

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 456 341**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008 E 08850323 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2222838**

(54) Título: **Método de extracción eficaz de proteínas a partir de células**

(30) Prioridad:

14.11.2007 US 985547

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.04.2014

(73) Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (50.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes New Jersey 07417, US y
ARBOR VITA CORPORACIÓN (50.0%)

(72) Inventor/es:

MALICK, ADRIEN P.;
CREWS, VIRGINIA M.;
ROSALES, JULIE L.;
FERGUSON, CARRIE S.;
BRUTON, JEFF H.;
BEADENKOPF, ROBERT J. y
MANTLO, JOHN

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 456 341 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de extracción eficaz de proteínas a partir de células

5 Antecedentes de la invención

En muchos métodos de diagnóstico, se toman células de un sujeto y se depositan en un medio líquido que contiene un fijador. Las células se fijan en el medio y se examinan citológicamente para proporcionar un diagnóstico. Por ejemplo, la detección de células precancerosas o cancerosas en tejidos del cuello uterino se realiza habitualmente mediante evaluación microscópica de células exfoliadas del cuello uterino. Este método, desarrollado por George N. Papanicolaou y conocido como el ensayo de "Pap", implica exfoliar células a partir del cuello uterino de una mujer usando un dispositivo de muestreo, depositar las células exfoliadas en un medio de transporte que contiene un fijador, y a continuación depositar las células en un portaobjetos. A continuación, las células se tiñen y las anomalías celulares son examinadas por un profesional médico capacitado mediante microscopía de luz. Solamente en los Estados Unidos cada año se realizan más de 55 millones de ensayos de Pap.

A pesar del éxito de dichos ensayos citológicos, los ensayos son propensos al error. Por ejemplo, se ha estimado que hasta un 40 % de los ensayos convencionales de Pap se ven comprometidos por la presencia de contaminantes tales como glucosa, células sanguíneas y células inflamatorias de ocultación. Estos contaminantes conducen a resultados de falso negativo, asustados de falso positivo, y una cantidad significativa de trabajo de seguimiento. Véase, por ejemplo, Koss, L. G. (1989), The Papanicolaou Test for Cervical Cancer Detection: A Triumph and a Tragedy, JAMA 261: 737-743; véase también DeMay, "Problems in Pap Smear Interpretation", Arch. Pathol. Lab. Med. 121: 229-23 (1997).

25 En vista de lo anterior, existe una necesidad de métodos de diagnóstico molecular complementarios para el análisis de células que están presentes en un medio líquido que contiene un fijador. Sin embargo, dichos métodos no son sencillos debido a que no siempre es posible realizar dichos métodos en células fijadas. Por ejemplo, determinados fijadores (por ejemplo, los medios de transporte usados en sistemas de ensayo como THINPREP™ o SUREPATH™) pueden hacer que proteínas celulares en particular precipiten o se agreguen, haciendo de este modo 30 que estas proteínas sean insolubles y difíciles o imposibles de detectar de forma fiable usando medios convencionales, por ejemplo, usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otro ensayo inmunológico.

35 El documento WO0057906 desvela el desensamblaje de VLP del VPH con un tampón que tiene un pH de 7,0 a 10, preferentemente pH 8,0 y puede comprender un alquil éter de polioxietileno (pero preferentemente comprende Polisorbato 80), tras lo cual el pH se reduce.

El documento EP0363110 desvela un método para extraer antígenos del herpes, clamidia, y gonococos usando un pH elevado, es decir un pH de al menos 10. Después de la extracción, se añade un reactivo de neutralización.

40 Por lo tanto, existe una gran necesidad de métodos y composiciones para extraer proteínas a partir de células fijadas y sin fijar de una manera que les permita que sean adecuadas para su uso en ensayos de detección molecular, por ejemplo, inmunológicos. La invención que se describe en el presente documento satisface esta necesidad, y otras.

45 Sumario de la invención

Se proporcionan métodos para producir un extracto de proteínas a partir de células. En términos generales, los métodos implican: poner en contacto una muestra celular con un reactivo de extracción de pH elevado (mayor de pH 50 10) que comprende un alquil éter de polioxietileno (por ejemplo, Brij™35) para producir una composición intermedia que tiene un pH de pH 10,0 y a continuación, en presencia de un reactivo de neutralización, neutralizar el pH de la composición intermedia, por ejemplo, a un valor de pH de aproximadamente 6-9, opcionalmente a un valor de pH de 7-8,5, para producir el extracto de proteínas. Uno o ambos del reactivo de extracción y el reactivo de neutralización contiene un alquil éter de polioxietileno. Las células pueden ser células de cuello uterino que exfoliadas fijadas o sin fijar. En determinadas realizaciones, los métodos implican extraer una proteína viral diana tal como una proteína E6 55 del VPH a partir de una muestra celular. Determinadas realizaciones también proporcionan métodos para detectar la presencia de una proteína, tal como una proteína viral diana, que comprende producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar de acuerdo con el método que se ha descrito anteriormente y someter a ensayo la presencia de dicha proteína en dicho extracto de proteínas. Además, la invención proporciona un kit para producir un extracto de proteínas que comprende: un reactivo de extracción que tiene un pH mayor de pH 10,0, y un reactivo de neutralización en el que uno o ambos de dicho reactivo de extracción y dicho reactivo de neutralización comprende un alquil éter de polioxietileno tiene que dicho reactivo de extracción y agente de neutralización se pueden usar en el método que se ha descrito anteriormente para producir un extracto de proteínas adecuado para su uso en un ensayo de unión. Además, la invención proporciona un kit para producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar. El kit puede comprender adicionalmente componentes y/o reactivos para detectar la proteína diana en el extracto de proteínas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A demuestra el efecto sinérgico, en la detección de la proteína E6 extraída del VPH 16, del uso de un reactivo de extracción con un pH alto combinado con determinados aditivos. Se suspendió proteína E6 extraída del VPH 16 recombinante purificada previamente (MBP-E6) en reactivo de extracción y a continuación se neutralizó con reactivo de neutralización siguiendo el protocolo que se describe en el presente documento. La proteína E6 se capturó usando un ensayo de flujo lateral (LF) que se describe en el presente documento y se detectó con un lector de UMM.

La FIG. 1B apoya que la introducción de aditivos en la etapa de neutralización no tuvo un efecto tan fuerte como la introducción durante la etapa de extracción en la detección de la proteína E6 extraída del VPH 16.

La FIG. 2 demuestra la detección de proteína E6 del VPH 16 extraída a partir de células SiHa que expresan VPH 16 usando diversos aditivos en el reactivo de extracción.

La FIG. 3 demuestra el efecto que tiene la valoración de la concentración celular sobre la detección de la proteína E6 extraída del VPH 16. Se usaron líneas celulares, dos positivas para VPH y una negativa para VPH.

La FIG. 4 demuestra la extracción de la proteína E6 del VPH 16 a partir de muestras clínicas negativas sin fijar con adiciones de células SiHa que expresan VPH 16.

La FIG. 5 demuestra el efecto sobre la detección de la proteína E6 extraída del VPH 16 cuando la concentración de Brij™ 35 en el reactivo de extracción aumentan y cuando el Brij™ 35 se combina con otros detergentes no iónicos tales como Triton™ X-100 o Tween™-20.

La FIG. 6 demuestra el efecto sobre la detección de la proteína E6 extraída del VPH 16 cuando se usan tiempos variables para extracción y/o neutralización.

La FIG. 7 demuestra el uso de Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 a pH elevado para extracción de la proteína E6 derivada de las cepas del VPH 18 y 45.

La FIG. 8 demuestra un efecto de dosis-respuesta en la detección de la proteína E6 derivada de las cepas del VPH 16 y 18.

La FIG. 9 demuestra la optimización adicional de la concentración de Brij™ 35 (con o sin otros aditivos no iónicos) en el reactivo de extracción.

La FIG. 10 demuestra la optimización adicional de la concentración de Brij™ 35 (con o sin otros aditivos no iónicos) en el reactivo de extracción y el efecto en la extracción de la proteína E6 del VPH 16 a partir de muestras clínicas negativas sin fijar con adiciones de células que expresan el VPH.

La FIG. 11 demuestra un formato de matriz de perlas citométricas (CBA) para detectar la proteína E6 del VPH 16 extraída a partir de células SiHa que expresan el VPH.

La FIG. 12 demuestra el uso de Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 a pH elevado en la extracción de la proteína E6 del VPH 16 a partir de células fijadas o sin fijar.

La FIG. 13 demuestra que el citrato de la muestra a través de un filtro de jeringa de PVDF de 5,0 mm de Millipore no disminuye significativamente la señal de la muestra.

Definiciones

- A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado tal como normalmente lo entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Además, determinados elementos se definen a continuación con fines de claridad y facilidad de referencia.
- Los términos "muestra celular" o "muestra de célula", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición líquida que contiene una o más células de interés. Una muestra celular puede ser una muestra clínica que contiene células retiradas de (por ejemplo, diseccionadas o exfoliadas de) un individuo, que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, células de plasma, suero, líquido espinal, semen, líquido linfático, las secciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores, u órganos.
- En otras realizaciones, la muestra celular puede contener células cultivadas *in vitro* (que incluyen, pero no se limitan a células en medio de cultivo celular, células infectadas de forma viral, células recombinantes, etc.). En determinadas realizaciones, la muestra celular puede contener células que están en mayor riesgo de ser infectadas con el VPH. En estas realizaciones, las células se pueden obtener a partir de un cuello uterino, vulva, vagina, ano, pene, boca o garganta. En determinadas realizaciones, las células son de la membrana mucosa y pueden ser de origen epitelial. Una muestra celular puede contener o no contaminantes que no sean células exfoliadas o diseccionadas. Por ejemplo, en una muestra celular pueden estar presentes células de mucosa, o bacterianas, levadura o sangre.
- "VPH" es el virus del Papiloma humano, que incluye, pero no se limita a las cepas del VPH 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, y 82.
- Una "cepa de VPH oncongénico" es una cepa de VPH que se sabe que causa cáncer de cuello uterino tal como lo determina el National Cancer Institute (NCI, 2001).
- Una "proteína E6 oncongénica" es una proteína E6 codificada por una cepa de VPH oncongénico. Cepas oncongénicas a modo de ejemplo son: VPH 26, VPH 53, VPH 66, VPH 73, VPH 82, VPH 16, VPH 31, VPH

35, VPH 30, VPH 39, VPH 45, VPH 51, VPH 52, VPH 56, VPH 59, VPH 58, VPH 33, VPH 66, VPH 68, VPH 69, y VPH 82. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas E6 oncongénicas están depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. Sin desear estar ligado a teoría alguna, generalmente se cree que las cepas del VPH 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48, y 50 no son oncongénicas.

- 5 Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente. El término "polipéptido" incluye polipéptidos en los que la estructura principal convencional se ha reemplazado por estructuras principales de origen no natural o sintéticas, y péptidos en los que uno o más de los aminoácidos convencionales se han reemplazado con uno o más aminoácidos de origen no natural o sintéticos.
- 10 La expresión "proteína de fusión" o equivalentes gramaticales de la misma hace referencia a una proteína compuesta por una pluralidad de componentes polipeptídicos, que si bien no están unidos en su estado nativo, se unen por sus respectivos extremos amino y carboxilo a través de un enlace peptídico para formar un solo polipéptido continuo. Las proteínas de fusión pueden ser una combinación de dos, tres o incluso cuatro o más proteínas diferentes. El término polipéptido incluye proteínas de fusión, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heterólogos, fusiones con secuencias directoras heterólogas y homólogas, con o sin restos de metionina N-terminal; proteínas marcadas de forma inmunológica; proteínas de fusión con asociados de fusión detectables, por ejemplo, proteínas de fusión que incluyen como un asociado de fusión una proteína fluorescente, β-galactosidasa, luciferasa, y similares.
- 15
- 20 En general, los polipéptidos pueden ser de cualquier longitud, por ejemplo, más de 2 aminoácidos, más de 4 aminoácidos, más de aproximadamente 10 aminoácidos, más de aproximadamente 20 aminoácidos, más de aproximadamente 50 aminoácidos, más de aproximadamente 100 aminoácidos, más de aproximadamente 300 aminoácidos, normalmente hasta aproximadamente 500 o 1000 o más aminoácidos. Los "péptidos" normalmente tienen más de 2 aminoácidos, más de 4 aminoácidos, más de aproximadamente 10 aminoácidos, más de aproximadamente 20 aminoácidos, normalmente hasta aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, los péptidos tienen entre 5 y 30 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos pueden ser naturales por que pueden estar codificados por el genoma de un organismo o virus, o no naturales por que no son de origen natural.
- 25
- 30 La expresión "agente de captura" se refiere a un agente que se une a una proteína a través de una interacción que es suficiente para permitir que el agente una y concentre a la proteína a partir de una mezcla homogénea de diferentes proteínas. Por consiguiente, el término "agente de captura" se refiere a una molécula o un complejo polimolecular que se puede unir específicamente a un analito, por ejemplo, se une específicamente a un analito con el agente de captura, con una constante de disociación (K_D) inferior a aproximadamente 10^{-6} M sin unirse a otras dianas. La interacción de unión puede estar mediada mediante una región de afinidad del agente de captura. Agentes de captura representativos incluyen anticuerpos (incluyendo fragmentos y miméticos de los mismos) y proteínas que contienen el dominio PDZ, etc.
- 35
- 40 La expresión "unión específica" se refiere a la capacidad de un agente de captura para unirse preferentemente a una proteína en particular que está presente en una mezcla homogénea de diferentes proteínas. En determinadas realizaciones, una interacción de unión específica discriminará entre una proteína en particular y otros proteínas en una muestra, en algunas realizaciones más de aproximadamente 10 a 100 veces o más (por ejemplo, más que aproximadamente 1000 o 10.000 veces).
- 45 La expresión "agente de captura/complejo proteico" es un complejo que resulta de la unión específica de un agente de captura con una proteína, es decir, un "par de asociados de unión". Un agente de captura y una proteína para el agente de captura se unen específicamente entre sí en "condiciones adecuadas para la unión específica", en la que dichas condiciones son condiciones (en términos de concentración de sales, pH, detergente, concentración de proteínas, temperatura, etc.) que permiten que se produzca la unión entre agentes de captura y proteínas que se unen en la solución. Dichas condiciones, particularmente con respecto a anticuerpos y sus antígenos, son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). En determinadas realizaciones, la afinidad entre un agente de captura y proteínas que están unidas específicamente en un agente de captura/complejo proteico se caracteriza por una K_D (constante de disociación) menor que 10^{-6} M, menor que 10^{-7} M, menor que 10^{-8} M, menor que 10^{-9} M, o menor que aproximadamente 10^{-10} M.
- 50
- 55
- "Asociados de unión" y equivalentes hacen referencia a pares de moléculas que se pueden encontrar en un agente de captura/complejo analito, es decir, presentan unión específica entre sí.
- 60 Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un agente de captura que tiene al menos un dominio de unión a epítopos de un anticuerpo. Estos términos son bien entendidos por los expertos en la materia, y hacen referencia a una proteína que contiene uno o más polipéptidos que se unen específicamente a un antígeno. Una forma de anticuerpo constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de anticuerpos, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada son responsables en conjunto de la unión a un antígeno, y las soluciones constantes son
- 65

responsables de las funciones efectoras de anticuerpos.

Los polipéptidos reconocidos de inmunoglobulina incluyen las cadenas ligeras kappa y lambda y las cadenas pesadas alfa, gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, epsilon y mu o equivalentes en otras especies. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud total (de aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos)

- 5 comprenden una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos en el extremo de NH₂ y una región constante a kappa o lambda en el extremo de COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud total (de aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos), comprenden de forma similar una región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos) y una de las regiones constantes de cadena pesada que se han mencionado anteriormente, por ejemplo, gamma (de aproximadamente 330 aminoácidos).
- 10

Los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos o inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos que retienen la unión específica al antígeno, que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de Fab, Fv, scFv, y Fd, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de una sola

- 15 cadena, y proteínas de fusión que comprenden una porción de unión antígenos del anticuerpo y una proteína de no anticuerpo. Los anticuerpos se pueden marcar de forma detectable, *por ejemplo*, con un radioisótopo, una enzima que genera un producto detectable, una proteína fluorescente protein, y similares. Los anticuerpos pueden estar conjugados adicionalmente con otros restos, tales como miembros de pares de unión específica, por ejemplo, biotina (miembro del par de unión específica biotina-avidina), y similares. Los anticuerpos también se pueden unir a un

- 20 soporte sólido, que incluye, pero no se limita, placas o perlas de poliestireno, partículas coloidales de oro, y similares. Además, en los términos están incluidos Fab', Fv, F(ab')₂, y/u otros fragmentos de anticuerpos que retienen unión específica a antígenos. Además, se pueden usar anticuerpos en conjunto con partículas detectoras que se pueden amplificar.
- 25

Los anticuerpos pueden existir en otras diversas formas que incluyen, por ejemplo, Fv, Fab, y (Fab')₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales (es decir biespecíficos) (por ejemplo Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879-5883 (1988) y Bird et al., Science, 242, 423-426 (1988), que se incorporan en el presente documento por referencia). (Véase, generalmente, Hood et al., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2^a ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature, 323, 15-16 (1986)). Los anticuerpos monoclonales y anticuerpos de "presentación de fagos" son bien conocidos en la técnica y están incluidos en el término "anticuerpos".

30

El término "evaluación" incluye cualquier forma de medida, e incluye determinar si un elemento está presente o no. Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar" y "someterá ensayo" se usan indistintamente y pueden incluir determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La evaluación puede ser relativa o absoluta. "Evaluar la presencia de" incluye determinar la cantidad de algo presente, y/o determinar si está presente o ausente.

35

Por "posición lejana" se hace referencia a una posición distinta de la oposición a la que se obtienen las células y se depositan en un líquido que contiene fijador. Por ejemplo, una posición lejana podría ser una habitación diferente en el mismo edificio en el que se obtienen las células (por ejemplo, otro laboratorio), un edificio diferente en el mismo complejo de edificios a la vez que se obtienen las células, o una posición diferente en la misma ciudad, estado o país, etc. Cuando se indica que una muestra celular se "recibe" desde una posición lejana, la muestra celular se puede obtener a partir de la posición lejana o entregar en mano, por correo o mensajero desde la posición lejana, por ejemplo.

40

45 Información "de comunicación" se refiere a cualquier medio para obtener la información desde una posición a la siguiente, ya sea mediante material impreso transportado físicamente o medios de lectura por ordenador que contienen la información (por ejemplo, por correo electrónico), o transmitiendo la información. Si la información se transmite, una señal digital o análoga que representa la información (por ejemplo, una señal electromagnética tal como una señal de luz o eléctrica) se transmite sobre un canal de comunicación adecuado (por ejemplo, una red privada, pública o inalámbrica). Cualquier medio conveniente se puede usar para transmitir los datos, por ejemplo, fax, módem, internet, correo electrónico, etc.

50

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "medio de transporte" se usa para describir líquidos adecuados para recoger células y la conservación de esas células de una manera que les permita que sean adecuadas para estudios citológicos basados en líquidos. Normalmente se usan medios de transporte en el ensayo de Pap. Las células depositadas en un medio de transporte se pueden transportar o no de una posición a otra en ese medio. Los medios de transporte contienen fijadores. La deposición de células en un medio de transporte fija las células para producir células fijadas. Medios de transporte representativos incluyen los medios de transporte SUREPATH™ o PRESERVCYT™.

55

Una "célula fijada" es una célula que ha sido tratada con y conservada citológicamente con un fijador químico. Las células fijadas normalmente son adecuadas para tinción y posterior análisis morfológico y/o citológico mediante microscopía con luz.

60

Descripción detallada de la invención

Aunque en el presente documento se han mostrado y descrito realizaciones preferentes de la presente invención, será evidente para los expertos en la materia que dichas realizaciones se proporcionan solamente a modo de ejemplo.

Los expertos de la materia idearán ahora numerosas variaciones, cambios, y sustituciones sin apartarse de la invención. Se debería entender que se pueden usar diversas alternativas a las realizaciones de la invención que se describen en el presente documento en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definen el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes sean cubiertos con las mismas.

Se proporcionan métodos para producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar. En términos generales, los métodos implican: poner en contacto una muestra celular con un reactivo de extracción a pH elevado (mayor de pH 10) que comprende un alquil éter de polioxietileno (por ejemplo, Brij™ 35) para producir una composición intermedia que tiene un pH mayor de pH 10,0 y a continuación, en presencia de un reactivo de neutralización, neutralizar el pH de la composición intermedia para producir el extracto de proteínas. Uno o ambos del reactivo de extracción y el reactivo de neutralización contienen el alquil éter de polioxietileno. En determinadas realizaciones, las células pueden ser células del cuello uterino fijadas o sin fijar. Además, se proporcionan kits y composiciones para poner en práctica los métodos en cuestión. Los métodos en cuestión encuentran su uso en diversas aplicaciones diferentes, que incluyen ensayos de diagnóstico que detectan proteínas en particular en el extracto de proteínas resultante.

Antes de que la invención en cuestión se describa adicionalmente, se debe entender que la invención no está limitada a las realizaciones en particular de la invención que se describen a continuación, de modo que se pueden hacer variaciones de las realizaciones en particular y que además entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, se debe entender que la terminología usada es para el fin de describir realizaciones en particular, y no pretende ser limitante. En su lugar, el alcance de la presente invención se establecerá con las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad de límite inferior a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de sus intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños, y también están incluidos dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen a cualquiera o ambos de sus límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como lo entiende normalmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquiera de los métodos, dispositivos y materiales similares equivalentes a los que se describen en el presente documento se pueden usar en la práctica o en el ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferentes se describen a continuación.

Tal como se ha resumido anteriormente, la invención en cuestión proporciona métodos y composiciones para producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar. En la descripción de la invención con mayor detalle, los métodos se describen primero seguido de una descripción de los kits para su uso en la puesta en práctica de los métodos en cuestión.

Métodos de extracción de proteínas

Tal como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un método para producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar. En general, los métodos implican dos etapas: a) poner en contacto las células fijadas o sin fijar con un reactivo de extracción que tiene un pH que es mayor de pH 10,0 para producir una composición intermedia que tiene un pH mayor de pH 10,0 y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización. El reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización comprende un alquil éter de polioxietileno. El extracto de proteínas resultante contiene un alquil éter de polioxietileno y tiene un pH que es neutro (es decir, entre aproximadamente pH 7,0 y aproximadamente pH 8,0). Los métodos producen generalmente un extracto de proteínas que contiene proteínas que se pueden detectar fácilmente usando agentes de captura para esas proteínas. Como tal, un extracto de proteínas producido con los presentes métodos es generalmente adecuado para su uso en ensayos de unión, por ejemplo, ensayos inmunológicos, para detección de esas proteínas.

En determinadas realizaciones, los métodos incluyen: a) poner en contacto las células con un reactivo de extracción que comprende un alquil éter de polioxietileno y un pH elevado para producir una composición intermedia que tiene un pH mayor de pH 10,0, y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización para

neutralizar dicho pH de la composición intermedia y producir el extracto de proteínas. Dado que, tal como se ha mencionado anteriormente, el alquil éter de polioxietileno puede estar presente en el reactivo de extracción o el reactivo de neutralización (o tanto en el reactivo de extracción como en el reactivo de neutralización), determinadas realizaciones de los presentes métodos incluyen a) y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización que comprende un alquil éter de polioxietileno para neutralizar dicho pH de la composición intermedia y producir el extracto de proteínas.

En determinadas realizaciones, el extracto de proteínas producido con los presentes métodos debe contener más proteína que sea accesible para capturar agentes que un extracto de proteínas preparado usando otros métodos, por ejemplo, métodos que no usan: una etapa de extracción a pH elevado (es decir, una etapa que aumenta el pH a mayor de pH 10,0 o pH 11,0), una etapa de neutralización (es decir, una etapa que ajusta el pH de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,0) y un alquil éter de polioxietileno. Ni el pH solo ni un alquil éter de polioxietileno solo producen dicho extracto de proteínas. En realizaciones en particular, el reactivo de extracción a pH elevado solubiliza proteínas en las células fijadas o sin fijar, mientras que el alquil éter de polioxietileno impide que las proteínas solubilizadas en la composición intermedia se vuelvan a agregar o precipiten a medida que el pH de la composición intermedia se neutraliza.

Los reactivos usados en los presentes métodos y el extracto de proteínas producido con los presentes métodos se describen con mayor detalle a continuación, ya que es una descripción de cómo se pueden usar los reactivos para producir el extracto de proteínas. Tal como se analizará a continuación, la concentración y el pH óptimos de los reactivos usados en los presentes métodos puede variar dependiendo de los reactivos que se usen. Sin embargo, la concentración y el pH óptimos de los reactivos se determinan fácilmente, ya sea experimentalmente o empíricamente.

25 *Las células a partir de las que se extrae la proteína mediante el uso del método de la invención*

La metodología de acuerdo con la presente invención se puede usar para extraer una proteína diana o proteína de interés a partir de una muestra de células. La muestra de células puede ser una población de células homogéneas, o una mezcla de células heterogéneas de diferente tipo. La muestra de células también puede contener "contaminantes" tales como mucosa, células sanguíneas y células inflamatorias que no son de interés para el fin de la extracción de la proteína diana o que no contienen a la proteína diana.

30 En algunas realizaciones, la proteína diana es una proteína viral presente en células infectadas con un virus, preferentemente un virus patológico, y las células son preferentemente unas aisladas a partir de un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

35 El virus patógeno puede ser cualquier virus patógeno que causa efectos patógenos o enfermedad en seres humanos u otros animales. El virus patógeno puede ser diversas cepas del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), tal como VIH-1 y VIH-2. La proteína viral puede ser una glicoproteína del VIH (o antígeno de superficie) tal como GP120 y GP41 del VIH, o una proteína de cápside (o proteína estructural) tal como la proteína P24 del VIH.

40 El virus patógeno puede ser el virus del Ébola o de Marburg. La proteína viral puede ser una glicoproteína del Ébola o antígeno de superficie tal como la proteína GP1 o GP2 del Ébola.

45 El virus patógeno puede ser virus de la hepatitis tal como el virus de la hepatitis A, B, C, D o E. Por ejemplo, la proteína viral puede ser un antígeno de superficie o proteína de núcleo del virus de la hepatitis B tal como el antígeno de superficie de la hepatitis B pequeño (SHBsAg) (también mencionado como el antígeno Australia), el antígeno de superficie de la hepatitis B medio (MHBsAg) y el antígeno de superficie de la hepatitis B grande (LHBsAg). El antígeno viral puede ser un antígeno de superficie o proteína del núcleo o virus de la hepatitis C tal como los antígenos NS3, NS4 y NS5.

50 El virus patógeno puede ser un virus sincitial respiratorio (RSV). Por ejemplo, la proteína viral del RSV puede ser la glicoproteína (proteína G) o la proteína de fusión (proteína F) del RSV.

55 El virus patógeno puede ser un virus del herpes simplex (VHS) tal como VHS-1 y VHS-2. Por ejemplo, el antígeno viral del VHS puede ser la glicoproteína D del VHS-2.

60 La proteína diana puede ser un antígeno tumoral, tal como Her 2 de células de cáncer de mama y CD20 en células de linfoma, un oncogén viral tal como el E6 y E7 del virus del papiloma humano, o un oncogén celular tal como ras mutado.

65 En algunas realizaciones, la muestra de células contiene células fijadas en las que la proteína diana está presente. Las células fijadas usadas en los presentes métodos se obtienen generalmente depositando una muestra de células (obtenidas por retirada de células a partir de un sujeto por disección, exfoliación o lavado, por ejemplo) en un medio líquido. La muestra de células se puede depositar en un medio líquido que ya contiene un fijador químico, se puede añadir o un fijador químico al medio líquido después de que las células se hayan colocado en el medio. Se incluye

un medio líquido que contiene un fijador y células fijadas, junto con células sin fijar, dentro del significado de la expresión "muestra celular" en el presente documento.

- 5 Fijadores químicos representativos que se pueden usar en los presentes métodos incluyen: alcoholes (por ejemplo, metanol o etanol), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehído o formaldehído) y cetonas (por ejemplo, acetona), así como tetraóxido de osmio, ácido acético, ácido pícrico y sales de iones metálicos pesados. Ejemplos adicionales de fijadores que se pueden usar en los presentes métodos incluyen fijadores a base de bisulfito (que también pueden incluir ácido acético), fijadores a base de PVP (que también pueden contener propilenglicol y metanol) así como los que se describen en las Patentes de Estados Unidos Nº 3.546.334, Nº 4.578.282, Nº 4.857.300, Nº 5.104.640, Nº 10 5.256.571, Nº 5.432.056 y Nº 5.196.182. Ejemplos de fijadores que se pueden usar en los presentes métodos, que incluyen las concentraciones de trabajo de esos fijadores, se pueden encontrar en Baker, (Principles of Biological Microtechnique: A Study of Fixation and Dyeing, 1959) y Williams ("Tissue preparation for immunocytochemistry." J Clin. Pathol. 1997 50: 422).
- 15 En los presentes métodos son de particular interés los medios líquidos que se denominan "medios de transporte" y se usan de forma habitual para la recogida, conservación (es decir, fijación) y transporte de células cervicovaginales (por ejemplo, células del cuello uterino exfoliadas) como parte de un examen ginecológico. Los medios de transporte aprobados por la FDA son de interés en particular.
- 20 25 Ejemplos de medios de transporte disponibles en el mercado que se pueden usar incluyen: medio de transporte PRESERVCYT™ a base de metanol (que se comercializa como parte del kit para toma de muestras ginecológicas ginecológico THINPREP™ de Cytac, Inc., Marlborough, Mass.), medio de transporte SUREPATH™ a base de etanol conocido oficialmente como CYTORICH™ (TriPath, Inc. Burlington, N.C.), y medio de transporte CYTOLYT™ a base de metanol (Cytac, Inc., Marlborough, Mass.), por ejemplo.
- 30 Las células se pueden obtener mediante cualquier método conveniente, que incluye, pero no se limita a, exfoliación (por ejemplo, raspado), disección y lavado. Son de interés en particular células epiteliales de origen en el cuello del útero, cuyas células se obtienen por lo general mediante métodos de exfoliación que usan un cepillo, hisopo, espátula o raspador adaptados, y se depositan en un medio líquido que contiene o no contiene fijador.

Reactivos de extracción

35 El reactivo de extracción usado en los presentes métodos contiene componentes que están presentes en cantidades con una concentración suficiente para producir un extracto de proteínas que tenga un pH que sea al menos pH 10,0, después de adición del reactivo de extracción a las células. Por consiguiente, el reactivo de extracción tiene un pH mayor de pH 10,0.

40 45 El reactivo de extracción se pone en contacto con las células para producir la composición intermedia. El pH del reactivo de extracción y de la composición intermedia resultante es mayor de pH 10,0, por ejemplo, en el intervalo de mayor de pH 10,0 a aproximadamente pH 13,0 o de aproximadamente pH 12,0 a aproximadamente pH 13,0. En determinadas realizaciones, el reactivo de extracción puede tener un pH de mayor de pH 10,0 a aproximadamente pH 10,5, de pH 10,5 a aproximadamente pH 11,0, de pH 11,0 a aproximadamente pH 11,5, de pH 11,5 a aproximadamente pH 12,0, de pH 12,0 a aproximadamente pH 12,5 o de pH 12,5 a aproximadamente pH 13,0. En determinadas realizaciones preferentes, el reactivo de extracción tiene un pH de aproximadamente pH 12,5 a aproximadamente pH 12,9. El reactivo de extracción se puede preparar usando cualquier fuente adecuada de iones hidróxido, por ejemplo, hidróxido sódico o potásico o carbonato de calcio, por ejemplo.

50 55 En determinadas realizaciones, el reactivo de extracción puede contener un tampón para mantener el reactivo en un pH deseado. Si está presente un tampón en un reactivo de extracción objetivo, el tampón puede tener un pK_a en el intervalo de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 12,5 a 25 °C. Tampones a modo de ejemplo que se pueden usar en una reactivo de extracción de proteínas objetivo incluyen CABS, piperidina, fosfato, CAPS, glicina o etanolamina, por ejemplo. El reactivo de extracción usado en los presentes métodos contiene componentes que están presentes en cantidades con una concentración suficiente para producir un extracto de proteínas que tiene un pH que es mayor de pH 10,0, después de adición del reactivo de extracción a células fijadas o sin fijar. Por consiguiente, el reactivo de extracción tiene un pH mayor de pH 10,0.

60 En realizaciones preferentes, el reactivo de extracción comprende Citrato TriSódico y NaOH. Por ejemplo, un reactivo de extracción puede comprender NaOH 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0 o 2,0 N. Un reactivo de extracción a modo de ejemplo comprende NaOH a aproximadamente 0,1 N, Citrato TriSódico a aproximadamente 50 mM, y un pH de 12,5 a 12,9.

65 En algunas realizaciones preferentes, la cantidad o el pH de reactivo de extracción necesarios para llevar la muestra al pH objetivo, es decir pH mayor de pH 10, se determinarán previamente de forma empírica antes de la adición del reactivo de extracción. En dicha realizaciones, el reactivo de extracción determinado de forma empírica se añadirá a la muestra celular. En otras realizaciones, después de la adición del reactivo de extracción, el pH de la composición intermedia se medirá. Después de dicha etapa de medida, el pH se ajustará, si fuera necesario, para conseguir el pH

objetivo.

El reactivo de extracción también puede comprender uno o más, o mezcla de: HEPES, Triton^{TMX}-100, NaCl, glicerol y EGTA. Un reactivo de extracción a modo de ejemplo puede comprender HEPES a aproximadamente 50 mM, pH a 5 aproximadamente pH 7,5, Triton^{TMX}-100a aproximadamente un 1,1 %, NaCl a aproximadamente 150 mM, glicerol a aproximadamente un 10 %, y EGTA a aproximadamente 1 mM.

En determinadas realizaciones, además de tener un pH mayor de 10,0, el reactivo de extracción también puede 10 contener un alquil éter de polioxietileno de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{n_1}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n_2}\text{OH}$. Dichos alquil éteres de polioxietileno, también conocidos como alcoholes de polioxietileno, se usan habitualmente como emulgentes, agentes humectantes, solubilizantes, desespumantes, detergentes, y/o lubricantes en aplicaciones industriales, 15 cosméticas, y farmacéuticas. (Véase, por ejemplo The Merck Index, 13^a Edición, 7659). En determinadas realizaciones, el alquil éter de polioxietileno es un tensioactivo BrijTM tal como BrijTM 35 u otro miembro de la familia BrijTM que se describen en el presente documento.

15 BrijTM 35 con CAS [9002-92-0] es un tensioactivo no iónico usado habitualmente en aplicaciones de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) para el aislamiento de complejos de membrana. A menudo se usa para evitar la unión no específica a soportes de cromatografía. Tiene un Índice de Equilibrio Hidrófilo-Lipófilo (HLB) de 16,9, que indica que es un compuesto hidrófilo capaz de ser usado como un agente de solubilización, tal como la solubilización 20 sin desnaturalizar de proteínas de membrana, o como un emulgente. (Véase, por ejemplo Umbreit, J.N., y Strominger, J.L. 1973, Relation of detergent HLB number to solubilization and stabilization of D-alanine carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* membreaness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2997).

25 BrijTM 35, contiene un grupo laurilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2$) y 23 unidades etilenoxy (OCH_2CH_2) y tiene la fórmula química $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$. Otros sinónimos químicos incluyen: lauril éter de polioxietileno; LAURETH-23; lauril éter $\text{C}_{12}\text{E}_{23}$ de polioxietileno (23); Dodecil éter de polioxietenglicol; Óxido de Etileno sobre Alcohol Laurílico, Alcohol Laurílico Etoxilado, Alcohol laurílico, etoxilado; lauril polietilenglicol éter; alfa-Dodecil-omega-hidroxi-polioxietileno; PolietilenGlicoles, monododecil éter; Etoxilato de dodecanol; Dodecanol, polietoxilado; Dodecil poli(oxietilen)éter; Lauromacrogol; Lauril poli(oxietileno) éter; Alcohol dodecílico oxietilenado; Dodecil éter sobre poli(óxido de etileno); 30 alfa-dodecil-omega-hidroxi-Poli(oxi-1,2-etanodiilo); Monolauril éter de poli(oxietileno); Dodecanol polietoxilado; Dodecil éter de polietilenglicol; Lauril éter de polietilenglicol; Polioxietilen dodecanol; Alcohol laúrico de polioxietileno; y Alcohol laurílico de polioxietileno.; 3,6,9,12,15,18,21,24,27-Nonaoxanonatriacontan-1-ol; Alcohol dodecílico, etoxilado; ; Laureth 4 [USAN]; Laureth 9 [USAN]; Laureth-11; Lauromacrogol 400 [INN]; Lauril éter de PEG-11; Polidocanol, 40L (poliéter); Actinol L 7; Actinol L3; Adeka Carpol M 2; Adeka Carpol MBF 100; Adekatol LA 1275; 35 Aetoxisklerol; Akyporox RLM 160; Akyporox 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; BrijTM 22; BrigTM 23; BrijTM 30; BrijTM 30ICI; BrijTM 30SP; BrijTM 35; BrijTM 35L; BrijTM 36T; CCRIS 3397; Calgene 40L; Carsonol L 2; Carsonol L 3; Chemal LA 23; Chimipal AE 3; Cimage; Conion 275-100; Conion 275-20; Conion 275-30; Conion 275-80; Conion 2P80; Éter de 40 polioxietileno de alcohol dodecílico; Du Pont WK; Ethosperse LA 12; Ethosperse LA 23; ; G 3707; Glicoles, polietileno, éter de monododecilo; HSDB 4351; Hidroxipolietoxidodecano; LA (Alcohol); LA 7; Laureth; Laureth 9; Lipal 4LA; Lubrol 12A9; Lubrol PX; 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(oxi-1,2-etanodiilo), alfa-dodecil-omega-hidroxi-; Monododecil éter de polietilenglicol; Monododecil éter de polietilenglicol, el nombre va seguido de un 45 número (400) que corresponde a aproximadamente a la masa molecular media de la porción de polietilenglicol; Monolauril éter de polietilenglicol; Lauril éter de polioxietileno; Rokanol L; Romopal LN; Simulsol P 23; Simulsol P 4; Siponic L; Slovasol S; Standamul LA 2; Stmer 135; Tensioactivo WK; Texofor B 9; Thesat; Thesit; alfa-Dodecil-omega-hidroxipoli(oxi-1,2-etanodiilo); o alfa-Dodecil-omega-hidroxipoli(oxietileno).

50 Otros alquil éteres de polioxietileno BrijTM incluyen: BrijTM 30, lauril éter de polioxietileno (4) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 4); BrijTM 52, cetil éter de polioxietileno (2) ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 2); BrijTM 56, cetil éter de polioxietileno (10) ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 10); BrijTM 58, cetil éter de polioxietileno (20) ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 20); BrijTM 72, estearil éter de polioxietileno (2) ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 2); BrijTM 76, estearil éter de polioxietileno (10) ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 10); BrijTM 78, estearil éter de polioxietileno (20) ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 20); BrijTM 92, oleil éter de polioxietileno (2) ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n-2); BrijTM 93, oleil éter de polioxietileno (2); ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 2); BrijTM 97, oleil éter de polioxietileno (10) ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 10); BrijTM 98, oleil éter de polioxietileno (20) ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 20); BrijTM 700, Estearil éter de polioxietileno (100), $\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{21}\text{OH}$, n ~ 100; y BrijTM 721, Estearil Éter de Polioxietileno (21) ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n ~ 21).

60 El alquil éter de polioxietileno, si está presente, puede estar presente a una concentración que no disminuye significativamente la sensibilidad de los ensayos posteriores. La concentración de alquil éter de polioxietileno, en determinadas realizaciones, de disminuir durante el procesamiento de muestras, por ejemplo, por dilución del alquil éter de polioxietileno usando tampón de neutralización o mediante la adición de un diluyente, por ejemplo, tampón o agua al extracto de proteínas antes de su uso.

Dependiendo de la fuerza del alquil éter de polioxietileno usado y el pH del tampón de extracción, el alquil éter de polioxietileno puede estar presente en el tampón de extracción a una concentración (v/v) de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 0,1 %, de aproximadamente un 0,1 % a un 0,5 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %.

En una realización precedente, un alquil éter de polioxietileno, por ejemplo Brij™ 35, está presente en el reactivo de extracción a una concentración (v/v) de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 %. En otras realizaciones, dicho alquil éter de polioxietileno está presente en el reactivo de neutralización. En otras realizaciones más, dicho alquil éter de polioxietileno está presente en los reactivos tanto de extracción como de neutralización.

En otras realizaciones preferentes, el reactivo de extracción y/o reactivo de neutralización comprende otros detergentes no iónicos además del alquil éter de polioxietileno. Los detergentes no iónicos podrían estar presentes en el reactivo de extracción o en el reactivo de neutralización, o tanto en el reactivo de extracción como en el reactivo de neutralización. En determinadas realizaciones, el detergente no iónico usado puede ser nonidet P-40, n-octilglucósido, un detergente TRITON™ tal como TRITON™ X-100, octil β-tioglucopiranósido, un detergente Tween™ tal como Tween-20, o NP-40). Dependiendo de la fuerza del detergente usado, el detergente puede estar presente en el tampón de extracción o en el tampón de neutralización a una concentración de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,05 M, de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,1 M, de 0,1 M a aproximadamente 0,2 M, de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1,0 M, de aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 4,0 M, o de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 8,0 M. El detergente puede estar presente en el tampón de extracción a una concentración de aproximadamente un 0,1%-20 %, preferentemente un 0,5 %-10 %, un 1 %-6 % o un 2 %-5 %. Los detergentes adicionales que se pueden usar en los presentes métodos se enumeran las columnas 7 y 8 de la patente de Estados Unidos Nº 6.488.671.

Detergentes a modo de ejemplo y sus concentraciones en un reactivo de neutralización y/o de extracción objetivo incluyen: Triton X-100: de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo, de aproximadamente un 1 %, NP40: de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo, aproximadamente un 1 % y Tween-20: de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo, aproximadamente un 1 %, en peso/vol.

En realizaciones preferentes, el reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización comprende un alquil éter de polioxietileno en combinación con otros detergentes no iónicos. El alquil éter de polioxietileno puede ser un tensioactivo Brij™ y se puede combinar con uno o ambos de detergente Tween™ o detergente Triton™. En determinadas realizaciones preferentes, el tensioactivo Brij™ es Brij™ 35 en combinación con uno o más de los siguientes detergentes no iónicos: Tween™ -20, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo aproximadamente un 2 %; o Triton™ X-100, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, por ejemplo aproximadamente un 2 %.

En determinadas realizaciones, el reactivo de extracción puede no contener cantidad significativa de desnaturalizante. Sin embargo, en otras realizaciones, además de tener un pH mayor de 10,0 y un alquil éter de polioxietileno tal como Brij™ 35, el reactivo de extracción también puede contener un desnaturalizante, por ejemplo, un detergente iónico tal como dodecil sulfato sódico (SDS) o sarcosilo, o un agente caotrópico tal como urea. En estas realizaciones, el desnaturalizante, si estuviera presente, puede estar presente a una concentración que no disminuya significativamente la sensibilidad de ensayos posteriores. La concentración de desnaturalizante, en determinadas realizaciones, puede disminuir durante el procesamiento de muestras, por ejemplo, por dilución del desnaturalizante usando tampón de neutralización o mediante la adición de un diluyente, por ejemplo, tampón o agua al extracto de proteínas antes de su uso. El desnaturalizante puede estar presente solo, en ausencia de alquil éter de polioxietileno.

Dependiendo de la fuerza del desnaturalizante usado y el pH del tampón de extracción, el desnaturalizante puede estar presente en el tampón de extracción a una concentración de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,05 M, de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,1 M, de 0,1 M a aproximadamente 0,2 M, de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1,0 M, de aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 4,0 M, o de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 8,0 M. El desnaturalizante, si estuviera presente en el reactivo de extracción, puede estar presente a una concentración que es muy inferior a la concentración del desnaturalizante usado por lo habitual para desnaturalizar proteínas. En otras palabras, el reactivo de extracción puede contener desnaturalizante a una concentración que permita la detección de la proteína usando un agente de captura para esa proteína, después de producir un extracto de proteínas de acuerdo con los métodos en cuestión. La concentración usada de desnaturalizante generalmente suficiente para producir un extracto de proteínas que contenga proteínas que sean fácilmente detectables en un ensayo de unión que use un agente de captura, por ejemplo, en un ensayo de detección de anticuerpos.

- Desnaturalizantes a modo de ejemplo y sus concentraciones en un reactivo de extracción objetivo son: dodecil sulfato sódico (SDS): de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 2 %, por ejemplo, un 0,05 %, sarcosilo: de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 5 %, por ejemplo, un 0,5 %, guanidina: de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 6 M, por ejemplo, aproximadamente 0,5 M y urea: de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 8 M, por ejemplo, aproximadamente 0,5 M, en peso/vol.
- El SDS se usa por lo general para desnaturalizar proteínas a una concentración de un 0,1 % a un 0,5 %, el sarcosilo se usa por lo general para desnaturalizar proteínas a una concentración de un 2 % en p/v, la urea se usa por lo general para desnaturalizar proteínas a una concentración de 2 M a 8 M, el clorhidrato de guanidina se usa por lo general para desnaturalizar proteínas a una concentración de 3 M a 8 M, el cloruro de N-cetil trimetilamonio se usa por lo general para desnaturalizar proteínas a una concentración de un 5 % en p/v, y el N-octilglucósido se usa por lo general para desnaturalizar proteínas a una concentración de un 2 %, en p/v (Véase Protein purification Handbook, Amersham Pharmacia Biotech, p. 71 (1999)).
- El reactivo de extracto de proteínas objetivo puede contener otros componentes por ejemplo, agentes quelantes de iones salinos, inhibidores de proteasas, etc., además de los componentes que se han mencionado anteriormente.
- El reactivo de extracción de proteínas puede ser una composición líquida o sólida y, en determinadas realizaciones, puede contener una combinación de desnaturalizantes diferentes.
- Los desnaturalizantes que se pueden usar en el presente tampón de extracción son por lo general desnaturalizantes fuertes e incluyen, pero no se limitan a: agentes caotrópicos (por ejemplo, urea, clorhidrato de guanidina, o una sal de tiocianato tal como tiocianato sódico o tiocianato de guanidinio, yoduro sódico, perclorato sódico y similares; véase K. Hamaguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 62: 1129-1136, 1962) y detergentes iónicos (por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS), sarcosilo o cloruro de N-cetil trimetilamonio), que incluyen detergentes catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos (tales como CHAPS o CHAPSO). Los desnaturalizantes adicionales que se pueden usar en los presentes métodos se enumeran las columnas 7 y 8 de la patente de Estados Unidos Nº 6.488.671.
- En determinadas realizaciones, un desnaturalizante débil tal como LiCl, LiClO₄, LiBr, CaCl₂ o NaCl no se usa como un desnaturalizante en el tampón de extracción, aunque dicho un compuesto puede estar presente en un tampón de extracción o extracto de proteínas además de un desnaturalizante indicado en el párrafo anterior.
- Tal como se ha indicado anteriormente, el reactivo de extracción se pone en contacto con (por ejemplo, se convino se mezcla con) células fijadas o sin fijar. En determinadas realizaciones, una muestra celular que contiene células (por ejemplo, un medio de transporte que contiene células fijadas) se puede añadir directamente al reactivo de extracción. En otras realizaciones, las células se pueden aislar a partir de la muestra celular (por ejemplo, mediante métodos de sedimentación, centrifugación, filtración o afinidad), antes de su adición al reactivo de extracción de proteínas. Las células se pueden lavar o poner en contacto con otros reactivos antes de su adición al reactivo de extracción.
- Todas o una parte de las células fijadas o sin fijar disponibles se pueden combinar con el reactivo de extracción. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una parte de las células se puede usar en un ensayo de citología y una parte de las células se puede poner en contacto con el reactivo de extracción para producir la composición intermedia. Las células y el reactivo de extracción se pueden combinar e incubar o mantener en una temperatura adecuada (por ejemplo, en hielo, a aproximadamente temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C) y durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, de 10 segundos a 24 horas) para producir la composición intermedia. Por ejemplo, las células y el reactivo de extracción se pueden combinar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 minutos o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 horas. Como otro ejemplo, las células y el reactivo de extracción se pueden combinar entre 5 minutos y 10 horas o entre 10 minutos 1 hora o 10-30 minutos. En determinadas realizaciones, el reactivo de neutralización se pone en contacto con la composición intermedia inmediatamente después de que las células se hayan puesto en contacto con el reactivo de extracción. Las células y el reactivo de neutralización se pueden combinar e incubar o mantener en una temperatura adecuada (por ejemplo, en hielo, a aproximadamente temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C) y durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, de 10 segundos a 24 horas) para producir la composición intermedia. Por ejemplo, las células y el reactivo de neutralización se pueden combinar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30 minutos o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 horas. Como otro ejemplo, las células y el reactivo de neutralización se pueden combinar entre 5 minutos y 10 horas o entre 10 minutos y 1 hora o 10-30 minutos.
- Reactivo de neutralización*
- El reactivo de neutralización usado en los presentes métodos tiene un pH que suficiente para neutralizar el pH de la composición intermedia que se ha analizado anteriormente, después de su puesta en contacto con la composición intermedia. En otras palabras, el reactivo de neutralización tiene un pH que es suficiente para neutralizar el pH de la composición intermedia que se ha analizado anteriormente cuando el reactivo de neutralización se mezcla con la composición intermedia. Tal como se describirá con mayor detalle a continuación, el reactivo de neutralización, en determinadas realizaciones, puede contener un alquil éter de polioxietileno u otro detergente no iónico o mezcla de

detergentes.

El pH del reactivo de neutralización es suficiente para neutralizar la composición intermedia preparada por cuenta en contacto de células fijadas o sin fijar con un reactivo de extracción objetivo. Dependiendo del pH del reactivo de extracción y de si se usan tampones, el pH del reactivo de neutralización puede estar entre pH 4,0 y pH 8,0. En determinadas realizaciones, el reactivo de neutralización puede tener un pH de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 4,5, de pH 4,5 a aproximadamente pH 5,0, de pH 5,0 a aproximadamente pH 5,5, de pH 5,5 a aproximadamente pH 6,0, de pH 6,0 a aproximadamente pH 6,5, de pH 6,5 a aproximadamente pH 7,0 o de pH 7,0 a aproximadamente pH 7,5. El reactivo de neutralización se puede preparar usando cualquier fuente adecuada de iones hidrógeno, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido acético, por ejemplo. En determinadas realizaciones, el reactivo de neutralización puede tener un pH menor que pH 4,0.

El reactivo de neutralización puede estar tamponado o sin tamponar. Si el reactivo de neutralización está tamponado, entonces el reactivo de neutralización se puede tamponar usando cualquier tampón que tenga un pK_a de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, por ejemplo, tris, hepes o tricina, por ejemplo. En determinadas realizaciones preferentes, el reactivo de neutralización comprende Tris-HCl 2 M, pH a aproximadamente pH 6,0. En otras realizaciones preferentes, el reactivo de neutralización comprende Tris-HCl 0,9 M, pH a aproximadamente pH 7,8.

En algunas realizaciones preferentes, la cantidad o pH del reactivo de neutralización necesaria para llevar la muestra al pH diana, por ejemplo pH de aproximadamente pH 6,0 a 9,0, o pH de 7,0 a 8,5 o pH de 7,5 a 8,5 o pH de 8,0 a 8,5, se determina previamente de forma empírica antes del adición del reactivo de neutralización. En dichas realizaciones, el reactivo de neutralización determinado empíricamente se añade a la muestra celular. En otras realizaciones, después de la adición del reactivo de neutralización, se mide el pH de la muestra neutralizada. Despues de dicha etapa de medida, el pH se ajusta, si fuera necesario, para conseguir el pH neutro objetivo.

En otras realizaciones, el reactivo de neutralización comprende uno o más, o mezcla de: HEPES, Triton™ X-100, NaCl, glicerol y EGTA. Un reactivo de neutralización a modo de ejemplo comprende HEPES a aproximadamente 50 mM, pH a aproximadamente pH 7,5, Triton™ X-100 aproximadamente al 1,1 %, NaCl a aproximadamente 150 mM, glicerol aproximadamente al 10 %, y EGTA a aproximadamente 1 mM. Otro tampón de neutralización a modo de ejemplo comprende: Tris a aproximadamente 20 mM, pH 8, BSA aproximadamente al 2 %, Triton™ X-100 aproximadamente al 1 %, Tween™-20 aproximadamente al 2 %, Sarcosina aproximadamente al 0,2 %, NaCl a aproximadamente 250 mM, y EDTA (o EGTA) a aproximadamente 50 mM.

Tal como se ha indicado anteriormente, el reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización pueden contener un detergente o tensioactivo no iónico que incluye, pero no se limitará, un alquil éter de polioxietileno de la fórmula $CH_3(CH_2)_{n1}CH_2(OCH_2CH_2)_{n2}OH$. Alquil éteres de polioxietileno a modo de ejemplos son tensioactivos Brij™ que incluyen uno o más de: Brij™ 35, lauril éter de polioxietileno (23) ($CH_3(CH_2)_{10}CH_2(OCH_2CH_2)_{n}OH$, n ~ 23); Brij™ 30 lauril éter de polioxietileno (4) ($CH_3(CH_2)_{10}CH_2(OCH_2CH_2)_{n}OH$, n ~ 4); Brij™ 52, cetil éter de polioxietileno (2) ($C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 2); Brij™ 56, cetil éter de polioxietileno (10) ($C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 10); Brij™ 58, cetil éter de polioxietileno (20) ($C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 20); Brij™ 72, estearil éter de polioxietileno (2), ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 2); Brij™ 76, estearil éter de polioxietileno (10) ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 10); Brij™ 78 estearil éter de polioxietileno (20) ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 20); Brij™ 92, oleil éter de polioxietileno (2) ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 2); Brij™ 93, oleil éter de polioxietileno (2); ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 2); Brij™ 97, oleil éter de polioxietileno (10) ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n~10); Brij™ 98, oleil éter de polioxietileno (20) ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 20); Brij™ 700, Estearil éter de polioxietileno (100), $C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_{21}OH$, n ~ 100; o Brij™ 721, Estearil Éter de Polioxietileno (21) ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 21).

Dependiendo de la fuerza del alquil éter de polioxietileno usado y el pH del tampón de extracción, el alquil éter de polioxietileno puede estar presente en el tampón de extracción a una concentración (v/v) de aproximadamente un 0,05 % a aproximadamente un 0,1 %, de aproximadamente un 0,1 % a un 0,5 %, de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 %, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 %.

En determinadas realizaciones, el detergente no iónico usado puede ser nonidet P-40, n-octilglucósido, un detergente TRITON™ tal como TRITON™ X-100, octil β-tioglucopiranósido, un detergente TWEEN™ tal como TWEEN-20, o NP-40. Dependiendo de la fuerza del detergente usado, el detergente puede estar presente en el tampón de extracción o en el tampón de neutralización tampón a una concentración de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,05 M, de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,1 M, de 0,1 M a aproximadamente 0,2 M, de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,5 M, de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1,0 M, de aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 2,0 M a aproximadamente 4,0 M, o de aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 8,0 M. Detergentes adicionales que se pueden usar en los presentes métodos se enumeran en las columnas 7 y 8 de la patente de Estados Unidos Nº 6.488.671. En determinadas realizaciones, el detergente puede estar presente en el tampón tanto de extracción como de neutralización.

- 5 Detergentes a modo de ejemplo y sus concentraciones en un reactivo de neutralización y/o de extracción objetivo incluyen: Triton X-100: de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % por ejemplo, aproximadamente un 1 %, NP40: de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % por ejemplo, aproximadamente un 1 % y Tween-20: de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % por ejemplo, aproximadamente un 1 %, en peso/vol.
- 10 Tal como se indicado anteriormente, el alquil éter de polioxetileno u otro detergente no iónico podría estar presente solo, en combinación, o no presente en el reactivo de neutralización. El alquil éter de polioxetileno puede ser un tensioactivo Brij™ se puede combinar con uno o ambos de detergente Tween™ o detergente Triton™. En determinadas realizaciones preferentes, el tensioactivo Brij™ es Brij™35 en combinación con uno o más de los siguientes detergentes no iónicos: Tween™ -20, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % por ejemplo aproximadamente un 2 %; o Triton™ X-100, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 % por ejemplo aproximadamente un 2 %.
- 15 Tal como se indicado anteriormente, el reactivo de neutralización se pone en contacto con (por ejemplo, se convino se mezcla con) la composición intermedia para producir un extracto de proteínas que tenga un pH neutro (es decir, un pH en el intervalo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 8,0, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente pH 7,0 y aproximadamente pH 7,8). El extracto de proteínas contiene finalmente proteínas a partir de células fijadas o sin fijar, un alquil éter de polioxetileno a una concentración que se ha enumerado anteriormente, y, en determinadas realizaciones, a tampón para mantener el extracto de proteínas en un intervalo de pH en particular y/o detergente no iónico adicional. Si se añade un desnaturalizante a las células fijadas o sin fijar, en extracto de proteínas puede contener adicionalmente ese desnaturalizante. El pH, la elección del detergente y la concentración del detergente usados (y, si se usa un desnaturalizante, la identidad y concentración del desnaturalizante) son suficientes para permitir que el extracto de proteínas se directamente en un ensayo de unión para detectar proteínas presentes en el extracto de proteínas.
- 20 La neutralización del extracto celular también se puede realizar pasando el extracto a través de un filtro o punta de filtro que está impregnada con un reactivo de neutralización. A medida que el extracto pasa a través del material de filtro, el reactivo de neutralización se solubiliza y el pH del extracto se aproxima a la neutralidad.
- 25
- 30 Un método alternativo para neutralizar el extracto celular es pasar el extracto a través de una columna BioSpin (BioRad) equilibrada previamente con una solución a pH neutro. El extracto también se puede colocar en una jeringa o aparato similar que contiene gel (o material de filtración) que contiene neutralizadores y se administra desde la jeringa mediante presión positiva.
- 35 En determinadas realizaciones, el extracto de proteínas objetivo contiene proteína E6 del VPH solubilizada (particularmente proteína E6 de cepas oncongénicas del VPH) que es accesible a y que se puede detectar fácilmente con un agente de captura sin tratamiento adicional del extracto de proteínas (por ejemplo, sin adición adicional de desnaturalizante, cambios de pH o calentamiento). El extracto de proteínas también puede contener membranas solubilizadas o insolubles, proteínas distintas a la proteína E6 del VPH, y otros contenidos celulares tales como ADN, ARN, hidratos de carbono, etc. También pueden estar presentes otros contaminantes tales como los obtenidos a partir de contaminación mucal de la muestra celular original. Los componentes del extracto de proteínas generalmente no contienen células enteras (es decir, citológicamente intactas).
- 40
- 45 El extracto de proteínas se puede usar inmediatamente, o almacenar, por ejemplo, en forma congelada, antes de su uso.
- 50 En realizaciones en particular, los extractos de proteínas producidos con los métodos que se han expuesto anteriormente se pueden usar en métodos de detección de proteínas, métodos que se describen con más detalle a continuación.
- 55 Como sería evidente a partir de lo mencionado anteriormente, diversos desnaturalizantes, detergentes, tampones, pH y concentraciones de componentes diferentes se pueden usar en los reactivos que se han descrito anteriormente. El desnaturalizante, detergente, tampón o pH, o concentración de componentes óptimos en cualquier reactivo se determinan fácilmente usando métodos de rutina.
- 60
- 65 Despues de la neutralización del extracto celular, la proteína E6 se puede concentrar a partir del extracto celular por incubación del extracto con partículas que contienen aglutinante para la E6. El aglutinante puede comprender PDZ, Proteína Asociada a E6 (E6AP) o fragmentos de la misma, o Proteína de Unión a E6 (E6BP) o fragmentos de la misma. Despues de que E6 sea capturada por las partículas, las partículas se lavan y a continuación E6 se libera de las partículas por incubación con tampón a pH mayor de 10. Las partículas se separan de la solución de elución y la solución restante se neutraliza a continuación con los procedimientos que se han descrito anteriormente. Como alternativa, la proteína E6 se puede detectar sin liberarse de las partículas de captura.
- Detergentes adicionales que se pueden usar en los presentes métodos se enumeran en las columnas 7 y 8 de la patente de Estados Unidos N° 6.488.671. En determinadas realizaciones, el detergente puede estar presente en el

tampón tanto de extracción como de neutralización.

Además, en otras realizaciones, la muestra se puede diluir después de la etapa de neutralización. Un diluyente a modo de ejemplo puede incluir: HEPES a aproximadamente 50 mM, pH a aproximadamente pH 7,5, Triton^{TMX}-100 aproximadamente al 1,1 %, NaCl a aproximadamente 150 mM, glicerol aproximadamente al 10 %, y EGTA a aproximadamente 1 mM. Otro diluyente a modo de ejemplo puede incluir: Tris a aproximadamente 50 mM, pH 8,2, BSA aproximadamente al 2 %, Triton^{TMX}-100 aproximadamente al 2 %, Sarcosina aproximadamente al 0,1 %, NaCl a aproximadamente 150 mM, y EDTA (o EGTA) a aproximadamente 50 mM.

10 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

El extracto de proteínas preparado con los métodos que se han analizado anteriormente se puede usar directa o indirectamente (es decir, después de la adición de reactivos adicionales) en unos métodos en los que se evalúa la presencia de una o más proteínas en el extracto de proteínas. Los métodos de detección de proteínas implican generalmente un agente de captura que se une específicamente a una proteína. La identidad de las proteínas detectar puede ser de identidad conocida (es decir, predeterminada) o desconocida en el momento de realizar el método.

Las proteínas que se pueden detectar usando los métodos de detección de proteínas objetivo incluyen proteínas que son marcadores de diagnóstico de una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer, enfermedad inflamatoria, o infección por virus, bacterias u hongos, por ejemplo. En determinadas realizaciones, una proteína detectada usando los métodos en cuestión no se puede detectar de forma rutinaria a menos que se usen los métodos de extracción de proteínas objetivo.

Proteínas a modo de ejemplo que se pueden detectar usando los presentes métodos incluyen proteínas que están codificadas con un agente infeccioso, tal como el virus del papiloma humano (VPH). En realizaciones en particular, los presentes métodos se pueden usar para detectar la proteína E6 del VPH, una proteína que se ha demostrado que es difícil o imposible detectar en extractos de proteínas preparados a partir de células fijadas con otros métodos.

En términos generales, los métodos de detección de proteínas se conocen muy bien en la técnica e incluyen ensayos de unión, es decir, ensayos en los que se detecta la unión entre una proteína y un agente de captura para la proteína. Dichos ensayos incluyen inmunoensayos, es decir, ensayos de unión que usan un anticuerpo que se une específicamente a una proteína, que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivo y no competitivo que usan técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de una absorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", inmunoensayos enzimáticos, matrices de perlas citométricas (CBA), ensayos de perlas multiplexadas, transferencia de western, ensayos de inmunohistoquímica, ensayos de inmunocitoquímica, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complementos, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos de fluorescencia, e inmunoensayos de proteína A, por nombrar solamente unos pocos. Dichos ensayos son de rutina y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad). A continuación, se describen brevemente inmunoensayos a modo de ejemplo. Captura y liberación usando péptidos BP o AP de E6, anticuerpos específicos, o proteínas de dominio PDZ se podrían usar como un método de extracción posterior, de ensayo previo a la concentración de E6 del VPH. Como alternativa, se podría usar un formato de anticuerpo monoclonal doble.

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente implican producir un extracto de proteínas, añadir un agente de captura, por ejemplo, un anticuerpo, al extracto de proteínas e incubar el extracto de proteínas y la gente de captura durante un período de tiempo y temperaturas adecuados. A continuación, el agente de captura se une a un soporte sólido, por ejemplo, un sustrato de afinidad tal como perlas unidas a proteína A y/o proteína G, y la mezcla se incuba y se lava. El soporte sólido se puede suspender en tampón de muestra y la proteína de interés se puede detectar, por ejemplo, por transferencia de western.

Los ELISA pueden implicar preparar un extracto de proteínas, unir el extracto de proteínas a un soporte sólido (por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación de múltiples pocillos), poner en contacto el extracto de proteínas unido al soporte con un agente de captura, por ejemplo, un anticuerpo, y detectar la unión entre el agente de captura y la proteína. En determinados métodos de ELISA, el agente de captura se puede marcar de forma detectable con un resto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) antes de poner el contacto el agente de captura con el extracto de proteínas unido al soporte. En otras realizaciones, sin embargo, la unión del agente de captura al extracto de proteínas se puede detectar mediante un segundo agente de captura detectable (por ejemplo, un segundo anticuerpo) que se une al agente de captura puesta en contacto con el extracto de proteínas.

En otros ensayos de ELISA, el agente de captura puede estar unido a un soporte sólido, y el extracto de proteínas se pone en contacto con el agente de captura unido al soporte sólido. La unión de una proteína en el extracto de proteínas al anticuerpo del soporte sólido se puede detectar usando un segundo agente de captura para la proteína.

Dichos "ensayos de tipo sándwich" son bien conocidos en la técnica.

En otros ensayos, la unión entre un agente de captura y la proteína se puede producir en solución antes de inmovilización de superficie del agente de captura.

5 En particular, los presentes métodos se pueden usar para detectar la proteína E6 a partir de cepas oncongénicas del VPH. En esta realizaciones, el agente de captura usado en el método de elección puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un polipéptido que comprende un dominio PDZ que se une a un ligando PDZ (es decir, un sitio de unión para un dominio PDZ) contenido en la proteína E6. Por ejemplo, el método de unión de detección instantánea de E6
10 puede causar una proteína que contiene el dominio PDZ que contiene el segundo PDZ de MAGI-1, o el dominio PDZ de DLG o TIP1, etc, tal como se describe en la solicitud publicada US 20040018487 (publicada el 29 de enero de 2004) y que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Proteínas que contienen el dominio PDZ y secuencias del dominio PDZ a modo de ejemplo se muestran en la TABLA 2 y en el EJEMPLO 4 de la solicitud US 20040018487. La expresión "dominio PDZ" también incluye variantes (por ejemplo, variantes de
15 origen natural) de las secuencias (por ejemplo, variantes polimórficas, variantes con sustituciones conservativas, y similares) y dominios de especies alternativas (por ejemplo, ratón, rata). Por lo general, los dominios PDZ son básicamente idénticos a los que se muestran en la solicitud de patente de Estados Unidos con Nº de Serie 09/724.553, por ejemplo, con una identidad del resto de aminoácidos de al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, o al menos aproximadamente un 90 % cuando se compara y alinea con la
20 correspondencia máxima. En la técnica se observa que los dominios PDZ se pueden mutar para dar cambios de aminoácidos que pueden fortalecer o debilitar la unión y para alterar la especificidad, y sin embargo siguen siendo dominios PDZ (Schneider et al., 1998, Nat. Biotech. 17: 170-5). A menos que se indique de otro modo, una referencia a un dominio PDZ en particular (por ejemplo, un dominio 2 de MAGI-1) pretende incluir el dominio PDZ en particular y las variantes de unión a E6 del VPH del mismo. En otras palabras, si se hace una referencia a un
25 dominio PDZ en particular, también se puede hacer una referencia a variantes de ese dominio PDZ que se unen a la proteína E6 oncongénica del VPH, tal como se describe a continuación. En este respecto se indica que la enumeración de los dominios PDZ en una proteína puede cambiar. Por ejemplo, el dominio 2 de MAGI-1 (con la secuencia de aminoácidos PSELKGKFIHTKLKRSSRGFGFTVGGDEPDEFQIKSLVL DGPAALDGKMETGDVI VSVNDTCVLGHHTAQVVKIFQSIPIGASVDLELCRGYPLPFDPDDPN), tal como se menciona en el presente
30 documento, se puede mencionar como dominio 1 de MAGI-1 en otra bibliografía. Como tal, cuando en la presente solicitud se menciona un dominio de PDZ en particular de una proteína, esta referencia se debería entender en vista de la secuencia de ese dominio, tal como se describe en el presente documento, particularmente en el listado de secuencias de la Tabla 2 de la Solicitud US 20040018487, que muestra la relación entre las secuencias del listado de secuencias y los nombres y números de acceso de Genbank para diversos dominios, cuando sea apropiado. Tal
35 como se usa en el presente documento, el término "proteína de PDZ" se refiere a una proteína de origen natural que contiene un dominio PDZ. Proteínas de PDZ a modo de ejemplo incluyen CASK, MPP1, DLG1, DLG2, PSD95, NeDLG, TIP-33, SYN1a, TIP-43, LDP, LIM, LIMK1, LIMK2, MPP2, NOS1, AF6, PTN-4, prlL16, 41.8kD, KIAA0559, RGS12, KIAA0316, DVL1, TIP-40, TIAM1, MINT1, MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3, KIAA0303, CBP, MINT3, TIP-2, KIAA0561, y TIP-1. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido del dominio PDZ" se refiere
40 a un polipéptido que contiene un dominio PDZ, tal como una proteína de fusión que incluye una secuencia del dominio PDZ, una proteína de PDZ de origen natural, o un péptido del dominio PDZ aislado. Por lo tanto, un polipéptido del dominio PDZ puede tener aproximadamente 60 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 70 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 80 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 90 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 100 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 200
45 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 300 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 500 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 800 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 1000 aminoácidos o más de longitud, normalmente hasta aproximadamente 2000 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 50-2000 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50-1500 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50-1000 aminoácidos de longitud, aproximadamente 60-1000 aminoácidos de longitud, aproximadamente 70-1000 aminoácidos de longitud. Los precios del dominio PDZ normalmente no tienen más de
50 aproximadamente 200 aminoácidos (por ejemplo, 50-200 aminoácidos, 60-180 aminoácidos, 80-120 aminoácidos, o 90-110 aminoácidos), y codifican un dominio PDZ.

55 Anticuerpos adecuados para detectar la proteína E6 del VPH se describen, por ejemplo, en el documento 20050142541 (publicado el 30 de junio de 2005). Métodos detallados para identificar la proteína E6 de cepas oncongénicas del VPH se encuentran en la solicitud de patente de Estados Unidos publicada Nº US20040018487. Estos métodos publicados se adaptan fácilmente para uso en los métodos presentes.

60 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-E6 se puede unir a un soporte sólido, y un extracto de proteínas producido por los métodos en cuestión pone en contacto con el anticuerpo unido al soporte sólido. Dichos soportes sólidos son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a: partículas de oro coloidales, partículas quimioluminiscentes, partículas de látex teñidas, o partículas de Raman SERS, por ejemplo núcleos de oro o de plata revestidos con sílice con colorantes indicadores. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-E6 se puede conjugar con una marca fluorescente.

- La unión de proteína E6 oncongénica en el extracto de proteínas se puede detectar usando una proteína que contiene el dominio PDZ. En otras realizaciones, una proteína que contiene el dominio PDZ se puede unir a un soporte sólido, y un extracto de proteínas producido con los métodos en cuestión se pone en contacto con la proteína que contiene el dominio PDZ unidad al soporte sólido. La unión de la proteína E6 oncongénica en el extracto de proteínas se puede detectar usando un anticuerpo anti-E6. En métodos alternativos, la unión entre el anticuerpo de la proteína que contiene el dominio PDZ se puede producir en disolución (es decir, en ausencia de unión del anticuerpo o la proteína que contiene el dominio PDZ a un soporte sólido), y, después de la unión, el anticuerpo o la proteína que contiene el dominio PDZ se puede unir a un soporte sólido (por ejemplo, perlas o similares tales como las que se han descrito anteriormente). En estas realizaciones, la proteína que contiene el dominio PDZ puede ser una proteína de fusión que tiene un dominio de afinidad que se une al soporte sólido. La presencia de la proteína E6 se puede detectar usando un segundo agente de captura que reconoce la proteína E6.
- En realizaciones preferentes, ensayos de flujo lateral (LF), ensayos inmunocromatográficos, ensayos de tiras reactivas, o inmunoensayos de flujo continuo se usan para detectar proteína E6 capturada extraída. En realizaciones preferentes, una tira de flujo lateral (LF) que comprende una "zona de captura" de proteínas que contienen el dominio PDZ se coloca en un vial o pocillo que contiene muestras extraída, a la que se ha añadido un segundo agente de captura tal como anticuerpos monoclonales E6 anti-VPH (mAb) conjugados con partículas de oro. A continuación se permite que las partículas de oro y la muestra migren hacia arriba de la tira a través de acción capilar. Se puede unir un lecho absorbente al extremo distal para facilitar el flujo del líquido hacia arriba de la tira.
- Durante la migración de la muestra hacia arriba de la tira, proteínas de dominio PDZ en la zona de captura se pueden unir a la proteína E6. Si se produce la unión de los mAb conjugados con oro en disolución, el conjugado anti-E6-oro se podría unir a la proteína del dominio PDZ. Como alternativa, la proteína E6 se podría unir a la proteína del dominio PDZ seguido de captura del conjugado de oro de E6. En cualquier escenario, la captura satisfactoria puede dar como resultado la formación de una línea visible y detectable en la tira de LF.
- En realizaciones preferentes, se usa una matriz de perlas citométricas (CBA) para ayudar a la detección de la proteína E6 capturada. Una CBA, también conocida como un ensayo de perlas multiplexadas, es una serie de partículas separadas espectralmente que se puede usar para capturar y cuantificar analitos solubles. El analito se mide a continuación por detección de una emisión basada en fluorescencia y análisis de flujo citométrico. The CBA de Becton Dickinson (BD)TM genera datos comparables con ensayos basados en ELISA, pero de una manera "multiplexada" o simultánea. Tal como con el ensayo en formato sándwich, el cálculo de la concentración de analito desconocido se produce generalmente a través del uso de patrones conocidos y representaciones desconocidas frente una culpa estándar.
- Instrumentos útiles para detectar la proteína E6 capturada son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un instrumento reflectómetro o lector de UMM se puede usar para detectar la línea resultante de la tira de LF. Como alternativa, se puede usar un lector fluorométrico si se usan mAb anti-E6 marcados con fluorescencia para capturar la proteína E6. También se podrían usar dispositivos en los que se incorporan partículas detectoras como parte inherente del dispositivo en sí mismo. Como alternativa, el procedimiento de extracción de la invención podría producir una muestra de entrada que consiste en un resto de E6 solo o formando complejos con anticuerpos, péptidos o proteínas específicos (unidos o sin unir a partículas). Dicha muestra de entrada se podría introducir en una captura específica o dispositivo de detección de flujo continuo basado en membranas y posteriormente detectar con sistemas enzimáticos o basados en partículas o sistemas de detección amplificada.
- Se podrían usar un número de enfoques para aumentar la detección de la señal. Un enfoque como tal usaría anticuerpos monoclonales (mAb) conjugados con enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP)) conjugados con partículas de oro en conjunto con un sustrato de precipitación. Anticuerpos con múltiples biotinas seguido de partículas de oro acopladas a estreptavidina también podrían dar como resultado una señal amplificada. Se podría usar biotina tiramida para depositar más biotina alrededor de la línea de ensayo, seguido de oro conjugado con estreptavidina para amplificación y detección. Como alternativa, el aumento de la señal podría dar como resultado el uso de un procedimiento de dos niveles que implica una partícula primaria que consiste en biotina y partículas de oro mAb-co-conjugadas específicas (o partículas marcadas con fluorescencia) seguido de una partícula secundaria conjugada con estreptavidina. La partícula primaria podría ser una partícula de E6 específica marcada de forma repetitiva seguido de una partícula secundaria antimarca. La partícula primaria también podría ser un cóctel de anticuerpos capaz de reaccionar con proteínas E6 que proceden de algunas, muchas o todas las cepas oncogénicas del VPH y/o con uno o más epítopos de la proteína E6. Dicho cóctel y anticuerpos se podría biotinilar, conjugar con un soporte sólido (por ejemplo, partícula de oro) o marcado con fluorescencia; y muchos de los métodos que se describen en el presente documento se podrían usar en conjunto con dicho cóctel para detectar la proteína E6.
- En determinadas realizaciones, el principio activo en el tampón de extracción se puede aumentar para potenciar la solubilización de la muestra de ensayo clínica. Dicha solubilización mayor podría obviar la necesidad de aclarar la muestra y eliminar la etapa en el ensayo. También podría ser posible forma de sedimentos de complejos anti-E6-mAb-oro y reconstituir en un volumen pequeño para concentrar la muestra, enriqueciendo de este modo a la proteína E6 y aumentando la sensibilidad del ensayo.

- La muestra se puede filtrar antes de la detección para retirar material no deseado material que podría interferir con el flujo y la detección de la muestra. El filtrado puede disminuir la viscosidad de una muestra, dando como resultado un mayor caudal de la muestra. Esto puede aumentar la eficacia en la concentración de la muestra en una membrana de muestra o el caudal en un dispositivo de flujo lateral. Además, reduciendo la materia con tamaño de partícula más grande, la viscosidad de la muestra se puede disminuir, dando como resultado un caudal mayor de la muestra. Esto puede aumentar la eficacia en la concentración de la muestra en una membrana de muestra o el caudal en un dispositivo de flujo lateral.
- 5 Se puede usar una amplia diversidad de polímeros orgánicos y orgánicos, tanto naturales como sintéticos, para filtrar la muestra. Polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(terefタルato de etileno), rayón, nylon, poli(butirato de vinilo), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato celulosa, nitrocelulosa, papel de filtro de fibra de vidrio, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, orlón, poliéster, poliestireno, y similares, o también se podrían usar mezclas. En una realización preferente, el tamaño de poro del filtro permite que las proteínas de la muestra pasen a través de la vez que evitan que otros materiales (por ejemplo, residuos celulares) pasen a través. Los tamaños de poro del filtro puede variar, por ejemplo, de 0,1 µm a 50,0 µm. Preferentemente, el tamaño del poro varía de 0,5 a 25 µm, de 1,0 a 20 µm, de 2,0 a 15 µm, de 3,0 a 10 µm, o de 4,0 a 6,0 µm. Por ejemplo, siguiendo las etapas de extracción de proteínas poniendo en contacto células con un reactivo de extracción y la continuación un reactivo de neutralización de la presente invención, la muestra puede pasar a través de un filtro que tiene un tamaño 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 o 8,0 µm. Un experto en la materia reconocería que se puede necesitar diferentes tamaños de poro basándose en la muestra a filtrar. La muestra se puede forzar a través del filtro (por ejemplo, a través de una jeringa que contiene un poro de filtro de membrana o usando una succión con vacío a través del filtro). Existen un número de metros para filtrar una muestra bien conocidos por una persona experta en la materia.
- 10 25 El filtrado de la muestra puede dar como resultado un mayor caudal para la muestra. En algunos casos, el caudal de la muestra puede aumentar en comparación con una muestra que no estaba filtrada en un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 % o un 50 %. Un tamaño de filtrar apropiado puede dar como resultado el aumento en el caudal sin ninguna pérdida apreciable en la detección de la señal.
- 15 30 35 Los resultados obtenidos a partir de los métodos de ensayo que se han descrito anteriormente se pueden comparar con los resultados obtenidos a partir de controles adecuados, por ejemplo, un control positivo (en el que se puede usar un extracto de proteínas conocidas por que contienen a la proteína a la que se une el agente de captura) o un control negativo (por ejemplo, en el que se puede usar un reactivo de extracción de proteínas no se ha puesto en contacto con una muestra celular).
- 20 Los resultados obtenidos a partir de los métodos de ensayo que se han descrito anteriormente pueden indicar la presencia, ausencia, o, en determinadas realizaciones, la cantidad de una proteína en un extracto de proteínas.
- 25 40 Los métodos de detección de proteínas mencionados anteriormente se pueden realizar en combinación con un ensayo diferente, tal como un ensayo citológico, por ejemplo, un ensayo de Pap para identificar células cancerosas o precancerosas del cuello uterino, u otros ensayos moleculares. En estas realizaciones, la muestra celular se puede dividir en partes antes de su uso. La primera parte se puede usar en ensayos citológicos y la segunda parte se puede usar en los métodos que se han descrito anteriormente.
- 30 45 50 55 Los métodos de detección de proteínas mencionados anteriormente se pueden producir un kit para producir un extracto de proteínas. El sistema contiene generalmente: a) una muestra celular que contiene células fijadas o sin fijar; b) un reactivo de extracción que tiene un pH de al menos pH 10,0; y c) un reactivo de neutralización, en el que las células fijadas o sin fijar, reactivo de extracción y agente de neutralización se pueden usar los métodos anteriores para producir un extracto de proteínas adecuado para su uso en un ensayo de unión. El reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización contiene un alquil éter de polioxietileno.
- KITS**
- 60 En otro aspecto más, la presente invención proporciona kits para poner en práctica los métodos en cuestión, para producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar. Los kits en cuestión incluyen al menos un reactivo de extracción que tiene un pH mayor de pH 10,0, y un reactivo de neutralización. El reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización contiene un alquil éter de polioxietileno. Además, los kits pueden incluir un agente de captura para detectar una proteína, y, en determinadas realizaciones, reactivos (por ejemplo, tampones y reactivos de detección) para detectar esa proteína usando el agente de captura. Los componentes mencionados anteriormente pueden estar presentes en envases separados o uno o más componentes se pueden combinar en un solo envase, por ejemplo, un vial de vidrio o de plástico.

Además de los componentes mencionados anteriormente, los kits en cuestión pueden incluir adicionalmente instrucciones para poner en práctica los métodos en cuestión. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión en diversas formas, una o más de las cuales pueden estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel sobre las que se imprime la información, en el embalaje del kit, en un prospecto, etc.

- 5 además, otro medio podría ser un medio de lectura por ordenador, por ejemplo, disquete, CD, etc., en los que se ha grabado la información. Además, otro medio que puede estar presente es una dirección de página web que se puede usar a través de internet para acceder a la información en un sitio retirado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

10

UTILIDAD

El método y los kits que se han descrito anteriormente se usan fácilmente en diversos métodos de investigación y de diagnóstico, incluyendo métodos para diagnosticar una enfermedad o afección en particular, o infección por un agente infeccioso, tal como un virus o bacteria. El método se puede usar como parte de un diagnóstico para detectar células infectadas con el VPH. Dado que la presencia de cepas oncongénicas del VPH está asociada con células cancerosas y precancerosas, los presentes método se pueden usar para detectar células de cuello uterino cancerosas o precancerosas.

20 Se sabe que el VPH es un agente causal en las siguientes enfermedades: epidermodisplasia verruciforme(EV), un trastorno de la piel que dura toda la vida que da como resultado un alto riesgo de cáncer de piel (por ejemplo, células escamosas); neoplasias del cuello del útero tales como neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y carcinoma cervical invasivo (ICC); neoplasias vaginales tales como as neoplasia intraepitelial vaginal (VAIN) y carcinoma vaginal (VC); neoplasias vulvares tales como neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) y carcinoma vulvar; carcinoma de pene (que incluye papulosis Bowenoide); carcinomas anal (AC) y perianal (PC); carcinomas orofaríngeos (OS); carcinomas de esófago (EC); cánceres de piel no melanoma (por ejemplo, carcinoma de células basales (BCC) y carcinoma de células escamosas (SCC); y melanoma. Como tales, los presentes métodos se pueden usar como un diagnóstico para cualquiera de estas enfermedades.

30 Se pueden obtener células (por ejemplo, exfoliadas o diseccionadas) a partir de un sujeto y depositar en un medio líquido que contiene un fijador que, en determinadas realizaciones, puede ser un medio de transporte para ensayo citológico. Las células se obtienen normalmente en el consultorio o la clínica médica, la muestra celular se vuelve a enviar y se recibe en un laboratorio de ensayos en el que se realizan los métodos de detección de proteínas que se han mencionado anteriormente y, opcionalmente, ensayos de citología. Los resultados del ensayo se comunican al sujeto, en algunas realizaciones a través del médico y un asociado del mismo.

35 El sujeto del que se usan las células puede ser un mamífero, por ejemplo, un perro o gato, un roedor (por ejemplo, ratón, cobaya, o rata), o primate de (por ejemplo, un ser humano, chimpancé, o mono). El sujeto será un ser humano, particularmente un hombre o una mujer. El sujeto puede presentar síntomas de infección por el VPH (por ejemplo, puede tener arrugas en una o más partes del cuerpo), se puede sospechar que está infectado con el VPH (por ejemplo, puede contener células que son citológicamente compatibles con una infección de este tipo) o ya pueden haber dado positivo para el VPH. En determinadas realizaciones, puede no tener indicación de infección por VPH, y los métodos anteriores acuerdos como parte de una exploración de rutina.

40 45 Los presentes métodos se pueden usar para detectar cualquier cepa de VPH oncogénico, por ejemplo, VPH 26, VPH 53, VPH 66, VPH 73, VPH 82, VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 35, VPH 30, VPH 39, VPH 45, VPH 51, VPH 52, VPH 56, VPH 59, VPH 58, VPH 33, VPH 66, VPH 68 o VPH 69, (particularmente cualquiera de las cepas más predominantes de VPH, por ejemplo, VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 33 y VPH 45) por detección de la proteína E6 a partir de esa fecha. En una realización, en el punto de iniciar los presentes métodos, no se sabe si las células fijadas o sin fijar contienen proteína E6 oncogénica o de qué cepa es una proteína E6 oncongénica. Si un ensayo de detección indica la presencia de una proteína E6 oncongénica en células, a continuación la identidad de la cepa del VPH que infectó a esas células se puede determinar con otros ensayos moleculares, por ejemplo, los que usan anticuerpos específicos para una proteína E6 en particular u otra proteína codificada por el virus, o por secuenciación del ADN viral.

55

50 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

60 **Ejemplo 1: Extracción de muestras clínicas con adiciones**

65 Células transfectadas con el gen E6 del VPH 16 (C33A+) se fijaron con medio THINPREP™ y se añadieron (es decir, "con adiciones") en porciones de las muestras clínicas fijadas con THINPREP™ tal como se enumera a continuación. Las células se añadieron en la mitad de cada una de cinco muestras clínicas (calamidad de muestra clínica con 20 millones de células C33A+).

Esquema de extracción:

Células C33A(+) con ThinPrep / 20 M de células por ml

- 5 1 – 20 M de células C33A(+) con ThinPrep en ½ negativo clínico Nº 229 (1,0 ml de extracción)
 2 – 20 M de células C33A(+) con ThinPrep en ½ negativo clínico Nº 230 (1,0 ml de extracción)
 3 – 20 M de células C33A(+) con ThinPrep en ½ negativo clínico Nº 231 (1,0 ml de extracción)
 4 – 20 M de células C33A(+) con ThinPrep en ½ negativo clínico Nº 232 (1,0 ml de extracción)
 5 – 20 M de células C33A(+) con ThinPrep en ½ negativo clínico Nº 233 (1,0 ml de extracción)
- 10 6 – 20 M de células C33A(+) con ThinPrep (1,0 ml de extracción)

Reactivos de extracción:

- 15 Triton X-100 / Lote 092K0171- (1 % = 250 ul)
 NaCl 5 M / Lote 5701-53- (0,15 M = 750 ul)
 Base Tris 0,5 M / Lote 5708-20- (0,1 M = 5 ml)
 Glicina 0,5 M / Lote 5708-9 - (0,1 M = 5 ml)
 SDS al 10 % / Lote 5708-8- (0,05 % = 125 ul)
 Urea 8 M / Lote 5678-83- (0,25 M = 781 ul)
- 20 Añadir RO/DI a 20 ml- (8,1 ml)
 NaOH 5 N / Lote A09522- (525 ul)
 Añadir RO/DI a 25 ml- (4,475 ml)
 pH final - 11,48
 Formulación final: Tris 0,1 M / glicina 0,1 M / NaCl 0,15 M / Triton™ X-100 al 1 % / SDS al 0,05 % / urea 0,25 M

25 pH 11,48

Procedimiento de extracción de proteínas:

- 30 1. Añadir suspensión celular a tubo de centrífuga de 50 ml
 2. Centrifugar a 3000 rpm durante 10-15 minutos
 3. Retirar cuidadosamente sobrenadante
 4. Transferir contenidos a un tubo nunc de 1,5 ml
 5. Centrifugar a 3000 rpm durante 10-15 minutos
 6. Retirar cuidadosamente sobrenadante
- 35 7. Añadir cantidad requerida de reactivo de extracción a sedimento
 8. Volver a suspender para separar sedimento celular
 a. Aditivos (DTT @ 1:100)
 9. Comprobar pH, ajustar a 11,5
 10. Mezclar a TA (o temperatura apropiada para extracción) durante 30 minutos
- 40 11. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10-15 minutos
 12. Retirar sobrenadante aclarado
 13. Añadir DTT @ 1:100
 14. Neutralizar a pH 8,0 con HCl 5 N y someter a ensayo en ELISA
 (Neutralizar a pH 8,0 con 31,0 ul de HCl 5 N / 1 ml)
- 45 DTT 100 mM / NR 5701-90 / DOM 2/7/05

Método ELISA

- 50 1 - Revestir placa (Nunc 439454 Maxisorp F96 / lote 542043) con 5 ug/ml de GST-Magi-PDZ (lote 88.18 / 0,65 ug/ul) en PBS (lote 021405)-100ul por pocillo
 11 ml x 5 ug/ml = 55 ug x 1 ul/0,65 ug = 84,6 ul de GST-Magi-PDZ
 2 - Incubar durante una noche a 4 °C
 3 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
 4 - Bloquear placa con 250 ul de tampón de bloqueo (lote 033005)

55 5 - Incubar durante 2 horas a 25 °C
 6 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
 7 - Añadir 100 ul MBP-E6 / muestra de lisado a pocillos apropiados
 8 - Incubar durante 1 hora a 25 °C
 9 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas

60 10 - Añadir 100 ul de anticuerpo anti-E6 (4C6 - 2,85 mg/ml - lote 02) @ 5 ug/ml a pocillo apropiado en tampón BSA HNTG al 2 % (lote 031805B). Péptido en el extremo N (HPV16E6 Nº de lote PN3952-2) se añade a muestras apropiadas a 10 ug/ml para verificar especificidad de señal (péptido se incuba previamente con el anticuerpo anti-E6 durante 45 minutos antes de adicción).

65 11 - Incubar durante 2 horas a 25 °C
 12 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
 13 - Preparar una dilución a 1:5000 de IgG-HRP de cabra antiratón (Jackson GxM IgG-HRP / Nº de catálogo 115-

- 035-062 / lote 60988) en BSA al 2 % / tampón Tween 20 al 0,05 % (lote 040505).
 10,0 ml x 1/5000 = 0,002 ml x 1000 ul/ml = 2,0 ul de IgG-HRP de cabra antiratón
 14 - Añadir 100 ul de dilución a 1:5000 de IgG-HRP de cabra antiratón a pocillos apropiados
 (Retirar Sustrato TMB y colocar a temperatura ambiente)
- 5 15 - Incubar durante 1 hora a 25 °C
 16 -Lavar 5x (TBS-Tween) con lavador de placas
 17 - Añadir 100 ul de Sustrato K-Blue TMB de Neogen (lote 041018)
 18 - Incubar durante 30 minutos a 25 °C
 19 - Añadir 100 ul de Solución de Detención (lote 030705) y Leer con A450
- 10

Formulación:

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

- 15 Bloqueador de BSA al 2 % lote 033005 (49,975 ml)

Tween 20 lote A016759301 (0,025 ml)

Resultados

20

| | Secuencial (NO péptido) | | | Secuencial (péptido en extremo N) | | |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|-------|----------|-----------------------------------|-------|-------|
| | DO | | Promedio | Promedio | DO | |
| Células TP C33A(+) 20 M en 1/2 negativo clínico Nº 229* | 1,294 | 1,220 | 1,257 | 0,464 | 0,516 | 0,411 |
| Células TP C33A(+) 20 M en 1/2 negativo clínico Nº 230* | 1,140 | 1,103 | 1,122 | 0,631 | 0,630 | 0,632 |
| Células TP C33A(+) 20 M en 1/2 negativo clínico Nº 231* | 1,136 | 1,178 | 1,157 | 0,443 | 0,451 | 0,434 |
| Células TP C33A(+) 20 M en 1/2 negativo clínico Nº 232* | 0,946 | 0,924 | 0,935 | 0,580 | 0,585 | 0,574 |
| Células TP C33A(+) 20 M en 1/2 negativo clínico Nº 233* | 1,288 | 1,169 | 1,229 | 0,843 | 0,843 | 0,843 |
| Células TP C33A(+) 20 M | 1,762 | 1,691 | 1,727 | 0,345 | 0,334 | 0,356 |
| C33A(*) / células 2 M / LB (+ve) | 2,052 | 2,134 | 2,093 | | | |
| C33A(-) / células 2 M / LB (-ve) | 0,167 | 0,188 | 0,178 | | | |
| Anti-4C6 + Extremo N (-ve) | 0,056 | 0,062 | 0,059 | | | |
| Anti-4C6 (-ve) | 0,106 | 0,115 | 0,111 | | | |

* Volumen de extracción - 1 ml

Tal como se puede observar a partir de los resultados que se han mostrado en la tabla anterior, la unión a E6 se detectó para todas las muestras clínicas con adiciones.

25 **Ejemplo 2: Efecto de tampón a pH elevado más aditivos en detección de MBP-E6**

El ejemplo que se describe en la Figura 1 ilustra el efecto de tampones de diferente composición en la detección de proteína de unión a maltosa recombinante (MBP)-proteína E6. Habitualmente, los tampones de extracción que se describen en el presente documento se usarían para extraer extracto de proteínas de células. Sin embargo, aquí, se usó proteína recombinante purificada previamente para optimizar las condiciones. En resumen, los experimentos que se describen en la Figura 1A implicaron suspender la proteína MBP-E6 en tampones de extracción recién preparados que diferían en el contenido de aditivos y en el pH. Esta etapa de "extracción" fue seguida de una etapa de neutralización en la que el pH de la muestra se ajustó a un pH neutro. A continuación se detectó proteína MBP-E6 usando un ensayo de flujo lateral.

35

Composición de los tampones

Los tampones usados en los experimentos que se describen en el presente documento se obtuvieron a partir de uno o dos tampones, un tampón a pH más bajo, "Tampón 1" o un tampón a pH más elevado, "Tampón 2". El Tampón 1 (pH de aproximadamente 11,5) consistía en: Tris/Glicina a aproximadamente 100 mM, Hepes a aproximadamente 50

mM, NaCl a aproximadamente 150 mM, EGTA a aproximadamente 1 mM, Triton™ X-100 aproximadamente al 1,1 %, y NaOH a aproximadamente 0,125-0,14 N. El Tampón 2 (pH de aproximadamente 12-13) consistía en NaOH a aproximadamente 0,1 N y Citrato Trisódico a aproximadamente 50 mM. Cada tampón se complementó a continuación, o no, con una cantidad "baja" o "elevada" del aditivo indicado en la Figura 1A. Los aditivos en los tampones con cantidad baja de aditivo tenían concentraciones de aproximadamente: urea 0,25 M; SDS al 0,05 %; Tween™-20 al 2 %; Brij™ 35 al 2 % (Sigma); saponina al 2 %; Tergitol NP 40 al 2 %; o EDTA 10 mM, pH 8. Los aditivos en los tampones con cantidad elevada de aditivo tenían concentraciones de aproximadamente urea 2 M; SDS al 0,5 %; Tween™-20 al 4 %; Brij™ 35 al 4 %; saponina al 4 %; Tergitol NP 40 al 4 %; o EDTA 50 mM, pH 8. Tal como se ha indicado anteriormente, el Tampón 1 tenía un nivel de reserva de Triton™ X-100 al 1,1 %, que se usó para las muestras tanto baja como elevada. Para el Tampón 2, Triton™ X-100 tenía a una concentración de un 2 % (baja) o un 4 % (elevada).

En la mayoría de los ejemplos que se describen en el presente documento, los tampones se prepararon, incluyendo los aditivos individuales, inmediatamente antes de la adición a las muestras. Sin embargo, en algunos casos, las muestras se trataron primero con tampón antes de que se introdujeran en la muestra uno o más aditivos.

Detección de la proteína MBP-E6

En el experimento que se representa en la Figura 1A, 520 pg de MBP-E6 se suspendieron en 1,03-1,13 ml del tampón de extracción indicado que se había preparado recientemente con el aditivo indicado. La suspensión se mezcló suavemente (de extremo a extremo) a TA durante aproximadamente 30 minutos. Para la etapa de neutralización, la suspensión se ajustó a un pH más bajo (de aproximadamente 7,8 a 8) usando Tris a aproximadamente 2 M y de nuevo se giró a TA durante 30 minutos. Aproximadamente 150-200 μ l de la muestra se analizaron con el ensayo de flujo lateral (LF) que se describen el presente documento para detectar la proteína recombinante MBP-E6.

Descripción del ensayo de flujo lateral (LF)

El ensayo de flujo lateral (LF) escribe en el presente documento también se conoce como un ensayo inmunocromatográfico o ensayo de varillas de medición. En resumen, el ensayo de LF aquí implica la captura de proteínas virales unidas a partículas de oro en una "zona de captura" presente en una varilla de LF. La captura satisfactoria como resultado la aparición de una línea visible y detectable en la tira de LF. Materiales: 0,22 μ m de BSA al 20 % (p/v) filtrados (Sigma A7906); Oro Coloidal conjugado con 8G11 (BBI); tiras para flujo lateral, captura de PDZ.

Método:

- 1) Aproximadamente 150-200 μ l de muestra se colocan en pocillos por duplicado en una placa de 96 pocillos.
- 2) Aproximadamente 20 μ l de BSA al 20 % se añaden a cada pocillo y se mezcla con una punta de pipeta.
- 3) Aproximadamente 10 μ l de oro coloidal conjugado con 8G11 se añaden a cada pocillo y se mezcla con una punta de pipeta. 8G11 es un anticuerpo monoclonal (mAb) que reconoce la proteína E6 de VPH 16.
- 4) Una tira para LF se coloca en cada pocillo durante aproximadamente 120 minutos para permitir que la muestra migre hacia arriba de la tira por acción capilar. Un lecho absorbente se puede unir al extremo distal para facilitar el flujo del líquido hacia arriba de la tira. Durante la migración de la muestra, la proteína E6 de VPH 16 se puede unir al mAb unido a las partículas de oro coloidal. La proteína E6 también es capturada en una zona de la tira para LF que contienen múltiples proteínas que soportan el dominio PDZ capaces de reconocer a la proteína E6. Dicha captura da como resultado la aparición de una línea de color rojo visible y detectable en la tira para LF.
- 5) Las tiras para LF se analizan la coordinación con un instrumento UMM, que es un lector de reflectancia instrumentado capaz de cuantificar la salida de la señal visible. Los valores obtenidos son valores de reflectancia relativa.

Resultados

El ejemplo que se ilustra en la Figura 1 muestra que la combinación de determinados aditivos con tampón de extracción a pH elevado (Tampón 2, pH 12,9), provoca un efecto sinérgico en la detección de la proteína MBP-E6. Por ejemplo, cuando el Tampón 1 se comparó con el Tampón 2 en ausencia de aditivos, parecía que el pH mejorado no tenía efecto en la detección de la proteína MBP-E6 recombinantes (Fig. 1A, últimas 4 columnas). Determinados aditivos, en particular SDS, Tween™-20, Brij™ 35 y Tergitol NP40, aumentaron la detección de proteína MBP-E6 incluso cuando se usó el tampón con pH comparativamente menor, Tampón 1, pH 11,5 (Fig. 1A). Sin embargo, cuando los aditivos se combinaron con el tampón de pH más elevado (Tampón 2), la detección de la proteína recombinante aumentó en gran medida en las muestras con SDS, Tween™-20, Triton™ X 100, y Brij™ 35. Por ejemplo, la detección de la proteína en la muestra tratada con Triton™ X-100 aumento de lectura de UMM 0 a más de ~ 2,4 cuando aumentó el pH. De este modo, es posible concluir que la combinación de un pH elevado con algunos de los aditivos durante la etapa de "extracción" ejerció un efecto sinérgico sobre la detección de la proteína E6.

65

La Figura 1B describe experimentos que fueron similares a los realizados en la 1A. Sin embargo, en la Figura 1B, los aditivos se introdujeron en la muestra durante la etapa de neutralización en lugar de en la etapa de "extracción" anterior. Este enfoque produjo intensidades de la señal mucho más bajas que cuando los aditivos se introdujeron durante la etapa de extracción. Por consiguiente, la introducción de los aditivos en la etapa de neutralización no es un enfoque óptimo.

Ejemplo 3: Efecto de aditivos en la extracción de proteína E6 de células

El ejemplo ilustrado en la Figura 2 evaluó el efecto de diferentes porcentajes de aditivos de tampón en la extracción de proteína E6 de células. En este ejemplo, se extrajo proteína a partir de células SiHa que expresan el gen E6 de VPH 16 o de células C33A-, que son una línea celular de cáncer de cuello de útero no infectadas con VPH.

Etapa de extracción

Para la etapa de extracción, sedimentos celulares que contenían aproximadamente 10 millones de células se retiraron primero de un congelador a -80 °C y se permitió que se descongelaran a TA durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, se añadieron aproximadamente 750 µl del Tampón 2, que se describe en el Ejemplo 2, a la mayoría de las muestras. Además, se introdujeron aditivos tales como Brij™ 35, Tween™-20, o Triton™X-100 en las muestras indicadas. Estos aditivos estaban presentes a una concentración final de un 2 % o un 4 % (v/v). Como un control, algunas muestras se extrajeron con Tampón 673, un tampón a pH neutro que contenía Tris 20 mM al pH 8, BSA al 2 %, Triton™-X 100 al 1 %, Tween™-20 al 2 %, Sarcosina al 0,2 %, NaCl 250 mM, y EDTA 50 mM. Las muestras se sometieron brevemente agitación vortical y a continuación se giraron durante 30 minutos a TA.

Etapa de neutralización

Para la etapa de neutralización, se añadieron aproximadamente 140-180 µl de Tris 2 M, pH 6,0, para reducir el pH de cada muestra a aproximadamente pH 7,8-8. El volumen de Tris, pH 6,0, necesario para neutralizar el pH de las muestras se determinó previamente de forma empírica. Despues de la adición del Tris y una breve agitación vortical, las muestras se giraron a TA durante 30 minutos. A continuación, las muestras se aclararon con 10 minutos de centrifugación a 14K rpm. Los lisados aclarados (aproximadamente 1,09 de volumen final) se transfirieron a continuación a un tubo limpio antes de su análisis con el ensayo de LF que se ha descrito en el Ejemplo 2.

Resultados

La proteína E6 de VPH 16 se detectó mejor cuando se usó el Tampón 2 que contenía Brij™ 35 al 4 % en la etapa de extracción (Figura 2). Además, la comparación de la señal a partir de las células SiHa con las células C33A-negativas para E6 del VPH, indicaron que esta condición también aumentó considerablemente la relación señal a ruido del ensayo (Figura 2).

Ejemplo 4: Detección de respuesta a la dosis de proteína E6 de VPH-16 después de extracción con Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2

En este ejemplo, números crecientes de células SiHa y Caski que expresan E6 de VPH-16 se extrajeron con Brij™ 35 al 4 % /Tampón 2 que se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3. El método de extracción fue similar al que se ha descrito en el Ejemplo 3, y se usó una concentración de partida de aproximadamente 9,2 millones de células/ml. El ensayo de LF difiere, sin embargo, en que se usaron números de células progresivamente crecientes por tira de LF. Tal como se indica en la Figura 3, los números de células por tira usadas en el ensayo de LF eran aproximadamente 31.000; aproximadamente 62.000; aproximadamente 125.000; aproximadamente 250.000; aproximadamente 500.000; aproximadamente 1.000.000; o aproximadamente 1.700.000. Los controles negativos incluyan la extracción de estas células con un tampón 673 a pH neutro (que se describe en el Ejemplo 3) y extracción de células C33A negativas para VPH-con Brij™ 35 al 4 % /Tampón 2 o tampón 673.

Tal como se ilustra en la Figura 3, no hubo respuesta a la dosis cuando se usaron las células C33A, y solamente una respuesta limitada a la dosis cuando se usó tampón 673 a pH neutro. Sin embargo, se detectaron cantidades crecientes de proteína E6 en ambas líneas celulares que expresan E6 de VPH-16 (SiHa y Caski) como resultado del uso de números crecientes de células. Éstos resultados indicaron que el ensayo detectó la proteína E6 de VPH-16 y una forma de respuesta a dosis.

Ejemplo 5: Uso de Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 en la extracción de proteína E6 de VPH-16 a partir de muestras clínicas con adiciones

El ejemplo que se representa en la Figura 4 ilustra la detección de proteína E6 de VPH 16 en extracciones a partir de muestras clínicas normales de PAP que se habían combinado o "añadido" con células SiHa que expresan E6 de VPH 16. Las muestras clínicas usadas en este ejemplo que dan muestras del cuello uterino tomadas con cepillo, sin fijar que dieron negativo con el frotis tradicional de Pap. Las muestras primero se retiraron de un congelador a -80 °C y se permitió que se descongelaran a TA durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, se usaron corta

alambres pequeños para recortar cada cepillo, que qué a continuación se colocó en un tubo de microcentrífuga que contenía un sedimento celular congelado de aproximadamente 10 millones de células SiHa. Extracción, neutralización y ensayo de LF de las muestras se realizaron de una forma similar a la que se ha descrito en los Ejemplos 3 y 4. Para este experimento, se usó Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 o tampón 673 neutro (ambos de los cuales se describieron en ejemplos anteriores) durante la etapa de extracción. El volumen de extracción para ambos tampones fue de aproximadamente 1 ml.

Se detectó proteína E6 de VPH 16 significativa en las cinco muestras clínicas con adiciones de células SiHa extraídas usando Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 (Figura 4). Por el contrario, la extracción de las cinco muestras sin adiciones de SiHa dio como resultado una señal comparativamente menor. De forma análoga, el uso de Tampón 673 para extraer cada tipo celular también dio como resultado una señal comparativamente menor. Estos resultados sugieren que el Brij™ 35/Tampón 2 se podría usar satisfactoriamente en el futuro para detectar la proteína E6 de VPH 16 en muestras clínicas.

15 Ejemplo 6: Optimización adicional de Brij™ 35/Tampón 2 para uso en extracción de proteínas

Este ejemplo ilustra la optimización adicional de extracción con Brij™ 35 usando diferentes porcentajes de Brij™ 35 y/o diferentes combinaciones de aditivos. Aquí, el Tampón 2 (que se describe en el Ejemplo 2) que contiene niveles variables de Brij™ 35 se usó para ayudar en la extracción de E6 de VPH 16 a partir de células SiHa, una línea celular transfectada con el gen para E6 de VPH 16 (Figura 5). Además, también se sometió a ensayo el Tampón 2 que contenía Brij™ 35 en combinación con otros aditivos tales como EDTA, Tween™-20, o Triton™ X-100. Para este experimento, las etapas de extracción, neutralización y ensayo de LF fueron similares a las que se describen en los Ejemplos 2 y 3 excepto en que se cambió el nivel de aditivo usado en el tampón de extracción. La cantidad de aditivos usado en el tampón de extracción fue: Brij™ 35 al 4 %, Brij™ 35 al 5 %, Brij™ 35 al 6 %, Brij™ 35 al 4 % + EDTA 10 mM, Brij™ 35 al 2 % + Tween-20 al 2 %, Brij™ 35 al 2 % + Triton™X-100 al 2 %, Brij™ 35 al 2 % + Tween™-20 al 2 % + Triton™ X-100 al 2 %, o Brij™ 35 al 2 % + Tween™-20 al 2 % + EDTA 10 mM. Como un control, algunas muestras se extrajeron con tampón 673 a pH neutro. El número aproximado de células por tira de LF fue aproximadamente 1.300.000.

30 Tal como se muestra en la Figura 5, el aumento del porcentaje de Brij™ 35 de un 4 % a un 6 % dio como resultado una mayor detección de la proteína E6 de VPH 16. El ensayo también se mejoró mediante la adición de Triton™ X-100 y/o Tween™ -20 al tampón Brij™ 35.

35 Ejemplo 7: Efecto de la coordinación del tiempo de las etapas de extracción y/o neutralización en la detección de proteína E6 de VPH 16

Este ejemplo ilustra el efecto que la coordinación del tiempo de las etapas de extracción y/o neutralización tuvo en la última detección de la proteína E6 de VPH. En este ejemplo, la proteína E6 se extrajo a partir de células SiHa de nuevo siguiendo generalmente los procedimientos que se han descrito en el Ejemplo 3. Sin embargo, en este ejemplo, el tiempo de incubación para las etapas de extracción y/o neutralización se cambió (Figura 6). Las células SiHa se extrajeron a aproximadamente 10.000.000 células/ml para 30 minutos o 10 minutos y se neutralizó para 30 minutos o 10 minutos, tal como se indica en la Figura 6. El tiempo de detención para la etapa de neutralización se definió mediante el tiempo de centrifugación para la etapa de aclarado. Además, para el ensayo LF, se usaron 1.700.000 o 500.000 de células SiHa por tira.

45 No se detectaron diferencias significativas en la proteína E6 de VPH-16 cuando se usaron tiempos de incubación de extracción o neutralización diferentes (Figura 6). Este ejemplo indica por lo tanto que el ensayo no se ve afectado de forma adversa cuando la coordinación del tiempo de las etapas de incubación de extracción y/o neutralización se cambia de 30 minutos a 10 minutos.

50 Ejemplo 8: Uso del Brij™35 al 4 %/Tampón 2 para extraer las variantes VPH 18 y VPH 45 de la proteína E6

Este ejemplo ilustra la aplicación del sistema de extracción con Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 que se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3 para extraer la proteína E6 de diferentes cepas de VPH (Figura 7). La proteína E6 se extrajo a partir de células HeLa que expresan VPH 18 o células MS751 que expresan VPH 45. La línea celular C33A- negativa para VPH se usó como un control negativo. Los procedimientos de extracción y de neutralización fueron similares a los que se han descrito en los Ejemplos 2 y 3. Para el ensayo de LF, el equivalente de aproximadamente 1.700.000 células de cada tipo se usó por tira de LF. Además, el oro coloidal usado en el ensayo de LF se conjugó con anticuerpo monoclonal F82-5A2, que reconoce las proteínas E6 de las cepas de VPH 18 y 45.

60 Tal como se demuestra en la Figura 7, el sistema de extracción con Brij™35 al 4 %/Tampón 2 se puede usar de forma satisfactoria para extraer la proteína E6 de VPH 18 y la proteína E6 de VPH 45.

Ejemplo 9: Uso de Brij™35 al 4 %/Tampón 2 para extraer las variantes VPH 16 y VPH 18 de la proteína E6

Este ejemplo compara la extracción con Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 de la proteína E6 de VPH 16 con la de la proteína E6 de VPH 18. Las etapas de extracción y de neutralización para el experimento que se ha descrito en la Figura 8 se realizaron una forma similar a las del Ejemplo 8. Sin embargo, este ejemplo usó células SiHa que expresan VPH 16 y células HeLa que expresan VPH 18. Como anteriormente, se usaron células C33A- como un control negativo. Para el ensayo de LF, se usaron números crecientes de células (mismo intervalo que en el Ejemplo 4) por tira de LF. Además, se usó se usó oro anti-VPH 16 en el ensayo de LF de los extractos de células SiHa, mientras que se usó oro anti-VPH 18 en el ensayo de LF de los extractos de células HeLa.

La proteína E6 se detectó en extractos de las células HeLa y SiHa (Figura 9). No detección tanto de la proteína E6 de VPH 16 como de la proteína E6 de VPH 18 se produjo una forma de dosis-respuesta (Figura 9).

Ejemplo 10: Optimización adicional del sistema Brij™ 35/Tampón 2

Este ejemplo ilustra el efecto de la variación del nivel de Brij™ 35 de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 10 % en el Tampón 2 (que se describe en el Ejemplo 2). Para el experimento que se describe en la Figura 9, las etapas de extracción y de neutralización fueron similares a las del Ejemplo 3. Como en ese ejemplo, las células de partida fueron las células SiHa infectadas con VPH 16 o células C33A- negativas para VPH. Aquí, sin embargo, el porcentaje de Brij™ 35 presente en el momento de la extracción se cambió. Más específicamente, los porcentajes de Brij™ 35 usados fueron: aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 8 % o aproximadamente un 10 %. Además, también se sometieron a ensayo Brij™ 35 al 2 %/Tween™ 20 al 2 % y Brij™ 35 al 2 %/Tween™-20 al 2 %/EDTA 10 mM. Se realizó un ensayo de LF tal como se describe en el presente documento. Se usaron aproximadamente 1,7 millones de células por tira de LF.

Tal como se indica en la Figura 9, la señal positiva a partir de los extractos de las células SiHa aumentaron con la concentración creciente de Brij™ 35. Sin embargo, la señal también aumentó en extractos preparados a partir de células C33A- negativas para VPH, dando como resultado relaciones disminuidas de señal a ruido con porcentajes más elevados de Brij™. Parecía que la relación de señal a ruido del ensayo era mejor, sin embargo, cuando se usó Brij™ al 4 % o al 6 %. Además, parecía que la combinación de Brij™ con Tween™-20 también mejoraba la señal a ruido.

Ejemplo 11: Optimización de extracciones a partir de muestras clínicas negativas con adiciones de SiHa

Este ejemplo ilustra el efecto de la variación de las condiciones de extracción en la extracción de proteína E6 a partir de muestras clínicas negativas con adiciones de SiHa. La preparación de muestras así como las etapas de extracción y neutralización usadas aquí son similares a las que se han usado en el Ejemplo 5. Sin embargo, en este ejemplo, las muestras clínicas negativas (NCS) estaban presentes en un hisopo en lugar de en un cepillo. Además, las condiciones de extracción se variaron en este experimento para incluir Tampón 2 con Brij™ 35 al 4 %; Brij™ 35 al 2%/Tween™-20 al 2 %, o; Brij™ 35 al 2 %/ Tween™-20 al 2 %/EDTA 10 mM (Figura 10). Tal como se indica, se usaron aproximadamente 1,7 millones de células SiHa/tira para el ensayo de LF.

Tal como se indica con los resultados que se muestran en la Figura 10, la condición de Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 puede ser la mejor condición para detectar la proteína E6 de VPH 16 en muestras clínicas, dado que las muestras con adiciones de SiHa produjeron señales positivas relativamente coherentes, mientras que las muestras negativas dieron como resultado señales relativamente más bajas (Figura 10).

Ejemplo 12: Extracción de proteína E6 de VPH 16 a partir de células SiHa en presencia de células negativas para VPH

Este ejemplo ilustra la extracción de proteína E6 de VPH 16 a partir de células SiHa en presencia de células C33A- negativas para VPH. Para este ejemplo, cantidades crecientes de extractos de SiHa se valoraron en tampón que contenía una cantidad fija (aproximadamente 1 millón/ml) de células C33A- (Figura 11). Para este experimento, cada línea celular se extrajo separadamente usando Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 o Tampón de Lisis de Arbor Vita (AVLB). AVLB consiste en HEPES a aproximadamente 50 mM, pH a aproximadamente pH 7,5, Triton™X-100 aproximadamente al 1,1 %, NaCl a aproximadamente 150 mM, glicerol aproximadamente al 10 % y EGTA a aproximadamente 1 mM. Las etapas de extracción y de neutralización se realizaron de la forma similar a la del Ejemplo 3. Sin embargo, en este experimento, se preparó diluyente que consiste en AVLB o Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 neutralizado. A continuación se hicieron adiciones de extracto de C33A en cada tampón a un nivel de aproximadamente 1 millón de células/ml. A continuación, extractos de células SiHa se diluyeron en serie los tampones indicados que contenían C33A-. Las muestras se analizaron por ensayo de perlas citométricas (CBA) y se leyeron con un fluorímetro.

Los resultados de este experimento recordaron que la mejor condición para la detección de proteína E6 de extracción y neutralización con Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 seguido de dilución en tampón AVLB (Figura 11). Además, parecía que el nivel de detección de proteína E6 era de aproximadamente 5000 células/ml o 500 células/pocillo

(Figura 11).

Ejemplo 13: Extracción de proteína E6 de VPH 16 a partir de células SiHa fijadas en fijador ThinPrep™ o SurePath™

Este ejemplo ilustra que el sistema de extracción con Tampón 2/Brij™ 35 al 4 % se puede usar para extraer proteínas a partir de células fijadas. En el experimento que se describe en la Figura 12, 10 millones de células SiHa positivas para VPH 16 o C33A- negativas para VPH se añadieron a 1 ml del fijador indicado o medios DMEM durante 1 hora a TA. A continuación, las células se centrifugaron a 1000 RPM durante 15 minutos, se sedimentó, y se volvió a suspender en 1 ml de Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 que se describe en el Ejemplo 3. Las muestras se sometieron a continuación a las etapas de extracción, neutralización y ensayo de LF que se describen en el Ejemplo 3.

Tal como se indica en la Figura 12, la proteína E6 presentes en células SiHa fijadas tanto con ThinPrep™ como con SurePath™ se detectaron satisfactoriamente cuando se usó Brij™ 35 al 4 %/Tampón 2 en la etapa de extracción.

Es evidente que partir de los resultados y análisis anteriores, que los métodos en cuestión proporcionan un número de diferentes ventajas para el análisis molecular de células fijadas o sin fijar. En particular, los métodos proporcionan un método de rutina para la producción de un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar en el que las proteínas en el extracto de proteínas se pueden detectar en ensayos de unión. Dado que generalmente es difícil detectar determinadas proteínas en células fijadas o sin fijar, de invención en cuestión representa una contribución significativa a la técnica.

Ejemplo 14: Efecto del filtrado de extracto de proteínas a través de un filtro de membrana en caudal de muestra

En este ejemplo, la proteína se extrajo a partir de células SiHa que expresan la proteína E6 de VPH 16 o de células C33A, que son una línea celular de cáncer de cuello uterino no infectadas con VPH, y se desarrollan a través de un filtro de membrana antes de evaluar el caudal de la muestra resultante.

Etapa de extracción
 Para la etapa de extracción, sedimentos celulares que contenían aproximadamente 10 millones de células se retiraron de un congelador a -80 °C y se permitió que se descongelaran a TA durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, se añadieron aproximadamente 750 µl de Tampón 2, que se describe en el Ejemplo 2, la mayoría de las muestras. Además, se introdujeron aditivos tales como Brij™ 35, Tween™-20, o Triton™X-100 a las muestras indicadas. Estos aditivos estaban presentes a una concentración final de un 2 % o un 4 % (v/v). Las muestras se sometieron brevemente a agitación vortical y a continuación se giraron durante 30 minutos a TA.

Etapa de neutralización
 Para la etapa de neutralización, se añadieron aproximadamente 140-180 ul de Tris 0,9 M, pH 7,8, para reducir el pH de cada muestra a aproximadamente pH 8,5. El volumen de Tris, pH 7,8, necesario para neutralizar el pH de las muestras se determinó previamente de forma empírica. Después de la adición del Tris y una breve agitación vortical, las muestras se giraron a TA durante 30 minutos. A continuación, los gustos se aclararon durante 10 minutos de centrifugación a 14K rpm.

Etapa de filtrado
 Los lisados aclarados (aproximadamente 1,09 de volumen final) se filtraron a través de un filtro de jeringa de PVDF de 5,0 µm de Millipore. A continuación, las muestras se desarrollaron a través de un dispositivo de flujo continuo de muestra y se midieron durante el período de tiempo necesario para que toda la muestra se desarrollara. Además, las muestras se evaluaron para la fuerza de la señal del inmunoensayo y se leyeron visualmente o con un densímetro CAMAG. La presencia de E6 de VPH se puntuó visualmente en una escala de 0-4.

Resultados
 Los tiempos de flujo para las muestras desarrolladas a través un filtro de jeringa de PVDF de 5,0 µm se redujeron, en algunos casos en casi un 50 %. Los datos se muestran en la Tabla 1 que sigue a continuación. Además, la evaluación de las muestras mediante lectura visual no mostró pérdida significativa en la señal de SiHa después de filtrar a través de un filtro de jeringa de 5,0 µm (Figura 13).

Tabla 1. Evaluación de flujo de muestras después de filtrar

| Combinación de muestras | Tiempos de flujo de muestras (sin filtrar) (minutos) | Tiempos de flujo de muestras (filtradas) (minutos) | Combinación de muestras | Tiempos de flujo de muestras (sin filtrar) (minutos) | Tiempos de flujo de muestras (filtradas) (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 | | | |

La cita de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y se debería interpretar como una admisión de que la presente invención no da derecho a antedatrar dicha publicación en virtud de la invención anterior.

5

Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión, es fácilmente evidente para los expertos en la materia a la vista de las enseñanzas de la presente invención que se pueden hacer determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse de las reivindicaciones adjuntas.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un extracto de proteínas a partir de células fijadas o sin fijar, que comprende:
 - 5 (a) poner en contacto dichas células con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia que tenga un pH mayor de pH 10,0; y
 - (b) poner en contacto dicha composición intermedia con un reactivo de neutralización para reducir dicho pH de dicha composición intermedia y producir dicho extracto de proteínas,
 - 10 en el que uno o ambos de dicho reactivo de extracción y dicho reactivo de neutralización comprenden un alquil éter de polioxietileno.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende:
 - 15 (a) poner en contacto dichas células con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia que tiene un pH mayor de pH 10,0, en donde dicho reactivo de extracción comprende un alquil éter de polioxietileno; y
 - (b) poner en contacto dicha composición intermedia con un reactivo de neutralización para reducir dicho pH de dicha composición intermedia y producir dicho extracto de proteínas a un pH de 6-9.
 - 20 3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende:
 - (a) poner en contacto dichas células con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia que tenga un pH mayor de pH 10,0; y
 - (b) poner en contacto dicha composición intermedia con un reactivo de neutralización para reducir dicho pH de dicha composición intermedia y producir dicho extracto de proteínas a un pH de 6-9, en donde dicho reactivo de neutralización comprende un alquil éter de polioxietileno.
 - 30 4. El método de la reivindicación 1 para extraer una proteína viral diana a partir de una muestra celular que contiene células en las que una proteína viral diana está presente o se sospecha que está presente.
 5. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 4, en el que dicho alquil éter de polioxietileno es un tensioactivo Brij.
 - 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho alquil éter de polioxietileno es Brij 35.
 7. El método de la reivindicación 5, en el que el alquil éter de polioxietileno es Brij 35 y la concentración de dicho Brij 35 en el reactivo de extracción está dentro de un 2-6 % (v/v).
 - 40 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho reactivo de extracción comprende adicionalmente NaOH 0,1 N, Citrato TriSóbico 50 mM, y tiene un pH de 12,5 a 12,9.
 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho reactivo de extracción comprende adicionalmente detergente Triton o detergente Tween, o mezcla de los mismos, opcionalmente detergente Triton X-100 o detergente Tween-20.
 - 45 10. El método de la reivindicación 9, en el que la concentración de dicho detergente Triton X-100 o Tween-20 o ambos está dentro de un 1-6 % (v/v).
 - 50 11. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 4, en el que el reactivo de neutralización es un tampón a base de Tris.
 12. El método de la reivindicación 1, en el que las muestras se incuban:
 - 55 (a) al menos 10 minutos después de la adición del reactivo de extracción, o
 - (b) entre 10 y 30 minutos después de la adición del reactivo de extracción, o
 - (c) al menos 10 minutos después de la adición del reactivo de neutralización, o
 - (d) entre 10 y 30 minutos después de la adición del reactivo de neutralización.
 - 60 13. El método de la reivindicación 4, en el que las muestras se incuban:
 - (a) entre 10 y 30 minutos después de la adición del reactivo de extracción; o
 - (b) entre 10 y 30 minutos después de la adición del reactivo de neutralización.
 - 65 14. El método de la reivindicación 5, en el que dicho tensioactivo Brij es uno o más de Brij 35, lauril éter de polioxietileno (23), $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n-23; Brij 30, lauril éter de polioxietileno (4) ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n-4); Brij 52, cetil éter de polioxietileno (2) ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, n-2); Brij 56, cetil

- éter de polioxietileno (10) ($C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_nOH$, n-10); Brij 58, cetil éter de polioxietileno (20) ($C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_nOH$, n-20); Brij 72, estearil éter de polioxietileno (2), ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n-2); Brij 76, estearil éter de polioxietileno (10) ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n-10); Brij 78, estearil éter de polioxietileno (20) ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 20); Brij 92, oleil éter de polioxietileno (2) ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 2); Brij 93, oleil éter de polioxietileno (2); ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n-2); Brij 97, oleil éter de polioxietileno (10) ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 10); Brij 98, oleil éter de polioxietileno (20) ($C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 20); Brij 700, estearil éter de polioxietileno (100), ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_2OH$, n ~ 100); o Brij 721, estearil éter de polioxietileno (21) ($C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_nOH$, n ~ 21).
- 10 15. El método de la reivindicación 1, en el que:
- dichas células fijadas o sin fijar están comprendidas en una muestra celular, en el que la muestra celular contiene opcionalmente células retiradas de un individuo, y en el que la muestra celular contiene o se sospecha que contiene una proteína diana.
- 15 16. El método de la reivindicación 1, en el que dicho pH está en el intervalo de pH 11,0 a pH 13,0.
17. El método de la reivindicación 1, en el que dicho reactivo de extracción comprende adicionalmente un desnaturalizante, en el que dicho desnaturalizante es dodecil sulfato sódico (SDS), urea o sarcosilo.
- 20 18. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de filtrar el extracto de proteínas a través de un filtro.
- 25 19. El método de la reivindicación 18, en el que el filtro tiene un tamaño de poro de entre 0,1 μm y 50,0 μm y/o en el que el filtro está compuesto de polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), rayón, nylon, poli(butirato de vinilo), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, papel de filtro de fibra de vidrio, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilo, poliamida, policarbonato, orlón, poliéster, poliestireno o cualquier combinación de los mismos.
- 30 20. El método de la reivindicación 1, en el que dicha proteína diana se conoce previamente o se caracteriza de otro modo, y el método comprende adicionalmente someter a ensayo la presencia de dicha proteína en dicho extracto de proteínas.
- 35 21. El método de la reivindicación 20 en el que dicho ensayo:
- usa un agente de captura para dicha proteína diana, o
usa una matriz de perlas citométricas (CBA) o ensayo basado en perlas multiplexadas, o incluye un ensayo inmunológico.
- 40 22. El método de la reivindicación 21, en el que dicho ensayo:
- es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); o
es un ensayo inmunocromatográfico o ensayo de flujo lateral (LF), que opcionalmente usa partículas de oro conjugadas con anticuerpos monoclonales; o
usa anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia; o
usa partículas quimioluminiscentes, partículas de látex coloreadas/teñidas, partículas para Raman de SERS, núcleos de oro revestidos con sílice con diversos colorantes indicadores, o núcleos de plata revestidos con sílice con colorantes indicadores; o
50 emplea el uso consecutivo de uno o más anticuerpos monoclonales.
23. El método de la reivindicación 4, en el que las células en la muestra celular están fijadas con un fijador químico, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en alcoholes, aldehídos, cetonas, tetraóxido de osmio, ácido acético, ácido pícrico, sales de iones metálicos pesados y propilenglicol.
- 55 24. El método de la reivindicación 23, en el que el alcohol es metanol o etanol; el aldehído es glutaraldehído o formaldehído; y la cetona es acetona.
25. El método de la reivindicación 15 o de la reivindicación 23, en el que dichas células fijadas están presentes en un medio de transporte que comprende metanol o etanol.
- 60 26. El método de la reivindicación 20 o de la reivindicación 23, en el que dichas células fijadas o sin fijar son células del cuello uterino.
- 65 27. El método de la reivindicación 20, en el que dichas células fijadas o sin fijar se reciben a partir de una posición lejana antes de dicha etapa de puesta en contacto a), y, opcionalmente, en donde el método comprende

adicionalmente d) comunicar resultados de dicho ensayo a una posición lejana.

28. El método de la reivindicación 4, en el que la proteína viral diana está codificada por un virus patógeno.

5 29. El método de la reivindicación 28, en el que el virus patógeno se selecciona entre el grupo que consiste en VIH, virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la hepatitis, virus sincitial respiratorio (RSV), virus del herpes simplex (VHS) y virus del papiloma humano (VPH).

10 30. El método de las reivindicaciones 4, 15 o 28, en el que la proteína viral diana es la proteína E6 o E7 del VPH.

10 31. El método de la reivindicación 30, en el que el VPH es la cepa del VPH 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 u 82; o

15 en el que el VPH es una cepa de VPH oncogénico seleccionada entre el grupo que consiste en VPH 26, VPH 53, VPH 66, VPH 73, VPH 82, VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 35, VPH 30, VPH 39, VPH 45, VPH 51, VPH 52, VPH 56, VPH 59, VPH 58, VPH 33, VPH 68, VPH 69 y VPH 82.

32. El método de la reivindicación 4 que comprende adicionalmente detectar la presencia de la proteína viral diana en el extracto, opcionalmente en el que la detección usa un agente de captura para la proteína viral diana.

20 33. El método de la reivindicación 32, en el que:

la proteína diana es la proteína E6 del VPH y el agente de captura es un anticuerpo frente a la proteína E6; o
la proteína diana es la proteína E6 del VPH y el agente de captura comprende tanto un anticuerpo frente a la proteína E6 como un polipéptido que contiene un dominio PDZ; o

25 la proteína diana es la proteína E6 del VPH; y el agente de captura comprende un péptido BP o AP; o
el dominio PDZ es el segundo dominio de MAGI-1, o el dominio PDZ de DLG o TIP1.

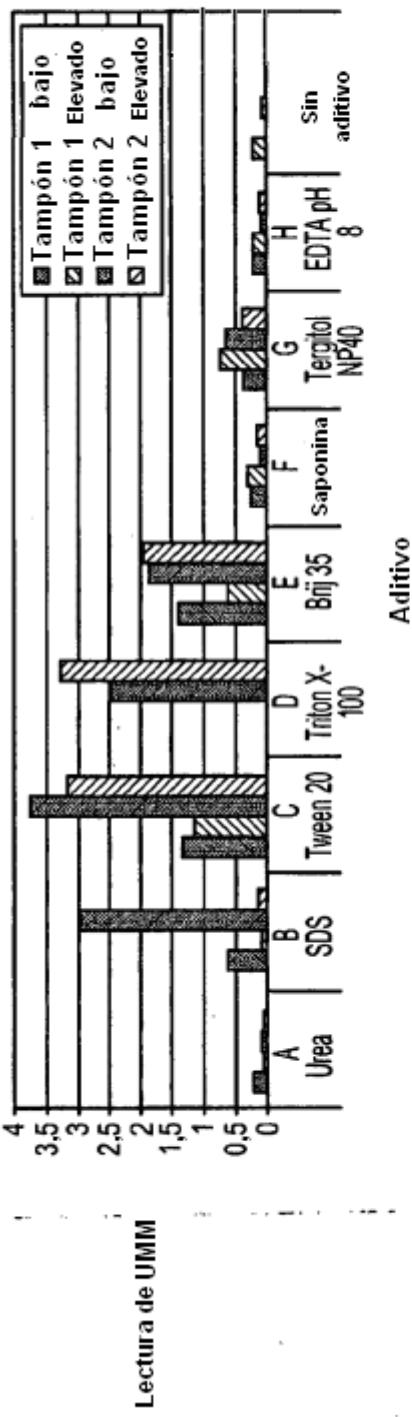
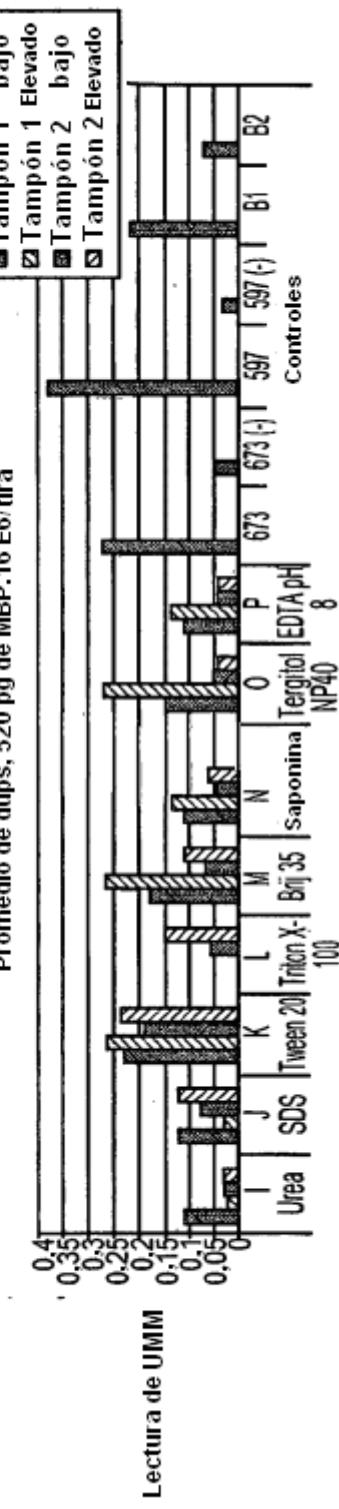
34. Un kit para producir un extracto de proteínas, de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, comprendiendo dicho kit:

30 un reactivo de extracción que tiene un pH mayor de pH 10,0, y
un reactivo de neutralización,

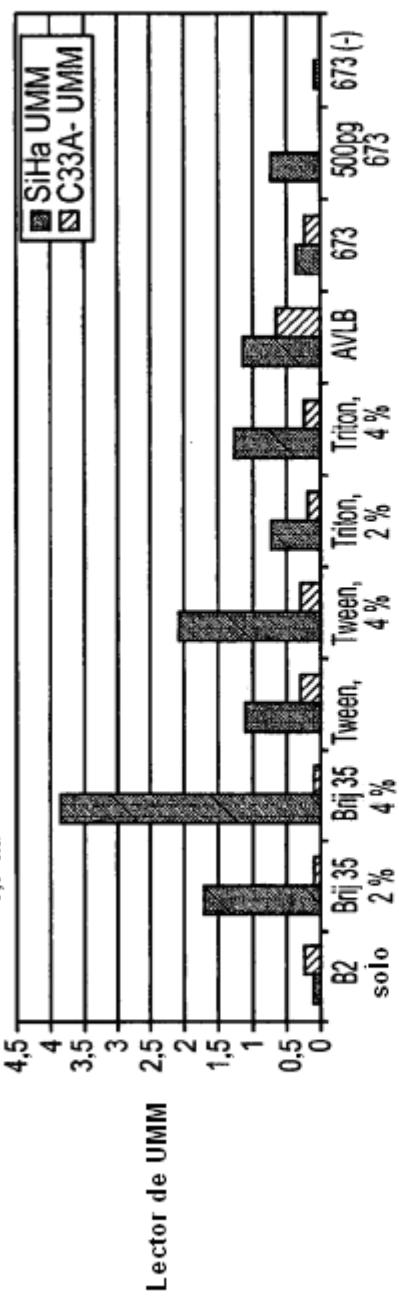
35 en el que uno o ambos de dicho reactivo de extracción y dicho reactivo de neutralización comprende un alquil éter de polioxietileno.

35. El kit de la reivindicación 34, que comprende adicionalmente reactivos para detectar una proteína diana en dicho extracto de proteínas.

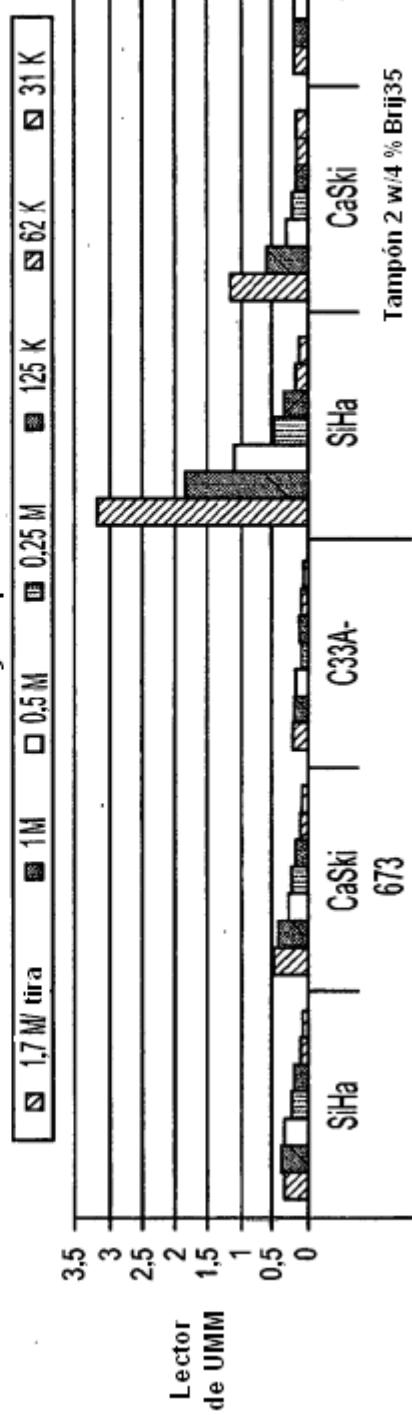
Efecto de Aditivos, antes de neutralización, sobre 520 pg de MBP E6 en LF, dups

**FIG. 1A**Aditivos DESPUÉS de neutralización.
Promedio de dups, 520 pg de MBP.16 E6/tira**FIG. 1B**

Extracción con pH elevado (con tampón 2), de SiHa y células C33A,
1,7 M/ tira .Diversos aditivos antes de la neutralización

**FIG. 2**

Curvas de valoración en ensayo de Flujo Lateral. Comparación de diversas líneas celulares y tampón de extracción



Línea celular y reactivo de extracción
FIG. 3

Muestras clínicas negativas en el ensayo de LF, con y sin adición de SiHa.
Reactivos de extracción 673 y B2 Brij35

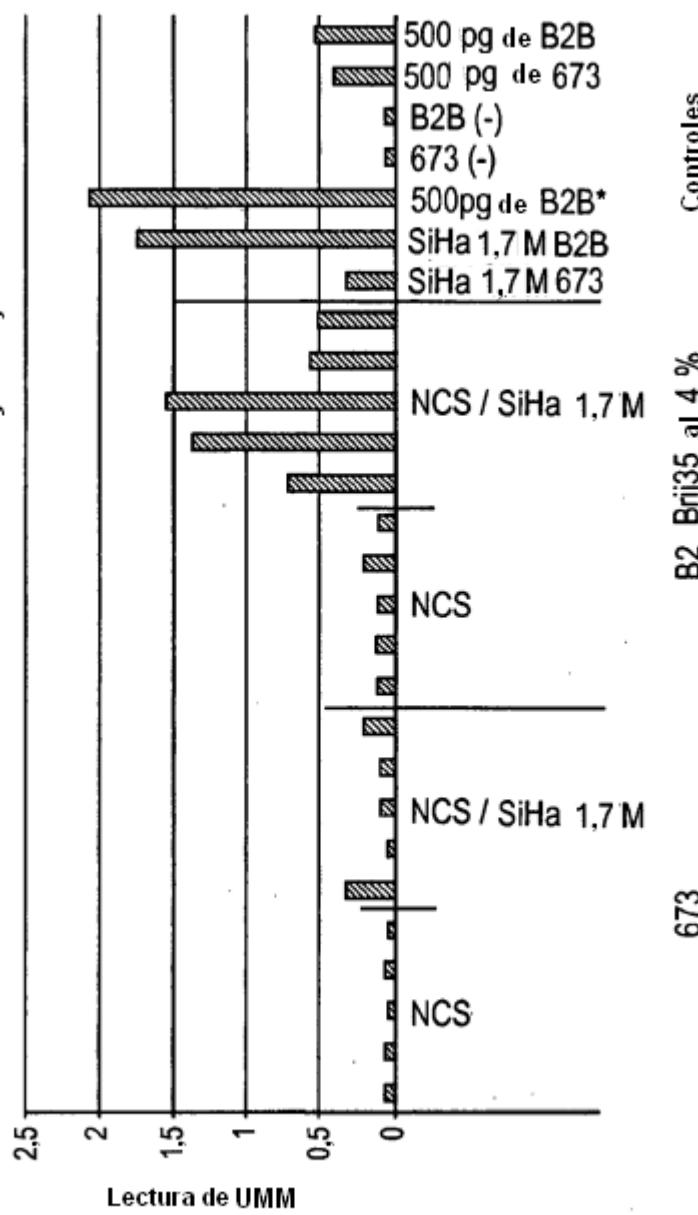
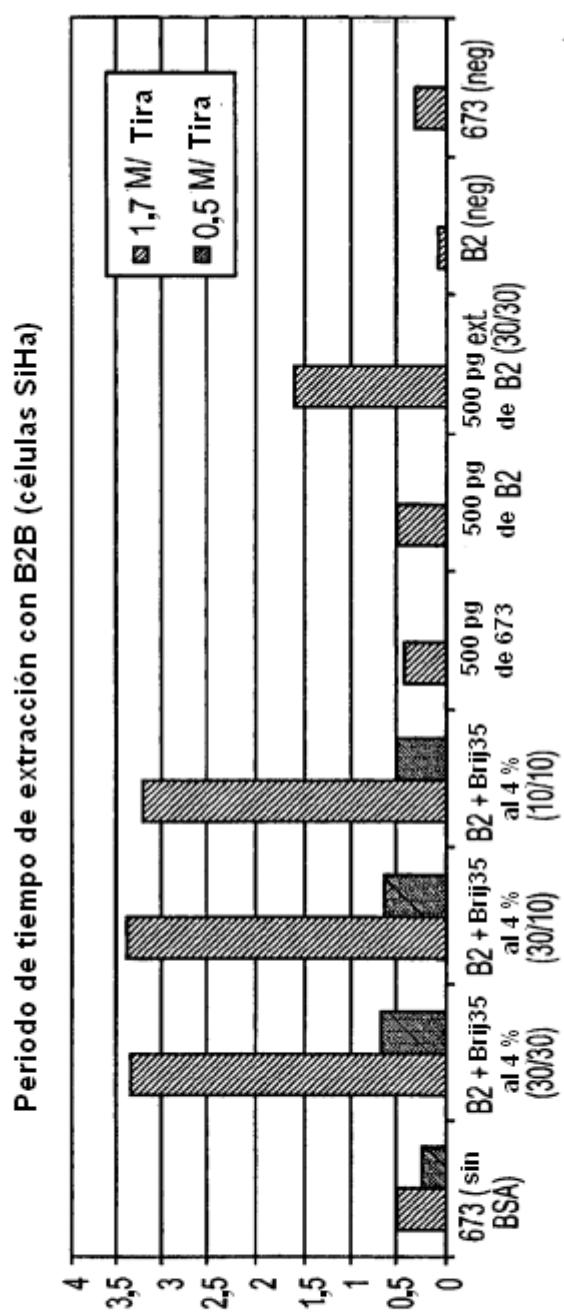


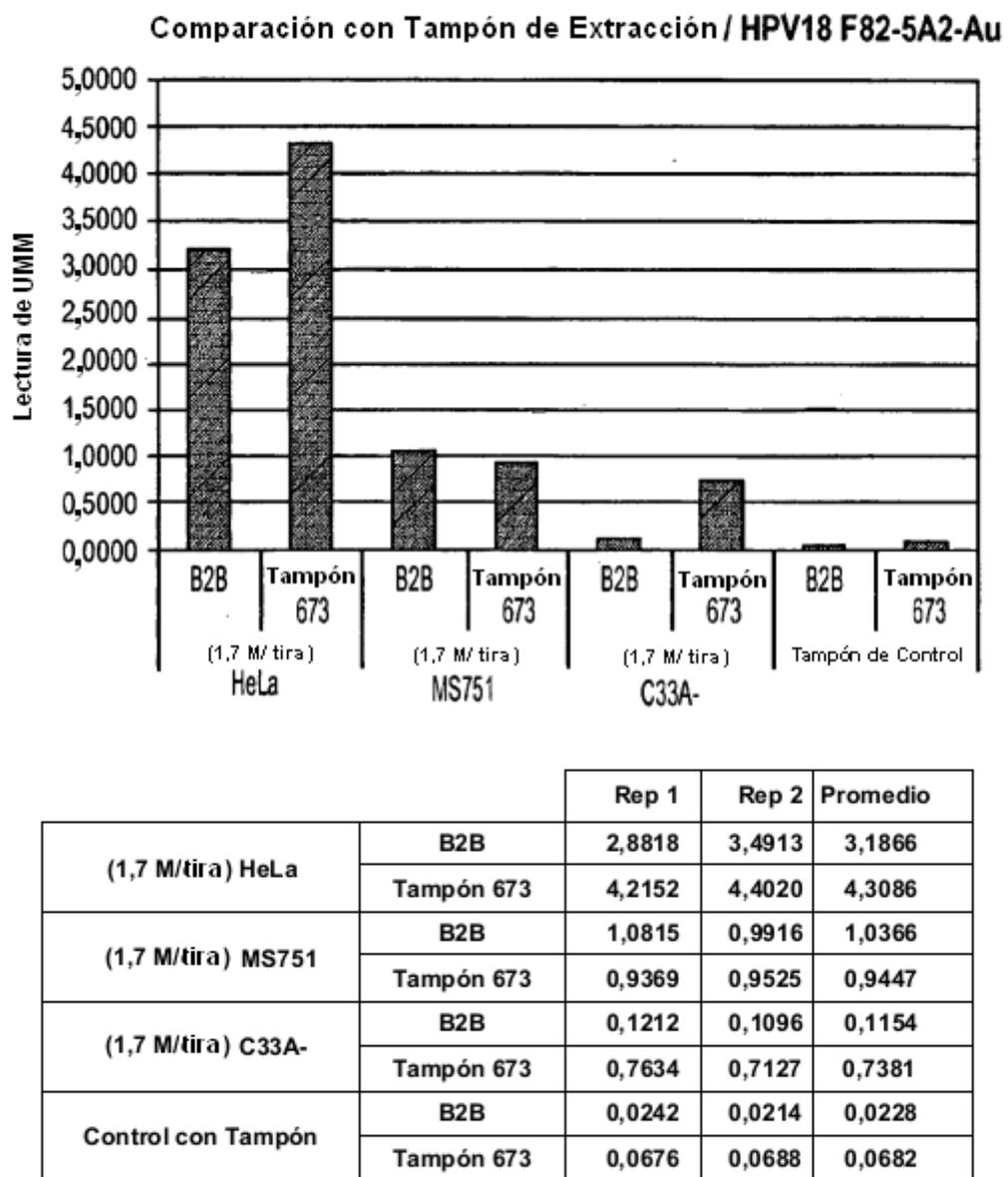
FIG. 4

Ensayo de Flujo Lateral, variaciones en el Tampón 2 con
el sistema de tampón de extracción Brij35

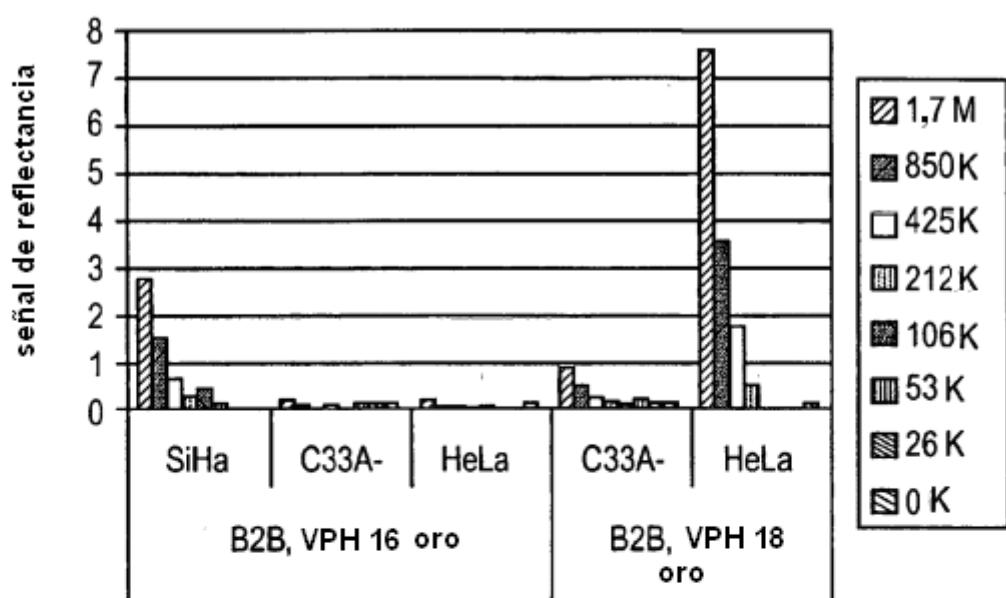


FIG. 5

FIG. 6

**FIG. 7**

Flujo Lateral, extracción con B2B



| | B2B, VPH 16 oro | | | B2B, VPH 18 oro | |
|-------|-----------------|--------|---------|-----------------|---------|
| | SiHa | C33A- | HeLa | C33A- | HeLa |
| 1,7 M | 2,7635 | 0,1758 | 0,1603 | 0,8636 | 7,5196 |
| 850 K | 1,4815 | 0,0777 | 0,0371 | 0,4619 | 3,4994 |
| 425 K | 0,6864 | 0,0563 | 0,0535 | 0,2534 | 1,6621 |
| 212 K | 0,3145 | 0,09 | 0,0316 | 0,1708 | 0,05117 |
| 106 K | 0,4132 | 0,0125 | 0,0319 | 0,0892 | |
| 53 K | 0,1072 | 0,0262 | 0,0164 | 0,1804 | |
| 26 K | 0,0662 | 0,0498 | 0,0234 | 0,1006 | |
| 0 K | 0,03316 | 0,0332 | 0,03316 | 0,10485 | 0,10485 |

FIG. 8

Optimización de tampón 2 con tampón Brij35 usando células SiHa
o C33A 1,7 M/l tira

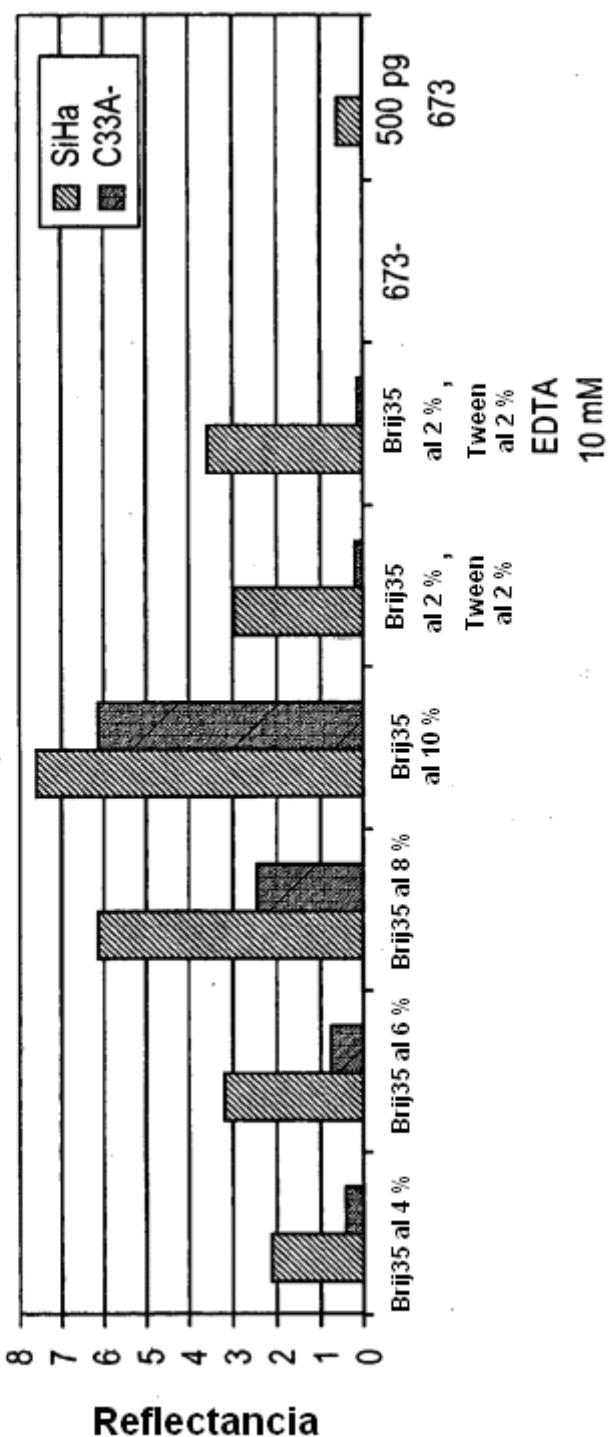
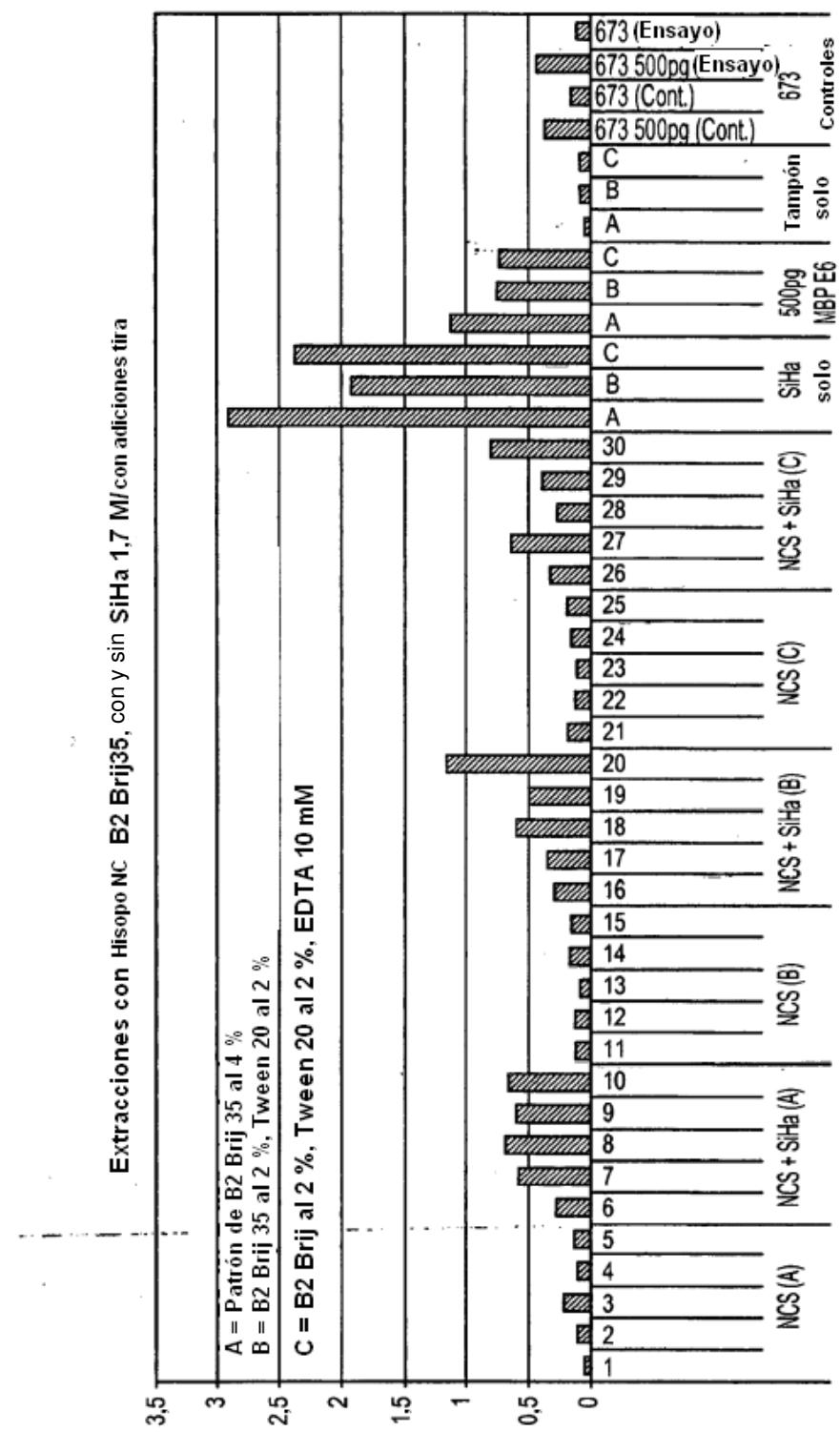


FIG. 9

**FIG. 10**

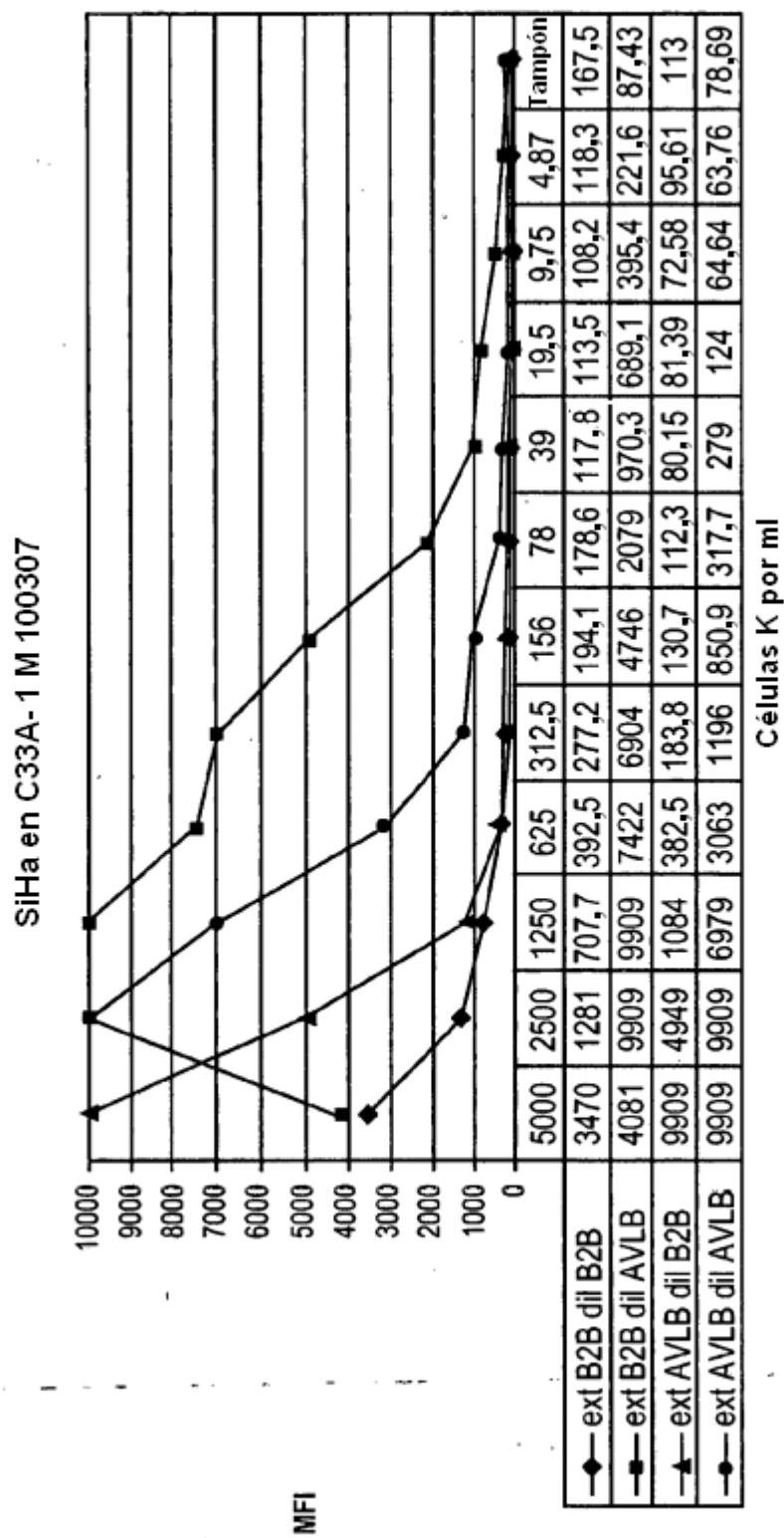
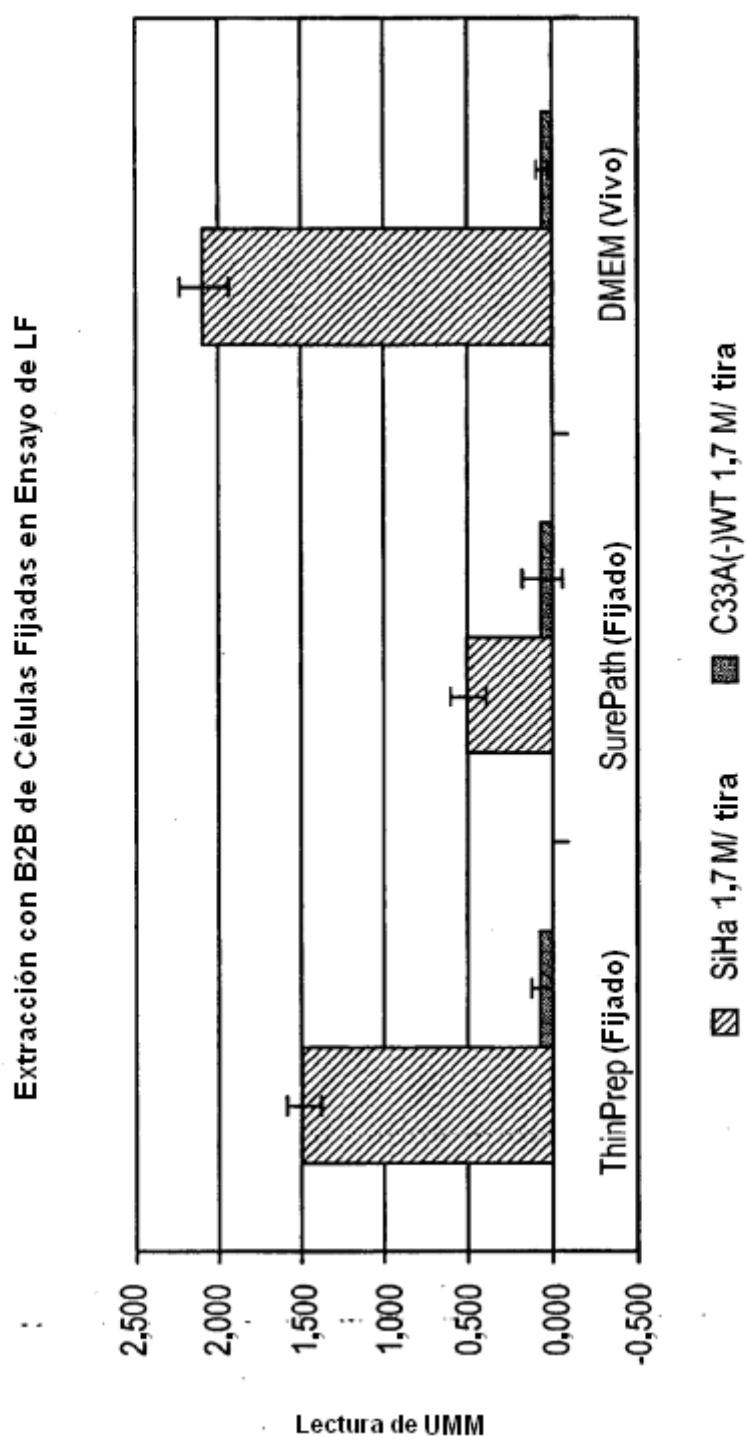


FIG. 11

**FIG. 12**

Evaluación de Filtro de Muestra - Lectura Visual

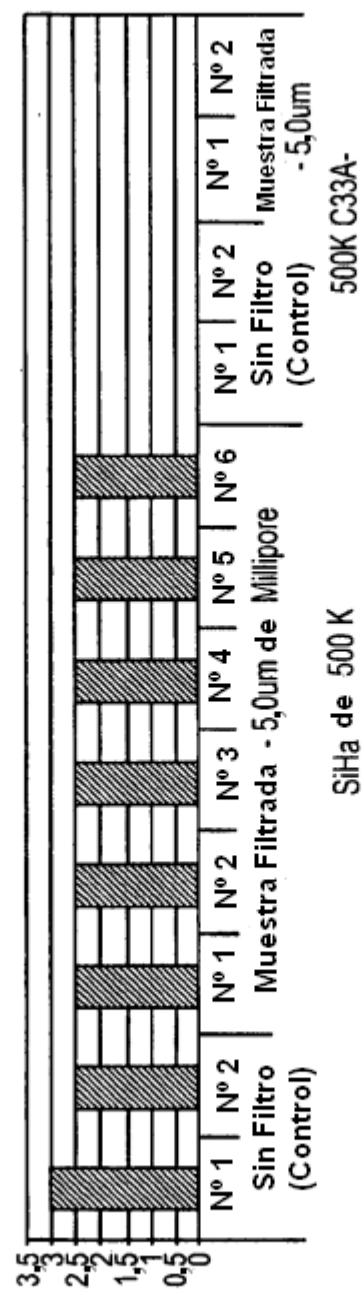


FIG. 13