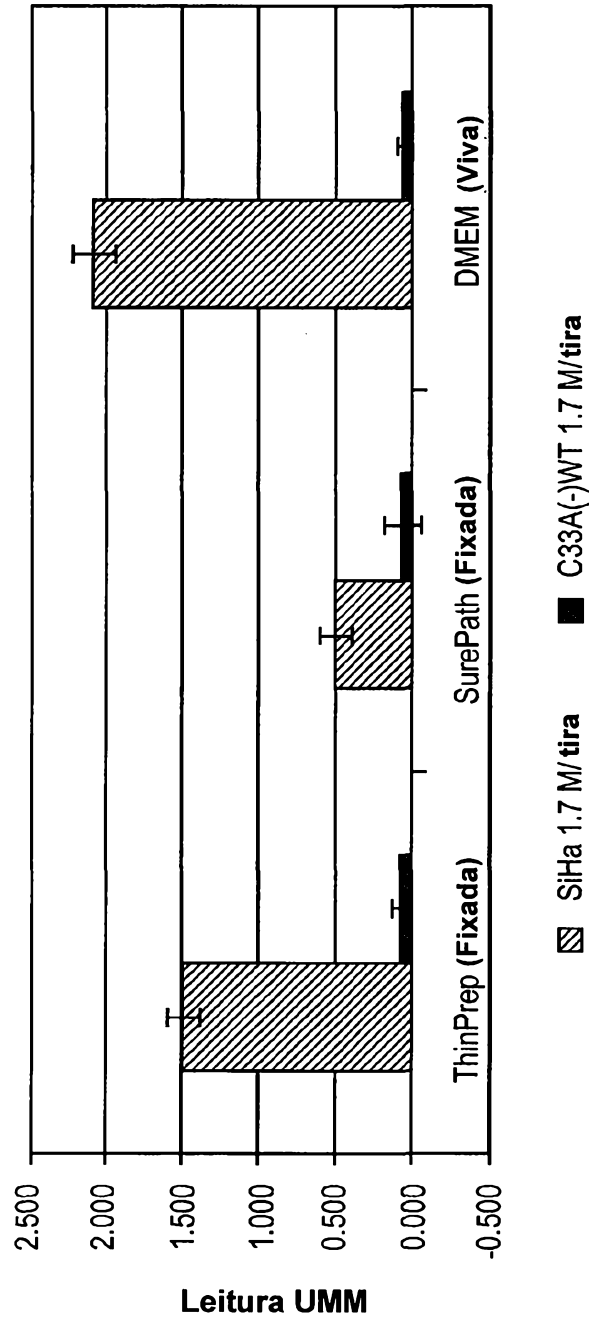


FIG. 12

Avaliação de filtração de amostra - Leitura visual

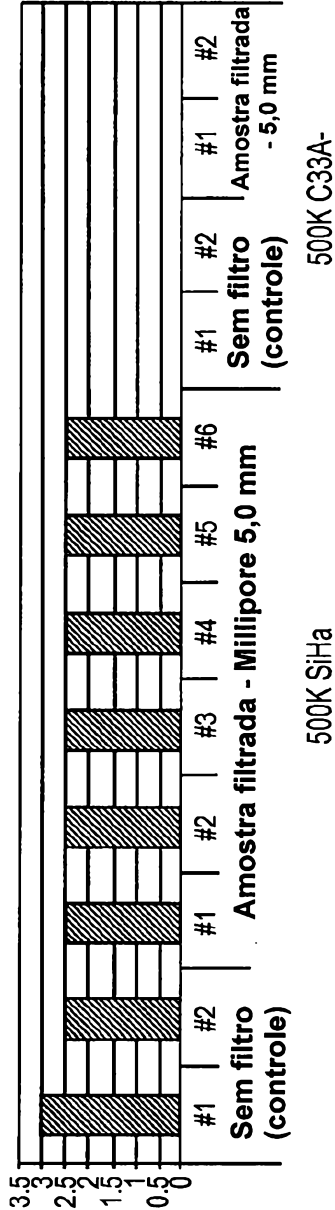


FIG. 13