

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 040**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07797439 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2024520**

54 Título: **Método de extracción de proteínas a partir de células**

30 Prioridad:

11.05.2006 US 747076 P

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

22.05.2014

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (50.0%)

1 Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417, US y

ARBOR VITA CORPORATION (50.0%)

72 Inventor/es:

LOVELL, STEPHEN;

BLANK, LYDIA;

CREWS, VIRGINIA;

HASSE, NANCY;

LU, PETER y

SCHWEIZER, JOHANNES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 462 040 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 de proteínas a partir de células

5 Referencia cruzada

Esta solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud Provisional de EE.UU. U.S. Nº 60/747.076, presentada el 11 de mayo de 2006.

10 Antecedentes de la invención

En muchos métodos diagnósticos 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 son examinadas citológicamente con objeto de proporcionar un diagnóstico. Por ejemplo, la detección de células precancerosas o cancerosas en tejido cervicouterino se realiza rutinariamente mediante una valoración microscópica de células cervicouterinas exfoliadas. Este método, desarrollado por George N. Papanicolaou y conocido como la prueba de "Pap", implica la exfoliación de células cervicouterinas de una mujer mediante el uso de un dispositivo de muestreo, depositar las células exfoliadas en un medio de transporte que contiene un fijador y depositar después las células en un portaobjetos. Entonces las células se tiñen y son examinadas mediante microscopía óptica, para que un profesional médico experimentado busque anomalías celulares. Cada año se realizan más de 55 millones de pruebas de Pap sólo en los Estados Unidos.

A pesar del éxito de dichas pruebas citológicas, las pruebas tienden a errores. Por ejemplo, se ha estimado que hasta el 40 % de las pruebas convencionales de Pap están comprometidas por la presencia de contaminantes tales como mucus, células sanguíneas y células inflamatorias de ocultamiento. Estos contaminantes producen unos resultados falsos negativos, unos resultados falsos positivos 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).

En vista de lo anterior, hay una necesidad de métodos diagnósticos moleculares complementarios para el análisis de células que están presentes en un medio líquido que contiene un fijador. Dichos métodos no son, sin embargo, directos, ya que no siempre es posible realizar dichos métodos sobre células fijadas. Por ejemplo, ciertos fijadores (por ejemplo, los empleados como medio de transporte en sistemas de prueba THINPREP™ o SUREPATH™) pueden provocar que ciertas proteínas celulares precipiten o se agreguen, haciendo así que esas proteínas sean insolubles y difíciles o imposibles de detectar de forma fiable mediante el uso de un medio convencional, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) u otra prueba inmunológica.

El documento WO0057906 desvela el desensamblaje de las VLPs del VPH con un tampón que tiene un pH desde 7,0 hasta 10, preferiblemente un pH de 8,0 y puede comprender un éter de polioxietileno alquilo (pero preferiblemente comprende Polysorbate 80), tras lo cual el pH se reduce.

El documento EP0363110 desvela un método de extracción de antígenos del herpes, de clamidia y de gonococos mediante el uso de un elevado pH, a saber, un pH de al menos 10. Después de la extracción se añade un reactivo de neutralización.

Existe por tanto una gran necesidad de métodos y composiciones para la extracción de proteínas a partir de células fijadas de una forma que les permita ser adecuadas para su uso en ensayos moleculares, por ejemplo, de detección inmunológica. La invención descrita en este documento satisface esta necesidad y otras.

50 Literatura

La literatura de interés incluye: las Patentes de EE.UU. 6.890.729, 6.337.189 y la solicitud de patente publicada de EE.UU. 20050032105.

55 Sumario de la invención

Se proporcionan métodos para la producción de un extracto proteico a partir de células fijadas. En términos generales, los métodos implican: aumentar el pH de las células a un pH mayor de pH 10,0 para producir una composición intermedia, y después, en presencia de un detergente no iónico, neutralizar el pH de la composición intermedia para producir el extracto proteico, en el que dicho extracto proteico tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0. El método puede incluir: a) poner en contacto las células con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización para neutralizar el pH de la composición intermedia y producir el extracto proteico, en el que dicho extracto proteico tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0. Uno o ambos de los reactivos de extracción, y el reactivo de neutralización, contienen el detergente no iónico. En ciertas formas de realización, las células fijadas pueden ser células cervicouterinas exfoliadas fijadas.

Definiciones

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Además, ciertos elementos se definen a continuación en aras de claridad y facilidad de referencia.

El término "muestra celular", según 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 química que contiene células extraídas de (por ejemplo, diseccionadas o exfoliadas de) un individuo, incluyendo pero no se limitan a, por ejemplo, células del plasma, del suero, del líquido cefalorraquídeo, del semen, del fluido linfático, de secciones externas de la piel, de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, tumores u órganos. En otras formas de realización, la muestra celular puede contener células crecidas *in vitro* (incluyendo, pero no se limitan a, células de un medio de cultivo celular, células infectadas por virus, células recombinantes, etc.). En ciertas formas de realización, la muestra celular puede contener células con el mayor riesgo de ser infectadas por el VPH. En estas formas de realización, las células pueden obtenerse a partir de un cuello uterino, de una vulva, de una vagina, de un ano, de un pene, de una boca o de una garganta. En ciertas formas de realización, las células son de membrana mucosa y pueden tener un origen epitelial. Una muestra celular puede contener o no contaminantes distintos a las células exfoliadas o diseccionadas. Por ejemplo, en una muestra celular puede haber presente mucus o células bacterianas, de levadura o sanguíneas.

"VPH" es el virus del papiloma humano, incluyendo, pero no se limita a, las cepas del VPH 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48, 50, 16, 18, 31, 35, 30, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 58, 33, 66, 68, 69, 26, 53, 73 y 82.

Una "cepa oncogénica del VPH" es una cepa del VPH conocida por provocar cáncer cervicouterino, según determina el National Cancer Institute (NCI, 2001).

Una "proteína oncogénica E6" es una proteína E6 codificada por una cepa oncogénica del VPH. Algunos ejemplos de cepas oncogénicas son: 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, VPH 69 y VPH 82. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas oncogénicas E6 están depositadas en la base de datos del GenBank del NCBI. Sin desear ceñirnos a ninguna teoría, generalmente se cree que las cepas del VPH 4, 11, 20, 24, 28, 36, 48 y 50 no son oncogénicas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable. El término "polipéptido" incluye polipéptidos en los que el esqueleto convencional se ha reemplazado por un esqueleto no natural o sintético, y péptidos en los que uno o más de los aminoácidos convencionales se han reemplazado por uno o más aminoácidos no naturales o sintéticos.

El término "proteína de fusión" o los equivalentes gramaticales del mismo, hacen referencia a una proteína formada por una pluralidad de componentes polipéptidicos, que mientras que no están unidos en su estado natural, están unidos por sus respectivos terminales amino y carboxilo a través de un enlace peptídico para formar un único 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, incluyendo, pero no se limitan a, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, fusiones con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin residuos N-terminales de metionina; proteínas marcadas inmunológicamente; proteínas de fusión con compañeros de fusión detectables, por ejemplo, proteínas de fusión que incluyen como compañero de fusión una proteína fluorescente, β -galactosidasa, luciferasa, y similares.

En general, los polipéptidos pueden tener cualquier longitud, por ejemplo, mayor de 2 aminoácidos, mayor de 4 aminoácidos, mayor de aproximadamente 10 aminoácidos, mayor de aproximadamente 20 aminoácidos, mayor de aproximadamente 50 aminoácidos, mayor de aproximadamente 100 aminoácidos, mayor de aproximadamente 300 aminoácidos, habitualmente hasta aproximadamente 500 ó 1.000 o más aminoácidos. Los "péptidos" son generalmente mayores de 2 aminoácidos, mayores de 4 aminoácidos, mayores de aproximadamente 10 aminoácidos, mayores de aproximadamente 20 aminoácidos, habitualmente de hasta aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas formas de realización, los péptidos tienen entre 5 y 30 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos pueden ser naturales porque pueden estar codificados por el genoma de un organismo o un virus, o no naturales porque no aparecen en la naturaleza.

El término "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 se una a, y concentre, la proteína desde una mezcla homogénea de proteínas diferentes. Consecuentemente, el término "agente de captura" se refiere a una molécula o a un complejo multimolecular que puede unirse específicamente a un analito, por ejemplo, unirse específicamente a un analito para el agente de captura, con una constante de disociación (K_D) de menos de aproximadamente 10^{-6} M sin unirse a otros objetivos. La interacción de la unión puede estar mediada por una región de afinidad del agente de captura. Algunos agentes de captura representativos incluyen anticuerpos (incluyendo fragmentos y miméticos de los mismos) y proteínas que contienen el dominio PDZ, etc.

El término "unión específica" se refiere a la capacidad del agente de captura de unirse preferentemente a una proteína en particular que está presente en una mezcla homogénea de proteínas diferentes. En ciertas formas de realización, una interacción de unión específica discriminará entre una proteína en particular y otras proteínas en una muestra, en algunas formas de realización desde más de aproximadamente 10 hasta 100 veces o más (por ejemplo, más de aproximadamente 1.000 ó 10.000 veces).

El término "complejo de agente de captura / proteína" es un complejo que es el resultado de la unión específica de un agente de captura con una proteína, es decir, un "par de compañeros de unión". Un agente de captura y una proteína para el agente de captura se unen específicamente entre sí en unas "condiciones adecuadas para la unión específica", donde dichas condiciones son aquellas condiciones (en términos de concentración salina, pH, detergente, concentración de proteína, temperatura, etc.) que permiten que se produzca la unión entre los agentes de captura y las proteínas que se van a unir en disolución. Dichas condiciones, particularmente con respecto a los 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 ciertas formas de realización, la afinidad entre un agente de captura y una proteína que están unidos específicamente en un complejo de agente de captura / proteína está caracterizada por una K_D (constante de disociación) de menos de 10^{-6} M, de menos de 10^{-7} M, de menos de 10^{-8} M, de menos de 10^{-9} M o de menos de aproximadamente 10^{-10} M.

"Compañeros de unión" y sus equivalentes se refiere a pares de moléculas que pueden unirse en un complejo de agente de captura / analito, es decir, mostrar una unión específica entre sí.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de forma intercambiable en este documento para referirse a un agente de captura que tiene al menos un epítipo de un dominio de unión de un anticuerpo. Estos términos son bien comprendidos por los de la técnica, y se refieren 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 anticuerpo, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de la cadena ligera y pesada son conjuntamente responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

Los polipéptidos de inmunoglobulina reconocidos incluyen las cadenas ligeras kappa y lambda y las cadenas pesadas alfa, gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, epsilon y mu, o sus equivalentes en otras especies. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulinas completas (de aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) comprenden una región variable de aproximadamente 110 aminoácidos en el NH₂ terminal y una región constante kappa o lambda en el COOH terminal. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulinas completas (de aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos), comprenden de forma similar una región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos) y una de las anteriormente mencionadas regiones constantes de la cadena pesada, por ejemplo, gamma (de aproximadamente 330 aminoácidos).

Los términos "anticuerpos" e "inmunoglobulina" incluyen anticuerpos o inmunoglobulinas de cualquier isotipo, fragmentos de anticuerpos que conservan la unión específica al antígeno, incluyendo, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fv, scFv y Fd, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única y proteínas de fusión que comprenden una porción de unión al antígeno de un anticuerpo y una proteína no anticuerpo. Los anticuerpos pueden marcarse para ser detectados, por ejemplo, con un radioisótopo, una enzima que genera un producto detectable, una proteína fluorescente, y similares. Los anticuerpos pueden estar adicionalmente conjugados con otras fracciones, tales como miembros de pares de unión específicos, por ejemplo, biotina (miembro del par de unión específico biotina-avidina), y similares. Los anticuerpos también pueden estar unidos sobre un soporte sólido, incluyendo, pero no se limitan a, placas o microesferas de poliestireno, y similares. También están englobados por los términos Fab', Fv, F(ab')₂ y u otros fragmentos de anticuerpos que conserven la unión específica a un antígeno.

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 y col., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85, 5879 - 5883 (1988) y Bird y col., Science, 242, 423 - 426 (1988), que se incorporan en este documento como referencia). (Véase, de forma general, Hood y col., "Immunology", Benjamin, N. Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature, 323, 15 - 16 (1986)). Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos de "expresión en fago" son bien conocidos en la técnica y están englobados por el término "anticuerpos".

El término "valorar" incluye cualquier forma de medición, e incluye la determinación de si un elemento está presente o no. Los términos "determinar", "medir", "evaluar", "valorar" y "ensayar" se usan de forma intercambiable y pueden incluir determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. La valoración puede ser relativa o absoluta. "La valoración de la presencia de" incluye la determinación de la cantidad de algo que hay presente, y/o la determinación de si está presente o ausente.

Por "ubicación remota" se entiende una ubicación distinta a la ubicación en la que las células se obtienen y se depositan en un líquido que contiene un fijador. Por ejemplo, una ubicación remota podría ser una habitación diferente del mismo edificio en el que se obtienen las células (por ejemplo, otro laboratorio), un edificio diferente del mismo complejo de edificios en el que se obtienen las células, o una ubicación diferente en la misma ciudad, estado o país, etc. Cuando se indica que una muestra celular se ha "recibido" desde una ubicación remota, la muestra celular puede obtenerse desde la ubicación remota o entregarse en mano o por correo electrónico o postal desde la ubicación remota, por ejemplo.

"Comunicar" información se refiere a cualquier medio de obtención de información desde una ubicación hasta la siguiente, tanto mediante material impreso transportado físicamente como mediante un medio de lectura informático que contiene la información (por ejemplo, mediante correo electrónico), o transmitiendo la información. Si se transmite la información, una señal digital o analógica que representa la información (por ejemplo, una señal electromagnética tal como una señal luminosa o eléctrica) es transmitida a través de un canal de comunicación adecuado (por ejemplo, una red privada, pública o inalámbrica). Puede emplearse cualquier medio conveniente para la transmisión de los datos, por ejemplo, fax, módem, internet, correo electrónico, etc.

Según se usa en este documento, el término "medio de transporte" se usa para describir un líquido adecuado para la recolección de células y la conservación de estas células de una forma que les permita ser adecuadas para estudios citológicos basados en líquidos. Habitualmente se emplean medios de transporte en la prueba de Pap. Las células depositadas en el medio de transporte pueden ser transportadas o no desde una ubicación a otra en ese medio. El medio de transporte contiene un fijador. La deposición de las células en un medio de transporte fija las células para producir células fijadas. Algunos medios de transporte representativos incluyen los medios de transporte SUREPATH™ o PRESERVCYT™.

Una "célula fijada" es una célula que ha sido tratada y preservada citológicamente mediante un fijador químico. Las células fijadas son habitualmente adecuadas para su tinción y su siguiente análisis morfológico y/o citológico mediante microscopía óptica.

Descripción detallada de la invención

Aunque en este documento se han mostrado y descrito las formas de realización preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que dichas formas de realización se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica les surgirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin desviarse de la invención. Debería entenderse que en la práctica de la invención pueden emplearse varias alternativas de las formas de realización de la invención descritas en este documento. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el ámbito de la invención, y que los métodos y las estructuras en el ámbito de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por las mismas.

Se proporcionan métodos para la producción de un extracto de proteínas a partir de células fijadas. En términos generales, los métodos implican: aumentar el pH de las células fijadas hasta un pH mayor de pH 10,0 para producir una composición intermedia, y después, en presencia de un detergente no iónico, neutralizar el pH de la composición intermedia para producir el extracto de proteínas, en el que el extracto de proteínas tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0. El método puede incluir: a) poner en contacto las células fijadas con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización para neutralizar el pH de la composición intermedia y producir el extracto de proteínas, en el que el extracto de proteínas tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0. Uno o ambos de los reactivos de extracción y el reactivo de neutralización contienen el detergente no iónico. En ciertas formas de realización, las células fijadas pueden ser células cervicouterinas exfoliadas fijadas. También se proporcionan kits para la práctica de los métodos en cuestión. Los métodos en cuestión hallan uso en varias aplicaciones distintas, incluyendo pruebas diagnósticas que detectan proteínas en particular en el extracto de proteínas resultante.

Antes de describir adicionalmente a la invención en cuestión, debe entenderse que la invención no está limitada a las formas de realización particulares de la invención descritas a continuación, ya que pueden realizarse variaciones de las formas de realización en particular y estar todavía en el ámbito de las reivindicaciones anexas. También debe entenderse que la terminología empleada es con el propósito de describir formas de realización particulares, y no pretende ser limitante. Más bien, el ámbito de la presente invención será establecido por las reivindicaciones anexas.

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor interviniente, hasta el décimo de la unidad del límite inferior, salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido con el interviniente en ese intervalo establecido, está englobado en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden estar independientemente incluidos en los intervalos menores, y también están englobados en la invención, sometidos a cualquier límite excluido

específicamente en el intervalo establecido. Cuando el límite establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

5 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse muchos métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o la prueba de la invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

10 Como se ha resumido anteriormente, la invención en cuestión proporciona métodos para la producción de un extracto de proteínas a partir de células fijadas. En la descripción de la invención con mayor detalle, en primer lugar se describen los métodos, seguido de una descripción de los kits para su uso en la práctica de los métodos en cuestión.

15 **Métodos de extracción de proteínas**

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un procedimiento para la producción de un extracto de proteínas a partir de células fijadas. En general, los métodos implican dos etapas: a) poner en contacto las células fijadas con un reactivo de extracción con un pH que es mayor de pH 10,0 para producir una composición intermedia con un pH mayor de 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 contienen un detergente no iónico. El extracto de proteínas resultante contiene un detergente no iónico 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 son fácilmente detectables mediante el uso de agentes de captura para esas proteínas. Como tales, un extracto de proteínas producido por los métodos actuales es generalmente adecuado para su uso en ensayos de unión, por ejemplo, en ensayos inmunológicos, para la detección de esas proteínas.

En ciertas formas de realización, los métodos pueden incluir: aumentar el pH de las células fijadas hasta un pH mayor de pH 10,0 para producir una composición intermedia, y después, en presencia del detergente no iónico, neutralizar el pH de la composición intermedia para producir el extracto de proteínas, en el que el extracto de proteínas tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0. Por lo tanto, como se ha mencionado anteriormente, el detergente no iónico puede estar presente en el reactivo de extracción o en el reactivo de neutralización (o tanto en el reactivo de extracción como en el reactivo de neutralización), ciertas formas de realización de los métodos actuales incluyen: a) poner en contacto las células fijadas con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización que comprende un detergente no iónico; neutralizar dicho pH de la composición intermedia y producir el extracto de proteínas, en el que el extracto de proteínas tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0. En otras formas de realización, el método puede incluir: a) poner en contacto las células fijadas con un reactivo de extracción que comprende un detergente no iónico para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y b) poner en contacto la composición intermedia con un reactivo de neutralización; neutralizar el pH de la composición intermedia y producir el extracto de proteínas, en el que el extracto de proteínas tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0.

En ciertas formas de realización, el extracto de proteínas producido por los métodos actuales puede contener más proteínas accesibles a los agentes de captura que un extracto de proteínas elaborado mediante el uso de otros métodos, por ejemplo, métodos que no emplean: una etapa de extracción con un pH elevado (es decir, una etapa que aumenta el pH hasta más de aproximadamente pH 10,0 o hasta pH 11,0), una etapa de neutralización (es decir, una etapa de ajuste del pH desde aproximadamente pH 7,0 hasta aproximadamente pH 8,0) y un detergente no iónico. Ni el elevado pH solo ni el detergente no iónico solo producen dicho extracto de proteínas. En algunas formas de realización en particular, el reactivo de extracción a pH elevado solubiliza las proteínas de las células fijadas, mientras que el detergente no iónico evita que las proteínas solubilizadas en la composición intermedia se agreguen de nuevo o precipiten según se neutraliza el pH de la composición intermedia.

Los reactivos empleados en los actuales métodos y el extracto de proteínas producido mediante los actuales métodos se describen con mayor detalle a continuación, lo que es una descripción de cómo pueden usarse los reactivos para producir el extracto de proteínas. Como se analizará a continuación, la concentración y el pH óptimos de los reactivos usados en los actuales métodos pueden 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.

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

La metodología de acuerdo con la presente invención puede usarse para extraer una proteína objetivo o proteína de interés a partir de una muestra de células. La muestra de células puede ser una población homogénea de células o una mezcla heterogénea de células de diferentes tipos. La muestra de células también puede contener "contaminantes" tales como mucus, células sanguíneas y células inflamatorias que no son de interés para el propósito de extracción de la proteína objetivo, o no contiene la proteína objetivo.

En algunas formas de realización, la proteína objetivo es una proteína vírica presente en células infectadas por un virus, preferiblemente un virus patológico, y las células serán preferiblemente aquellas aisladas a partir de un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

5 El virus patógeno puede ser cualquier virus patógeno que provoque efectos patógenos o una enfermedad en un ser humano o en otros animales. El virus patógeno puede ser varias cepas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tales como el VIH-1 y el VIH-2. La proteína vírica puede ser una glucoproteína del VIH (o antígeno de superficie) tal como la GP120 y la GP41 del VIH, o una proteína de la cápside (o proteína estructural) tal como la proteína P24 del VIH.

10 El virus patógeno puede ser el virus Ébola o Marburg. La proteína vírica puede ser una glucoproteína del Ébola o un antígeno de superficie tal como la proteína GP 1 o del GP2 del Ébola.

15 El virus patógeno puede ser el virus hepatitis, tal como el virus de las hepatitis A, B, C, D ó E. Por ejemplo, la proteína vírica puede ser un antígeno de superficie o una proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, tal como el antígeno de superficie pequeño de la hepatitis B (SHBsAg) (también denominado antígeno Australia), el antígeno de superficie intermedio de la hepatitis B (MHBsAg) y el antígeno de superficie grande de la hepatitis B (LHBsAg). El antígeno vírico puede ser un antígeno de superficie o una proteína del núcleo del virus de la hepatitis C, tal como los antígenos NS3, NS4 y NS5.

20 El virus patógeno puede ser un virus respiratorio sincitial (VRS). Por ejemplo, la proteína vírica del VRS puede ser la glucoproteína (proteína G) o la proteína de fusión (proteína F) del VRS.

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

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

35 Las células usadas en la invención son células fijadas en las que está presente la proteína objetivo. Las células fijadas empleadas en los actuales métodos se obtienen generalmente mediante la deposición de una muestra de células (obtenida mediante la extracción de células a partir de un sujeto mediante disección, exfoliación o lavado, por ejemplo) en un medio líquido. La muestra de células se deposita en un medio líquido que ya contiene un fijador químico, o puede añadirse un fijador químico al medio líquido después de que las células hayan sido introducidas en el medio. Un medio líquido que contiene un fijador y células fijadas se denomina en este documento "muestra celular".

40 Algunos fijadores químicos representativos que pueden emplearse en los actuales 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. Algunos ejemplos adicionales de fijadores que pueden emplearse en los actuales métodos incluyen fijadores basados en bisulfito (que también pueden incluir ácido acético), fijadores basados en PVP (que también pueden contener propilenglicol y metanol), así como los descritos en las Patentes de EE.UU. N° 3.546.334, 4.578.282, 4.857.300, 5.104.640, 5.256.571, 5.432.056 y 5.196.182. Algunos ejemplos de fijadores que pueden emplearse en los actuales métodos, incluyendo las concentraciones de trabajo de esos fijadores, pueden encontrarse en Baker, (Principles of Biological Microtechnique: A Study of Fixation and Dyeing, 1959) y en Williams ("Tissue preparation for immunocytochemistry." J Clin. Pathol. 1997 50: 422).

50 De particular interés en los actuales métodos son los medios líquidos que se denominan "medios de transporte" y se usan rutinariamente para la recolección, la conservación (es decir, la fijación) y el transporte de las células cervicovaginales (por ejemplo, células cervicouterinas exfoliadas) como parte del examen ginecológico. Son de particular interés los medios de transporte aprobados por la FDA.

55 Algunos ejemplos de medios de transporte disponibles comercialmente que pueden emplearse incluyen: el medio de transporte basado en metanol PRE-SERVCYT™ (que se vende como parte del kit de toma de muestras ginecológicas THINPREP™ de Cytoc, Inc., Marlborough, Mass.), el medio de transporte basado en etanol SUREPATH™ conocido formalmente como CYTORICH™ (TriPath, Inc. Burlington, N.C.), y el medio de transporte basado en metanol CYTOLYT™ (Cytoc, Inc., Marlborough, Mass.), por ejemplo.

60 Las células pueden obtenerse mediante cualquier método conveniente, incluyendo, pero no se limitan a, exfoliación (por ejemplo, raspado), disección y lavado. De particular interés son las células epiteliales de origen cervicouterino, células que normalmente se obtienen mediante métodos exfoliantes usando un cepillo, una espátula o un raspador adaptado, y depositadas en un medio líquido que contiene un fijador.

Reactivo de extracción

El reactivo de extracción empleado en los actuales métodos contiene componentes que están presentes en unas cantidades suficientes en concentración para producir un extracto de proteínas con un pH que es mayor de pH 10,0, tras la adición del reactivo de extracción a las células fijadas. Consecuentemente, el reactivo de extracción generalmente tiene un pH de más de pH 10,0.

El reactivo de extracción se pone en contacto con las células fijadas 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 desde pH 10,0 hasta aproximadamente pH 13,0 o desde aproximadamente pH 11,0 hasta aproximadamente pH 12,0. En ciertas formas de realización, el reactivo de extracción puede tener un pH de más de pH 10,0 hasta aproximadamente pH 10,5, desde pH 10,5 hasta aproximadamente pH 11,0, desde pH 11,0 hasta aproximadamente pH 11,5, desde pH 11,5 hasta aproximadamente pH 12,0, desde pH 12,0 hasta aproximadamente pH 12,5 o desde pH 12,5 hasta aproximadamente pH 13,0. El reactivo de extracción puede elaborarse mediante el uso de cualquier fuente adecuada de iones hidróxido, por ejemplo, hidróxido de sodio o de potasio o carbonato de calcio, por ejemplo.

En ciertas formas de realización, el reactivo de extracción puede no contener cantidades significativas de desnaturizantes. Sin embargo, en otras formas de realización, además de tener un pH mayor de 10,0, el reactivo de extracción también puede contener un desnaturizante, por ejemplo, un detergente iónico tal como dodecil sulfato de sodio (SDS) o sarcosilo, o un agente caotrópico tal como urea. En estas formas de realización, el desnaturizante, si estuviera presente, puede estar presente a una concentración que no disminuya significativamente la sensibilidad de futuros ensayos. La concentración del desnaturizante, en ciertas formas de realización, puede disminuirse durante el procesado de las muestras, por ejemplo, diluyendo el desnaturizante mediante el uso de un tampón de neutralización o mediante la adición de un diluyente, por ejemplo, un tampón o agua, al extracto de proteínas, antes de su uso.

Dependiendo de la fuerza del desnaturizante usado y del pH del tampón de extracción, el desnaturizante puede estar presente en el tampón de extracción a una concentración de desde aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 0,05 M, desde aproximadamente 0,05 M hasta aproximadamente 0,1 M, desde 0,1 M hasta aproximadamente 0,2 M, desde aproximadamente 0,2 M hasta aproximadamente 0,5 M, desde aproximadamente 0,5 M hasta aproximadamente 1,0 M, desde aproximadamente 1,0 M hasta aproximadamente 2,0 M, desde aproximadamente 2,0 M hasta aproximadamente 4,0 M, o desde aproximadamente 4,0 M hasta aproximadamente 8,0 M. El desnaturizante, si está presente en el reactivo de extracción, puede estar presente a una concentración que está muy por debajo de la concentración de desnaturizante empleada normalmente para desnaturizar una proteína. En otras palabras, el reactivo de extracción puede contener desnaturizante a una concentración que permita la detección de una proteína mediante el uso de un agente de captura para esa proteína, después de producir un extracto de proteínas de acuerdo con los métodos en cuestión. La concentración de desnaturizante empleada es generalmente suficiente para producir un extracto de proteínas que contiene proteínas que son fácilmente detectables en un ensayo de unión que emplea un agente de captura, por ejemplo, en un ensayo de detección de anticuerpos.

Algunos ejemplos de desnaturizantes y sus concentraciones en un reactivo de extracción en cuestión: dodecil sulfato de sodio (SDS): desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 2 %, por ejemplo, el 0,05 %, sarcosilo: desde aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 5 %, por ejemplo, el 0,5 %, guanidina: desde aproximadamente 0,1 M hasta aproximadamente 6 M, por ejemplo, aproximadamente 0,5 M y urea: desde aproximadamente 0,1 M hasta aproximadamente 8 M, por ejemplo, aproximadamente 0,5 M, en peso/vol.

El SDS se emplea normalmente para desnaturizar proteínas a una concentración del 0,1 % al 0,5 %, el sarcosilo se emplea normalmente para desnaturizar proteínas a una concentración del 2 % p/v, la urea se emplea normalmente para desnaturizar proteínas a una concentración de 2 M a 8 M, el clorhidrato de guanidina se emplea normalmente para desnaturizar proteínas a una concentración de 3 M a 8 M, el cloruro de N-cetil trimetilamonio se emplea normalmente para desnaturizar proteínas a una concentración del 5 % en p/v, y el N-octilglucósido se emplea normalmente para desnaturizar proteínas a una concentración del 2 % en p/v (véase Protein purification Handbook, Amersham Pharmacia Biotech, pág. 71 (1999)).

Si no hay presente desnaturizante en un reactivo de extracción, el reactivo puede tener un pH de al menos aproximadamente pH 11,0. Si el reactivo de extracción contiene detergente, entonces el pH del reactivo de extracción puede tener un pH de al menos aproximadamente pH 10,0.

Como se describirá con mayor detalle a continuación, el reactivo de extracción también puede contener, en ciertas formas de realización, un detergente no iónico.

En ciertas formas de realización, el reactivo de extracción puede contener un tampón para mantener el reactivo a un pH deseado. Si hay presente un tampón en un reactivo de extracción en cuestión, el tampón puede tener un pK_a en el intervalo de desde aproximadamente 9,0 hasta aproximadamente 12,5 a 25 °C. Algunos ejemplos de tampones que pueden emplearse en un reactivo de extracción de proteínas en cuestión incluyen CABS, piperidina, fosfato,

CAPS, glicina o etanolamina, por ejemplo. Los tampones que tienen poca o ninguna capacidad tamponante a un pH por encima de aproximadamente pH 10,0 (por ejemplo, tris, tricina, hepes, etc.) generalmente no son empleados para tamponar el pH del reactivo de extracción, pero no obstante pueden estar presentes en un reactivo de extracción.

5 El reactivo de extracción de proteínas en cuestión puede contener otros componentes, por ejemplo, quelantes de iones salinos, inhibidores de proteasas, etc., además de los componentes mencionados anteriormente.

10 El reactivo de extracción de proteínas puede ser una composición líquida o sólida, y, en ciertas formas de realización, contener una combinación de diferentes desnaturalizantes.

15 Los desnaturalizantes que pueden emplearse en el actual tampón de extracción son generalmente 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 de sodio o tiocianato de guanidinio, yoduro de sodio, perclorato de sodio y similares; véase K. Hamaguchi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 62: 1129 - 1136, 1962) y detergentes iónicos (por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), sarcosilo o cloruro de N-cetil trimetilamonio), incluyendo detergentes catiónicos, aniónicos y bipolares (tales como CHAPS o CHAPSO).

20 Algunos desnaturalizantes adicionales que pueden emplearse en los actuales métodos están detallados en las columnas 7 y 8 de la Patente de EE.UU. 6.488.671, patente que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

25 En ciertas formas de realización, no se emplea un desnaturalizante débil tal como LiCl, LiClO₄, LiBr, CaCl₂ o NaCl como desnaturalizante en el tampón de extracción, aunque dicho compuesto puede estar presente en un tampón de extracción o en el extracto de proteínas, además de uno de los desnaturalizantes detallados en el párrafo previo.

30 Como se ha mencionado anteriormente, el reactivo de extracción se pone en contacto (por ejemplo, se combina o se mezcla) con células fijadas. En ciertas formas de realización, puede añadirse directamente una muestra celular que contiene las células fijadas (por ejemplo, un medio de transporte que contiene células fijadas) a un reactivo de extracción. En otras formas de realización, las células fijadas pueden aislarse a partir de la muestra celular (por ejemplo, mediante sedimentación, centrifugación, filtración o métodos por afinidad) antes de su adición al reactivo de extracción de proteínas. Las células pueden lavarse o ponerse en contacto con otros reactivos antes de su adición al reactivo de extracción.

35 Pueden combinarse todas o una porción de las células fijadas disponibles con el reactivo de extracción. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, puede emplearse una porción de las células fijadas en una prueba citológica y una porción de las células fijadas puede ponerse en contacto con un reactivo de extracción para producir la composición intermedia. Las células fijadas y el reactivo de extracción pueden combinarse y mantenerse a una temperatura adecuada (por ejemplo, en hielo, a aproximadamente la temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C) y durante un tiempo adecuado (por ejemplo, entre 10 segundos y 24 h) para producir la composición intermedia. En ciertas formas de realización, el agente neutralizante se pone en contacto con la composición intermedia inmediatamente después de que las células fijadas se hayan puesto en contacto con el reactivo de extracción.

Reactivo de neutralización

45 El reactivo de neutralización empleado en los actuales métodos tiene un pH que es suficiente para neutralizar el pH de la composición intermedia analizada anteriormente, tras el contacto con la composición intermedia. En otras palabras, el reactivo de neutralización contiene un detergente no iónico y tiene un pH que es suficiente para neutralizar el pH de la composición intermedia analizada anteriormente cuando el agente neutralizante se mezcla con la composición intermedia. Como se describirá con mayor detalle a continuación, el reactivo de neutralización puede contener, en ciertas formas de realización, un detergente no iónico.

55 El pH del reactivo de neutralización es suficiente para neutralizar la composición intermedia elaborada poniendo en contacto las células fijadas con un reactivo de extracción en cuestión. Dependiendo del pH del reactivo de extracción y de si se emplean tampones, el pH del reactivo de neutralización puede estar entre pH 4,0 y pH 8,0. En ciertas formas de realización, el reactivo de neutralización puede tener un pH de desde aproximadamente pH 4,0 hasta aproximadamente pH 4,5, desde pH 4,5 hasta aproximadamente pH 5,0, desde pH 5,0 hasta aproximadamente pH 5,5, desde pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,0, desde pH 6,0 hasta aproximadamente pH 6,5, desde pH 6,5 hasta aproximadamente pH 7,0 o desde pH 7,0 hasta aproximadamente pH 7,5. El reactivo de neutralización puede elaborarse mediante el uso de cualquier fuente adecuada de iones hidrógeno, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido acético, por ejemplo. En ciertas formas de realización, el reactivo de neutralización puede tener un pH de menos de pH 4,0.

65 El reactivo de neutralización puede estar tamponado o no. Si el reactivo de neutralización está tamponado, entonces el reactivo de neutralización puede estar tamponado mediante el uso de cualquier tampón con un pK_a de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8, por ejemplo, tris, hepes o tricina, por ejemplo.

Como se ha mencionado anteriormente, el reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización pueden contener

un detergente no iónico.

En ciertas formas de realización, el detergente no iónico empleado puede ser un detergente nonidet P-40, n-octilglucósido, un detergente TRITON™ tal como TRITON™ X-100, octil β-tioglucopiranosido, 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 por el tampón de neutralización a una concentración de desde aproximadamente 0,01 M hasta aproximadamente 0,05 M, desde aproximadamente 0,05 M hasta aproximadamente 0,1 M, desde 0,1 M hasta aproximadamente 0,2 M, desde aproximadamente 0,2 M hasta aproximadamente 0,5 M, desde aproximadamente 0,5 M hasta aproximadamente 1,0 M, desde aproximadamente 1,0 M hasta aproximadamente 2,0 M, desde aproximadamente 2,0 M hasta aproximadamente 4,0 M, o desde aproximadamente 4,0 M hasta aproximadamente 8,0 M. Algunos detergentes adicionales que pueden emplearse en los métodos actuales están detallados en las columnas 7 y 8 de la Patente de EE.UU. 6.488.671, patente que se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. En ciertas formas de realización, el detergente puede estar presente tanto en el tampón de extracción como en el tampón de neutralización.

Algunos ejemplos de detergentes y sus concentraciones en un reactivo de neutralización y/o de extracción en cuestión incluyen: Triton X-100: desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 10 %, por ejemplo, aproximadamente el 1 %, NP40: desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 10 %, por ejemplo, aproximadamente el 1 % y Tween-20: desde aproximadamente el 0,1 % hasta aproximadamente el 10 %, por ejemplo, aproximadamente el 1 %, en peso/vol.

Como se ha mencionado anteriormente, el reactivo de neutralización se pone en contacto (por ejemplo, se combina o se mezcla) con la composición intermedia para producir un extracto de proteínas con un pH neutro (es decir, un pH en el intervalo de pH 6,5 a pH 8,0, por ejemplo, en el intervalo de entre aproximadamente pH 7,0 y aproximadamente pH 7,8). El extracto de proteínas contiene adicionalmente proteínas de las células fijadas, un detergente no iónico a una concentración indicada anteriormente, y en ciertas formas de realización, un tampón para mantener el extracto de proteínas en un intervalo particular de pH. Si se añade un desnaturizante a las células fijadas, el extracto de proteínas puede contener adicionalmente ese desnaturizante. El pH, la elección del detergente y de la concentración del detergente empleado (y, si se emplea un desnaturizante, la identidad y la concentración del desnaturizante) son suficientes para permitir que el extracto de proteínas se emplee directamente en un ensayo de unión para detectar las proteínas presentes en el extracto de proteínas.

La neutralización del extracto celular también puede llevarse a cabo haciendo pasar el extracto a través de un filtro o una punta de filtro que esté impregnado con un reactivo de neutralización. Según pasa al extracto través del material del filtro, el reactivo de neutralización se solubiliza y el pH del extracto se aproxima a la neutralidad.

Un método alternativo para la neutralización del extracto celular es hacer pasar el extracto a través de una columna BioSpin (BioRad) preequilibrada con una disolución a pH neutro. El extracto también puede ponerse en una jeringa o un aparato similar que contenga un gel (o un material de filtración) que contiene el neutralizante y es administrado desde la jeringa mediante una presión positiva.

En ciertas formas de realización, el extracto de proteínas en cuestión contiene la proteína E6 del VPH (particularmente la proteína E6 de cepas oncogénicas del VPH), que es accesible y fácilmente detectable por un agente de captura sin un tratamiento adicional del extracto de proteínas (por ejemplo, sin una adición adicional de desnaturizante, cambios en el 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, carbohidratos, etc. También puede haber presentes otros contaminantes tales como los obtenidos a partir de una contaminación mucosal de la muestra celular original. Los componentes del extracto de proteínas generalmente no contienen células completas (es decir, citológicamente intactas).

El extracto de proteínas puede usarse inmediatamente o almacenarse, por ejemplo, en forma congelada, antes de su uso.

En algunas formas de realización en particular, los extractos de proteínas producidos mediante los métodos establecidos anteriormente pueden emplearse en métodos de detección de proteínas, métodos que se describen con mayor detalle a continuación.

Como sería apreciable a partir de lo anterior, puede emplearse varias concentraciones diferentes de desnaturizantes, detergentes, tampones, pHs y componentes en los reactivos descritos anteriormente. El desnaturizante, el detergente, el tampón o el pH óptimos, o la concentración de los componentes de cualquier reactivo, se determinan fácilmente mediante el uso de métodos rutinarios.

Después de la neutralización del extracto celular, la proteína E6 puede concentrarse desde el extracto celular mediante la incubación del extracto con partículas que contienen un ligante para la E6. El ligante puede comprender PDZ, la proteína asociada a la E6 (E6AP) o fragmentos de la misma, o la proteína de unión de la E6 (E6BP) o fragmentos de la misma. Después de que la E6 haya sido capturada por las partículas, las partículas se lavan y

después se libera la E6 de las partículas mediante una incubación con un tampón a un pH mayor de 10. Las partículas se separan de la disolución eluida, y la disolución remanente se neutraliza entonces mediante los procedimientos descritos previamente. Alternativamente, la proteína E6 puede ser detectada sin liberarla de las partículas de captura.

5

Métodos de detección de proteínas

El extracto de proteínas elaborado mediante los métodos analizados anteriormente puede emplearse directa o indirectamente (es decir, después de la adición de reactivos adicionales) en un método en el que se valora 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 que se van a detectar puede ser conocida (es decir, predeterminada) o desconocida en el momento de realizar el método.

10

Las proteínas que pueden ser detectadas mediante el uso de los métodos de detección de proteínas en cuestión incluyen proteínas que son marcadores diagnósticos de una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer, enfermedad inflamatoria o infección por virus, bacterias u hongos, por ejemplo. En ciertas formas de realización, una proteína detectada mediante el uso de los métodos en cuestión no es detectable rutinariamente salvo que se empleen los métodos de detección de proteínas en cuestión.

15

Algunos ejemplos de proteínas que pueden detectarse mediante el uso de los actuales métodos incluyen las proteínas que están codificadas por un agente infeccioso, tal como el virus del papiloma humano (VPH). En algunas formas de realización en particular, los actuales métodos pueden emplearse para detectar la proteína E6 del VPH, una proteína que ha demostrado ser difícil o imposible detectar mediante otros métodos en los extractos de proteínas elaborados a partir de células fijadas.

20

En términos generales, los métodos de detección de proteínas son muy conocidos 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 emplean un anticuerpo que se une específicamente a una proteína, incluyendo, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos mediante el uso de técnicas tales como inmunotransferencias western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A, por nombrar unos pocos. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora como referencia en este documento en su totalidad). Algunos ejemplos de inmunoensayos se describen brevemente a continuación.

30

35

Los protocolos de inmunoprecipitación implican generalmente la producción de un extracto de proteínas, la adición de un agente de captura, por ejemplo, un anticuerpo, al extracto de proteínas, y la incubación del extracto de proteínas y del agente de captura durante un periodo de tiempo y a una temperatura adecuados. El agente de captura se une entonces sobre un soporte sólido, por ejemplo, un sustrato de afinidad tal como microesferas unidas a la proteína A y/o la proteína G, y la mezcla se incuba y se lava. El soporte sólido se resuspende en tampón de muestra y la proteína de interés puede detectarse mediante una inmunotransferencia western, por ejemplo.

40

45

Los ELISA pueden implicar la preparación de un extracto de proteínas, la unión del extracto de proteínas sobre un soporte sólido (por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación multipocillos), 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 ciertos métodos de ELISA, el agente de captura puede marcarse detectablemente con una fracción detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) antes de poner en contacto el agente de captura con el extracto de proteínas unido al soporte. En otras formas de realización, sin embargo, la unión del agente de captura al extracto de proteínas puede ser detectada mediante un segundo agente de captura detectable (por ejemplo, un segundo anticuerpo) que se une al agente de captura en contacto con el extracto de proteínas.

50

55

En otros ensayos de ELISA, el agente de captura puede estar unido sobre 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 del extracto de proteínas al anticuerpo del soporte sólido puede detectarse mediante el uso de un segundo agente de captura para la proteína. Dichos "ensayos en sándwich" son bien conocidos en la técnica.

60

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

65

En particular, los actuales métodos pueden emplearse para detectar la proteína E6 de cepas oncogénicas del VPH. En estas formas de realización, el agente de captura empleado en los métodos de detección 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 actual método de unión para la detección de la E6 puede emplear una proteína que contiene un dominio PDZ que contiene el segundo PDZ de MAGI-1, o el dominio PDZ de DLG o TIP1, etc, según se describe en la solicitud publicada de EE.UU. 20040018487 (publicada el 29 de enero de 2004) e incorporada en este documento como referencia en su totalidad. Algunos ejemplos de proteínas que contienen el dominio PDZ y de secuencias del dominio PDZ se muestran en la TABLA 2 y en el EJEMPLO 4 de la solicitud de EE.UU. 20040018487. El término "dominio PDZ" también incluye variantes (por ejemplo, variantes naturales) de las secuencias (por ejemplo, variantes polimorfas, variantes con sustituciones conservativas, y similares) y dominios de especies alternativas (por ejemplo, de ratón, de rata). Normalmente, los dominios PDZs son sustancialmente idénticos a los mostrados en la solicitud de patente de EE.UU. con número de serie 09/724.553 que se incorpora en este documento como referencia, por ejemplo, con una identidad de al menos aproximadamente el 70 %, de al menos aproximadamente el 80 %, o de al menos aproximadamente el 90 % de los residuos de aminoácidos cuando se compara y se alinea para una correspondencia máxima. En la técnica se aprecia que los dominios PDZs pueden ser mutados para dar cambios de aminoácidos que pueden reforzar o debilitar la unión y alterar la especificidad, y seguir siendo dominios PDZs (Schneider y col., 1998, Nat. Biotech. 17: 170 - 5). Salvo 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 la E6 del VPH del mismo. En otras palabras, si se hace referencia a un dominio PDZ en particular, también se hace referencia a las variantes de ese dominio PDZ que se unen a la proteína oncogénica E6 del VPH, como se describe a continuación. A este respecto se menciona que la numeración de los dominios PDZs en una proteína puede cambiar. Por ejemplo, el dominio 2 de MAGI-1 (con la secuencia de aminoácidos PSELKGFHITKLRKSSRGFGFTVVGDEPDEFLQIKSLVL DGPAAALDGKMETGDVIVSVNDTCVLGHTHAQVVKIFQSIPIGASVDLELCRGYPLPFDPPDN), como se ha referenciado en este documento, puede referenciarse como el dominio 1 de MA-GI-1 en otra fuente bibliográfica. Como tal, cuando se hace referencia a un dominio PDZ en particular de una proteína en esta solicitud, esta referencia debería entenderse en vista de la secuencia de ese dominio, según se describe en este documento, particularmente en la lista de secuencias de la Tabla 2 de la solicitud de EE.UU. US 20040018487, que muestra la relación entre las secuencias de la lista de secuencias y los nombres y números de registro del Genbank para varios dominios, donde sea apropiado. Según se usa en este documento, el término "proteína PDZ" se refiere a una proteína natural que contiene un dominio PDZ. Algunos ejemplos de proteínas PDZ incluyen CASK, MPP1, DLG1, DLG2, PSD95, NeDLG, TIP-33, SYN1a, TIP-43, LDP, LIM, LIMK1, LIMK2, MPP2, NOS1, AF6, PTN-4, p1L16, 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. Según se usa en este documento, el término "polipéptido del dominio PDZ" se refiere a un polipéptido que contiene un dominio PDZ, tal como una proteína de fusión que incluye una secuencia del dominio PDZ, una proteína natural PDZ o un péptido aislado del dominio PDZ. Un polipéptido del dominio PDZ puede tener por lo tanto 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 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 1.000 aminoácidos o más de longitud, habitualmente aproximadamente 2.000 aminoácidos o más de longitud, aproximadamente 50 - 2000 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50 - 1.500 aminoácidos de longitud, aproximadamente 50 - 1.000 aminoácidos de longitud, aproximadamente 60 - 1.000 aminoácidos de longitud, aproximadamente 70 - 1.000 aminoácidos de longitud. Los péptidos de los dominios PDZs no tienen habitualmente más de aproximadamente 200 aminoácidos (por ejemplo, 50 - 200 aminoácidos, 60 - 180 aminoácidos, 80 - 120 aminoácidos o 90 - 110 aminoácidos), y codifican para un dominio PDZ.

Los anticuerpos adecuados para la detección de la proteína E6 del VPH se describen en el documento 20050142541 (publicado el 30 de junio de 2005), por ejemplo. Algunos métodos detallados para la identificación de la proteína E6 de cepas oncogénicas del VPH se encuentran en la solicitud de patente publicada de EE.UU. US20040018487, métodos que se incorporan en este documento en su totalidad. Estos métodos publicados son fácilmente adaptables para su empleo en los actuales métodos.

En ciertas formas de realización, puede unirse un anticuerpo anti-E6 sobre un soporte sólido, y un extracto de proteínas producido mediante los métodos en cuestión se pone en contacto con el anticuerpo unido al soporte sólido. La unión de la proteína oncogénica E6 del extracto de proteínas puede ser detectada mediante el uso de una proteína que contiene un dominio PDZ. En otras formas de realización, puede unirse una proteína que contiene un dominio PDZ sobre un soporte sólido, y un extracto de proteínas producido mediante los métodos en cuestión se pone en contacto con la proteína que contiene el dominio PDZ unida al soporte sólido. La unión de la proteína oncogénica E6 del extracto de proteínas puede ser detectada mediante el uso de un anticuerpo anti-E6. En métodos alternativos, la unión entre el anticuerpo y la proteína que contiene el dominio PDZ puede producirse en disolución (es decir, en ausencia de unión del anticuerpo o de la proteína que contiene el dominio PDZ sobre un soporte sólido), y después de la unión, el anticuerpo o la proteína que contiene el dominio PDZ pueden unirse a un soporte sólido (por ejemplo, microesferas o similares). En estas formas de realización, la proteína que contiene el dominio PDZ puede ser una proteína de fusión con un dominio de afinidad que se une al soporte sólido. La presencia de la

proteína E6 puede ser detectada mediante el uso de un segundo agente de captura que reconoce la proteína E6.

Los resultados obtenidos de los métodos de ensayo descritos anteriormente pueden compararse con los resultados obtenidos de los controles adecuados, por ejemplo, un control positivo (en el que puede emplearse un extracto de proteínas conocido que contiene la proteína a la que se une el agente de captura) o un control negativo (por ejemplo, en el que puede emplearse un reactivo de extracción de proteínas que no se ha puesto en contacto con una muestra celular).

Los resultados obtenidos de los métodos de ensayo descritos anteriormente pueden indicar la presencia, la ausencia, o, en ciertas formas de realización, la cantidad de una proteína en un extracto de proteínas.

En ciertas formas de realización, los resultados obtenidos de los métodos de ensayo descritos anteriormente pueden ser comunicados de nuevo a una ubicación remota, por ejemplo, mediante teléfono, fax, correo electrónico, correo postal o cualquier otro medio. Los resultados pueden ser comunicados al sujeto o al médico del sujeto, por ejemplo.

Los anteriores métodos de detección de proteínas pueden realizarse junto con una prueba diferente, tal como una prueba citológica, por ejemplo, una prueba de Pap, para la identificación de células cervicouterinas cancerosas o precancerosas, u otras pruebas moleculares. En estas formas de realización, la muestra celular puede dividirse en partes antes de su uso. La primera parte puede usarse en los ensayos citológicos, y la segunda parte puede usarse en los métodos descritos anteriormente.

De acuerdo con lo anterior, ciertas formas de realización de la invención proporcionan también un kit para la producción de un extracto de proteínas. El sistema contiene generalmente: a) una muestra celular que contiene células fijadas; 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, el reactivo de extracción y el agente de neutralización pueden emplearse en 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 contienen un detergente no iónico.

KITS

En otro aspecto más, la presente invención proporciona kits para la práctica de los métodos en cuestión, por ejemplo, para la producción del extracto de proteínas a partir de células fijadas, en ciertas formas de realización, para la realización de pruebas para comprobar la presencia de una proteína en el extracto de proteínas. Los kits en cuestión incluyen al menos un reactivo de extracción que tiene un pH de al menos pH 10,0, y un reactivo de neutralización. El reactivo de extracción y/o el reactivo de neutralización contienen un detergente no iónico. Además, los kits pueden incluir un agente de captura para la detección de una proteína, y en ciertas formas de realización, reactivos (por ejemplo, tampones y reactivos de detección) para la detección de esa proteína mediante el uso del agente de captura. Los componentes anteriores puede estar presentes en recipientes individuales, o uno o más componentes pueden combinarse en un único recipiente, por ejemplo, un vial de vidrio o de plástico.

Además de los componentes anteriores, los kits en cuestión pueden incluir adicionalmente instrucciones para la práctica de los métodos en cuestión. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en cuestión en varias formas, una o más de las cuales puede estar presentes en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como una información impresa sobre un medio un sustrato adecuado, por ejemplo, una hoja u hojas de papel sobre las que se ha impreso la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Otro medio sería un medio informático, por ejemplo, un diskette, un CD, etc., en el que se ha registrado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección web que puede usarse a través de Internet para acceder a la información en un sitio lejano. Puede haber presente cualquier medio conveniente en los kits.

UTILIDAD

El método y los kits descritos anteriormente se emplean fácilmente en varios métodos de investigación y diagnósticos, incluyendo métodos de diagnóstico de una enfermedad o afección en particular, o de una infección por un agente infeccioso, tal como un virus o una bacteria. El método se emplea como parte de un diagnóstico para la detección de células infectadas por el VPH. Dado que la presencia de cepas oncogénicas del VPH se asocia con células cancerosas o precancerosas, los actuales métodos pueden emplearse para la detección de células cervicouterinas cancerosas o precancerosas.

Se sabe que el VPH es el agente causal de las siguientes enfermedades: epidermodisplasia verruciforme (EV), una afección cutánea de por vida que da como resultado un elevado riesgo de cáncer de piel (por ejemplo, de células escuamosas); neoplasias cervicouterinas tales como neoplasia intraepitelial cervicouterina (CIN) y carcinoma cervicouterino invasivo (ICC); neoplasias vaginales tales como neoplasia intraepitelial vaginal (VAIN) y carcinoma vaginal (VC); neoplasias vulvares tales como neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) y carcinoma vulvar; carcinoma de pene (incluyendo la papulosis Bowenoide); carcinomas anales (AC) y perianales (PC); carcinomas orofaríngeos (OS); carcinomas esofágicos (EC); cánceres de piel no melanoma (por ejemplo, carcinoma de células basales, BCC, y carcinoma de células escuamosas, SCC); y melanoma. Como tales, los actuales métodos pueden emplearse como

un diagnóstico para cualquiera de estas enfermedades.

Las células se obtienen (por ejemplo, se exfolian o se diseccionan) a partir de un sujeto y se depositan en un medio líquido que contiene un fijador que puede ser un medio de transporte para una prueba citológica. Las células se obtienen habitualmente en una consulta médica o en una clínica, la muestra celular es enviada a, y recibida por, una instalación de pruebas en la que se realizan los anteriormente mencionados métodos de detección de proteínas, y opcionalmente, ensayos citológicos. Los resultados de las pruebas son comunicados al sujeto, en algunas formas de realización a través del médico y un adjunto del mismo.

El sujeto a partir del que se emplean las células puede ser un mamífero, por ejemplo, un perro o un gato, un roedor (por ejemplo, un ratón, una cobaya o una rata), un primate (por ejemplo, un ser humano, un chimpancé o un mono). El sujeto será un ser humano, particularmente un hombre o una mujer. El sujeto puede mostrar síntomas de una infección por el VPH (por ejemplo, puede tener verrugas en una o más partes del cuerpo), puede ser sospechoso de estar infectado por el VPH (por ejemplo, puede contener células que son citológicamente coherentes con dicha infección) o puede haber dado ya positivo para el VPH. El sujeto puede no tener ningún signo de una infección por el VPH, los métodos anteriores pueden emplearse como parte de un cribado rutinario.

En una forma de realización, los actuales métodos pueden emplearse para la detección de cualquier cepa oncogénica del VPH, 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 prevalentes del VPH, por ejemplo, VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 33 y VPH 45) mediante la detección de la proteína E6 a partir de esa cepa. En una forma de realización, en el momento de iniciar los métodos actuales, no se sabe si las células fijadas contienen la proteína oncogénica E6 o de qué cepa es la proteína oncogénica E6. Si un ensayo de detección indica la presencia de una proteína oncogénica E6 en células fijadas, entonces la identidad de la cepa del VPH que infectó a estas células puede ser determinada mediante otros ensayos moleculares, por ejemplo, aquellos que emplean anticuerpos específicos para una proteína E6 en particular u otra proteína codificada por el virus, o mediante la secuenciación del ADN vírico.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no a título de limitación.

EXPERIMENTAL

Extracción de muestras clínicas enriquecidas

Se fijaron células transfectadas con el gen de la E6 del VPH16 (C33A+) con medio THINPREP™ y se añadieron (es decir, "se enriquecieron") a porciones de las muestras clínicas fijadas con THINPREP™ según se enumeran a continuación. Las células fueron enriquecidas con la mitad de cada una de cinco muestras clínicas (cada mitad de muestra clínica contiene 20 millones de células C33A+).

Esquema de extracción:

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

1 - 20 M de células C33A(+) en ThinPrep en ½ de #229 negativo clínico (extracción de 1,0 ml)

2 - 20 M de células C33A(+) en ThinPrep en ½ de #230 negativo clínico (extracción de 1,0 ml)

3 - 20 M de células C33A(+) en ThinPrep en ½ de #231 negativo clínico (extracción de 1,0 ml)

4 - 20 M de células C33A(+) en ThinPrep en ½ de #232 negativo clínico (extracción de 1,0 ml)

5 - 20 M de células C33A(+) en ThinPrep en ½ de #233 negativo clínico (extracción de 1,0 ml)

6 - 20 M de células C33A(+) en ThinPrep en (extracción de 1,0 ml)

Reactivo de extracción:

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

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

Tris Base 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 µl)

Urea 8 M / Lote 5678-83 - (0,25 M = 781 µl)

Añadir RO/DI a 20 ml - (8,1 ml)

NaOH 5 N / Lote A09522 - (525 µl)

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 pH 11,48

Procedimiento de extracción de proteínas:

1. Añadir la suspensión de células a un tubo de centrifuga de 50 ml
2. Rotar a 3.000 rpm durante 10 - 15 minutos
- 5 3. Retirar cuidadosamente el sobrenadante
4. Transferir el contenido a un tubo nunc de 1,5 ml
5. Rotar a 3.000 rpm durante 10 - 15 minutos
6. Retirar cuidadosamente el sobrenadante
7. Añadir la cantidad requerida de reactivo de extracción al sedimento
- 10 8. Resuspender para romper el sedimento celular
 - a. Aditivos (DTT @ 1:100)
9. Comprobar el pH, ajustar a 11,5
10. Mezclar a TA (o a una temperatura apropiada para la extracción) durante 30 minutos
11. Rotar a 14.000 rpm durante 10 - 15 minutos
- 15 12. Retirar el sobrenadante clarificado
13. Añadir DTT @ 1:100
14. Neutralizar a pH 8,0 con HCl 5 N y comprobar mediante ELISA (neutralizar a pH 8,0 con 31,0 µl de HCl 5 N / 1 ml)
- DTT 100 mM / NR 5701-90 / DOM 2/7/05

Método de ELISA

- 1 - Recubrir una placa (Nunc 439454 Maxisorp F96 / lote 542043) con 5 µg/ ml de GST-Magi-PDZ (lote 88.18 / 0,65 µg/µl) con PBS (lote 021405) - 100 µl por pocillo
- 25 11 ml x 5 µg/ml = 55 µg x 1 µl/0,65 µg = 84,6 µl de GST-Magi-PDZ
- 2 - Incubar durante una noche a 4 °C
- 3 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
- 4 - Bloquear la placa con 250 µl de tampón de bloqueo (lote 033005)
- 5 - Incubar durante 2 horas 25 °C
- 30 6 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
- 7 - Añadir 100 µl de MBP-E6 / lisado de muestra a los pocillos apropiados
- 8 - Incubate durante 1 hora 25 °C
- 9 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
- 10 - Añadir 100 µl de anticuerpo anti-E6 (4C6 - 2,85 mg/ml - lote 02) @ 5 µg/ml en el pocillo apropiado en tampón de BSA HNTG al 2 % (lote 031805B). El péptido N-terminal (VPH16E6 n° de lote PN3952-2) se añade las muestras apropiadas a 10 µg/ml para verificar la especificidad de la señal (el péptido es preincubado con el anticuerpo anti-E6 durante 45 minutos antes de su adición).
- 35 11 - Incubar durante 2 horas a 25 °C
- 12 - Lavar 3x (TBS-Tween) con lavador de placas
- 40 13 - Preparar una dilución 1:5.000 de IgG-HRP anti-ratón de cabra (Jackson GxM IgG-HRP / n° de catálogo 115-035-062 / lote 60988) en tampón de BSA al 2 % / Tween 20 al 0,05 % (lote 040505).
10,0 ml x 1/5.000 = 0,002 ml x 1.000 µl/ml = 2,0 µl de IgG-HRP anti-ratón de cabra
- 14 - Añadir 100 µl de la dilución 1:5.000 de IgG-HRP anti-ratón de cabra a los pocillos apropiados (eliminar el sustrato TMB y colocar a temperatura ambiente)
- 45 15 - Incubar durante 1 hora 25 °C
- 16 - Lavar 5x (TBS-Tween) con lavador de placas
- 17 - Añadir 100 µl de sustrato Neogen K-Blue TMB (lote 041018)
- 18 - Incubar durante 30 minutos a 25 °C
- 50 19 - Añadir 100 µl de disolución de detención (lote 030705) y leer a A450

Formulación:

- Tampón de BSA al 2 % / Tween al 0,05 % - (lote 040505)
- bloqueante de BSA al 2 % lote 033005 (49,975 ml)
- 55 Tween 20 lote A016759301 (0,025 ml)

Resultados

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

* volumen de extracción - 1 ml

5 Como puede observarse a partir de los resultados mostrados en la tabla anterior, se detectó la unión de la E6 en todas las muestras clínicas enriquecidas.

10 A partir de los resultados y los análisis anteriores es evidente que los métodos en cuestión proporcionan varias ventajas notables para el análisis molecular de células fijadas. En particular, los medos proporcionan un método rutinario para la producción del extracto de proteínas a partir de células fijadas en el que las proteínas del extracto de proteínas son detectables en ensayos de unión. Dado que generalmente es difícil la detección de ciertas proteínas en células fijadas, la invención en cuestión representa una contribución significativa a la técnica.

15 La mención de cualquier publicación es para su desvelación previa a la fecha de presentación, y no debería interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a dicha publicación en virtud de la invención previa.

20 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a título de ilustración y ejemplo, con propósitos de claridad y comprensión, los expertos habituales en la técnica apreciarán fácilmente que, a la luz de las enseñanzas de esta invención, pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones en la misma sin desviarse de las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de un extracto de proteínas a partir de células fijadas, que comprende:
- 5 a) poner en contacto dichas células fijadas con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y
b) poner en contacto dicha composición intermedia con un reactivo de neutralización para producir dicho extracto de proteínas, en donde dicho extracto de proteínas tiene un pH desde pH 6,5 hasta pH 8,0,
- 10 en el que uno o ambos de dicho reactivo de extracción y dicho reactivo de neutralización comprenden un detergente no iónico.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende:
- 15 a) poner en contacto dichas células fijadas con un reactivo de extracción para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y
b) poner en contacto dicha composición intermedia con un reactivo de neutralización que comprende un detergente no iónico;
- 20 para producir dicho extracto de proteínas.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método comprende:
- 25 a) poner en contacto dichas células fijadas con un reactivo de extracción que comprende un detergente no iónico para producir una composición intermedia con un pH mayor de pH 10,0; y,
b) poner en contacto dicha composición intermedia con un reactivo de neutralización;
- para producir dicho extracto de proteínas.
- 30 4. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente recibir una muestra celular que comprende dichas células fijadas antes de la etapa a).
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha muestra celular se recibe desde una ubicación remota.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en el que:
- a) dichas células fijadas son células cervicouterinas fijadas; o
b) dichas células fijadas están presentes en un medio de transporte que comprende metanol o etanol; o
c) dicho pH de la composición intermedia está en el intervalo de pH 11,0 a pH 13; o
40 d) dicho detergente no iónico comprende un detergente TRITON™ o TWEEN™.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho reactivo de extracción contiene un desnaturalizante.
8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho desnaturalizante se elige de entre dodecil sulfato sódico (SDS),
45 urea o sarcosilo.
9. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la comprobación de la presencia de dicha proteína en dicho extracto de proteínas.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que:
- a) dicha comprobación emplea un agente de captura para dicha proteína; o
b) dicha comprobación incluye un ensayo inmunológico; o
c) dicho ensayo es un ensayo de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA); o
55 d) dicha proteína es una proteína del virus del papiloma humano (VPH); o
e) dicha proteína es una proteína E6 del VPH; o
f) dichas células fijadas son células cervicouterinas exfoliadas; o
g) dichas células fijadas son recibidas desde una ubicación remota antes de dicha etapa de contacto a).
- 60 11. El método de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente la comunicación de los resultados de dicha prueba a una ubicación remota.
12. Un kit para la producción del extracto de proteínas a partir de células fijadas, comprendiendo dicho kit:
- 65 a) un reactivo de extracción que tiene un pH mayor de pH 10,0, y
b) un reactivo de neutralización que tiene un pH entre pH 4,0 y pH 8,0;

en el que dicho reactivo de extracción, o tanto dicho reactivo de extracción como dicho reactivo de neutralización, comprenden un detergente no iónico.

- 5 13. El kit de la reivindicación 12 que comprende adicionalmente instrucciones para su uso.
14. El kit de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente reactivos para la detección de una proteína en dicho extracto de proteínas.
- 10 15. El kit de la reivindicación 14, en el que:
- a) dichos reactivos incluyen un agente de captura para dicha proteína; o
 - b) dicha proteína es una proteína E6 del VPH.