



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 582**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **99903764 .1**
86 Fecha de presentación : **16.02.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1054897**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2000**

54 Título: **Procedimiento de purificación de PrPres a partir de una muestra biológica y sus aplicaciones.**

30 Prioridad: **16.02.1998 FR 98 01823**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es:
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
31-33, rue de la Federation
75015 Paris, FR

72 Inventor/es: **Deslys, Jean-Philippe**

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

Procedimiento de purificación de PrPres a partir de una muestra biológica y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de purificación de PrPres a partir de una muestra biológica con vistas a su utilización para la detección cualitativa y/o cuantitativa de PrPres en dicha muestra.

10 Las encefalopatías espongiformes subagudas transmisibles están provocadas por agentes transmisibles no convencionales (ATNC), también llamados priones, cuya naturaleza precisa permanece desconocida hasta el momento. Las ESST comprenden esencialmente la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en el hombre (ECJ o CJD por Creutzfeld-Jakob Disease), la tembladera en cordero y cabra y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB o BSE por bovine spongiform encephalopathy) en los bóvidos; se han puesto en evidencia otras encefalopatías en visón o ciertos animales salvajes tales como ciervo y alce.

15 Estas enfermedades son de evolución usualmente fatal y no existe, actualmente, ningún tratamiento eficaz.

20 En las encefalopatías espongiformes subagudas transmisibles existe una acumulación de una proteína del hospedador, la PrP (o proteína priónica) en una forma anormal (PrPres), principalmente en el sistema nervioso central; la PrPres se copurifica con la infecciosidad y su acumulación precede la aparición de lesiones histológicas. *In vitro*, es tóxica para cultivos de neuronas.

Dos propiedades bioquímicas permiten habitualmente distinguir la PrPres de la PrP normal: la PrPres es parcialmente resistente a las proteasas y es insoluble en agentes tensioactivos aniónicos.

25 Para poder detectar la PrPres presente en una muestra, es necesario someter esta última a diferentes operaciones para enriquecer dicha muestra en PrPres eliminando la PrP normal, de manera que la PrPres pueda detectarse a continuación mediante cualquier procedimiento específico sin conllevar:

- falsos positivos debidos a la presencia de PrP normal u otros contaminantes, o
- 30 - falsos negativos debidos a una concentración insuficiente de PrPres en la muestra biológica final.

35 Con este objetivo, se han propuesto un cierto número de procedimientos de aislamiento y/o de purificación de PrPres. Están basados esencialmente en el procedimiento puesto a punto por Hilmert y Diring (Nature, 1983, 306, 476-478) y que comprende, de manera general, una extracción con un detergente, ultracentrifugaciones diferenciales y un tratamiento con enzimas proteolíticas (Multhaup G. *et al.*, EMBO J., 1985, 4, 6, 1495-1501; Takahashi K. *et al.*, Microbiol. Immunol., 1986, 30, 2, 123-131; Hope J. *et al.*, EMBO J., 1986, 5, 10, 2591-2597; Grathwohl K.U.D. *et al.*, Arch. Virol., 1996, 141, 1863-1874; Kascak R.J. *et al.*, Immunol. Investig., 1997, 26, 259-268; R.E. Race *et al.*, J. Gen. Virol., 1992, 73, 3319-3323; Doi *et al.*, J. Gen. Virol., 1988, 69, 955-960; T. Muramoto *et al.*, Am. J. Pathol., 1993, 143, 5, 1470-1479; Farquhar C.F. *et al.*, Gen. Virol., 1994, 75, 495-504 y J. Gen. Virol., 1996, 77, 1941-1946). El documento Nature Medecine, vol. 3, n° 9, 1996, Chen *et al.*, pág. 1009-1015 describe un procedimiento de purificación de PrPres que comprende varios ciclos de extracción con un detergente (sarcosilo), seguido de una centrifugación diferencial, una ultracentrifugación y un tratamiento con una enzima proteolítica. El documento Cell, vol. 86, 1996, Thuret *et al.*, pág. 565-576, describe un procedimiento de aislamiento de PrPres que comprende una extracción con un detergente y una ultracentrifugación. Estos procedimientos tienen el inconveniente de constar de un número considerable de etapas que incluyen varias ultracentrifugaciones, que son pesadas de emplear y conllevan pérdidas acumulativas de PrPres, que conducen entonces a una sensibilidad insuficiente para obtener un umbral de detección y una cuantificación finos de PrPres.

50 Estos diferentes procedimientos necesitan unos aparatos de laboratorio de investigación y un tiempo de empleo que no son compatibles con una utilización sobre el terreno, en particular en mataderos.

Ahora bien, existe la necesidad de una verificación rápida de la ausencia o la presencia de una encefalopatía espongiforme subaguda transmisible en el momento de sacrificio del animal.

55 En consecuencia, el inventor tiene como objetivo proporcionar un procedimiento de purificación de una muestra biológica, con vistas a su utilización para una detección rápida y fiable de PrPres, que sea suficientemente sencillo de emplear para poder utilizarse sobre el terreno y especialmente en mataderos, y que responda así a las necesidades de la práctica mejor que los procedimientos de la técnica anterior.

60 Efectivamente, el procedimiento según la invención:

- es sencillo de emplear,
- 65 - es fiable,
- es fácil de interpretar: aumenta el umbral de sensibilidad de detección de PrPres eliminando los falsos positivos (PrP normal y otros contaminantes).

y elimina los falsos negativos, puesto que permite obtener, en valor absoluto, una cantidad considerable de PrPres, ya que es posible tratar cantidades considerables de material biológico con un rendimiento de purificación superior al 80%; esto es particularmente interesante en los mataderos y proporciona muestras en las que la PrPres es fácilmente detectable con los ensayos de diagnóstico habituales.

La presente invención tiene como objeto un procedimiento de purificación de PrPres a partir de una muestra biológica, caracterizado porque comprende esencialmente:

- (1) la incubación durante 30 segundos a 2 horas, preferiblemente durante 30 segundos a 10 minutos, a una temperatura inferior a 80°C, de dicha muestra biológica con un tampón A que comprende al menos un agente tensioactivo, en una cantidad comprendida entre un cuarto y cuatro veces, preferiblemente entre un cuarto y una vez y media, el peso de la muestra biológica y, eventualmente, la incubación previa, posterior o simultánea con una proteasa para formar una suspensión micelar o lamelar S1 opalescente turbia; cualquier agente tensioactivo o mezcla de agentes tensioactivos, en las condiciones de temperatura y de cantidades anteriormente citadas, no solubiliza la mayoría de la PrPres, que queda en suspensión, mientras que la PrP normal se solubiliza, e incluso se destruye en caso de adición de proteasa; dicha incubación se realiza preferiblemente a una temperatura inferior a 50°C en presencia de una cantidad de agente tensioactivo comprendida entre un cuarto y una vez y media el peso de la muestra biológica; según la invención, la proteasa puede añadirse efectivamente o bien antes de la adición del agente tensioactivo o bien después, o bien simultáneamente;
- (2) la adición a dicha suspensión micelar o lamelar S1 obtenida en (1) de un tampón B en una cantidad adecuada para aclarar dicha suspensión (formación de una microemulsión o de una microsuspensión, por ejemplo), estando constituido dicho tampón B por un disolvente o una mezcla de disolventes que no solubiliza la PrPres y presenta una constante dieléctrica comprendida entre 10 y 25; se obtiene así una suspensión S2 transparente al ojo desnudo;
- (3) la centrifugación de la suspensión S2 obtenida en la etapa (2); dicha centrifugación se efectúa por ejemplo durante 2 a 10 minutos a una velocidad inferior a 20.000 g, preferiblemente a una velocidad comprendida entre 3.500 y 17.500 g; la PrPres se encuentra en el sedimento de centrifugación con un rendimiento de purificación de PrPres comprendido, sorprendentemente, entre 80 y 100%; ventajosamente, el tiempo y la velocidad de centrifugación pueden adaptarse para llegar al mismo resultado, a saber, la obtención de un rendimiento de purificación de PrPres comprendido entre 80 y 100%, y
- (4) la solubilización de dicho sedimento en un tampón C que comprende al menos un agente tensioactivo tal como se define en la etapa (1), a una concentración comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,25% y 1%, con relación al volumen de tampón C (p/v) y/o al menos un agente caotrópico a una concentración comprendida entre 0,1 M y 8 M y a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 100°C, preferiblemente igual o superior a 80°C; en dichas condiciones de temperatura, los agentes tensioactivos anteriormente citados, preferiblemente agentes tensioactivos iónicos y/o agentes caotrópicos, solubilizan la PrPres.

Dichas etapas (1) y (2) pueden realizarse simultánea o sucesivamente; preferiblemente se realizan sucesivamente.

Según un modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, cuando la muestra biológica es un tejido o un órgano, este último se homogeneiza previamente a la etapa (1), por ejemplo mediante trituración mecánica en un tampón de homogeneización constituido por un tampón neutro tal como agua o un tampón isotónico tal como glucosa al 5%.

Según otro modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, la temperatura empleada en la etapa (a) está comprendida entre la temperatura ambiente y 50°C: es preferiblemente de 37°C.

Preferiblemente, el tampón A comprende un agente tensioactivo seleccionado del grupo constituido por:

- tensioactivos aniónicos tales como SDS (dodecilsulfato de sodio), sarcosilo (laurosilsarcosina), colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio,
- tensioactivos dipolares tales como SB 3-10 (decilsulfobetaina), SB 3-12 (dodecilsulfobetaina), SB 3-14, SB 3-16 (hexadecilsulfobetaina), CHAPS y desoxiCHAPS,
- tensioactivos no iónicos tales como C12E8 (dodeciloctetilenglicol), Triton X100, Triton X114, Tween 20, Tween 80, MEGA 9 (nonanoilmetilglucamina), octilglucósido, LDAO (óxido de dodecildimetilamina) o NP40, o
- mezclas de tensioactivos tales como una mezcla de un agente tensioactivo iónico y un agente tensioactivo no iónico y, especialmente, la mezcla SDS-Tween 80 o la mezcla sarcosilo-Triton X100 o la mezcla de dos agentes tensioactivos iónicos tal como la mezcla de SDS-desoxicolato, o una mezcla de un agente tensioactivo iónico y un agente tensioactivo dipolar.

ES 2 270 582 T3

Según otro modo de empleo ventajoso de dicho procedimiento, el tampón B se selecciona preferiblemente entre los alcoholes C₃-C₆ y las mezclas de alcohol cuya constante dieléctrica teórica media está comprendida entre 10 y 25. Los alcoholes o mezclas de alcoholes siguientes son particularmente preferidos: 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, isopropanol, isopropanol + pentanol, etanol + hexanol, butanol + pentanol, etc.

Se entiende por constante dieléctrica, en el sentido de la presente invención, la constante dieléctrica estática ϵ , medida en campos estáticos o de frecuencia relativamente baja; corresponde a la relación de desplazamiento eléctrico D/fuerza del campo eléctrico E cuando se aplica un campo eléctrico a la solución a una temperatura comprendida entre 293,15 y 298,15 K.

La constante dieléctrica de los líquidos, tal como se define anteriormente, se describe más particularmente en "CRC Handbook of Chemistry and Physics" (Ed. David R. Lide, 75ª edición, 1994, CRC Press).

Para una mezcla de disolventes, se entiende por constante dieléctrica teórica media la media de las constantes dieléctricas de cada disolvente, ponderada por su proporción en la mezcla.

La adición del tampón B en la etapa (2) permite, sorprendentemente, obtener rendimientos de purificación superiores al 90% con condiciones de centrifugación de baja velocidad; permite reducir de manera significativa la cantidad de sedimento final manteniendo un rendimiento considerable; ventajosamente, la cantidad de sedimento final es preferiblemente inferior al 10% en peso de la muestra biológica de partida para permitir utilizarla eficazmente en el marco de una dosificación inmunológica, mientras que cuando se añade sólo tampón A, se dispone en las condiciones de la técnica anterior, que imponen una ultracentrifugación para obtener rendimientos suficientes de PrPres con vistas a una detección.

Puede observarse que pueden obtenerse igualmente rendimientos de purificación superiores al 80% haciendo variar el tiempo y la velocidad de centrifugación: 2 a 10 minutos a una velocidad inferior a 20.000 g o durante una duración reducida proporcionalmente al aumento del número de g.

Preferiblemente, la relación de rendimiento de PrPres en la fase sólida/cantidad de sedimento recuperada después de centrifugación de la suspensión S2 es superior a 10, cuando la muestra de partida corresponde a 100 mg de cerebro.

De modo igualmente preferido, el tampón C empleado en la etapa (4) comprende un agente caotrópico que se selecciona especialmente del grupo constituido por urea y guanidina o una mezcla de estos; puede utilizarse igualmente cualquier otro agente caotrópico.

Preferiblemente, la urea está a una concentración comprendida entre 0,25 y 8 M y la guanidina está a una concentración comprendida entre 0,1 y 6 M.

Cuando el tampón C es una mezcla de al menos un agente tensioactivo y al menos un agente caotrópico, se selecciona preferiblemente del grupo constituido por las mezclas siguientes: mezcla de SDS y urea, mezcla de sarcosilo y urea, mezcla de desoxicolato y urea o mezcla de sarcosilo y guanidina y sarcosilo, guanidina y urea. Preferiblemente, en la mezcla de SDS y urea, el SDS está a 0,25-1% y la urea está a 0,25-6 M; en la mezcla de sarcosilo y urea, el sarcosilo está a una concentración comprendida entre 0,25 y 1% y la urea está a una concentración comprendida entre 0,25 y 8 M; en la mezcla de sarcosilo y guanidina, el sarcosilo está a una concentración comprendida entre 0,25 y 1% y la guanidina está a una concentración comprendida entre 0,5 M - 3 M y en la mezcla de sarcosilo, guanidina y urea, el sarcosilo está a una concentración comprendida entre 0,25 y 1%, la guanidina está a una concentración comprendida entre 0,5 M - 3 M y la urea está a una concentración comprendida entre 2 y 6 M.

Puede utilizarse igualmente tampón de Laemmli (SDS al 4%, Tri-HCl 0,1 M, pH 8, sacarosa al 5% y β -mercaptoetanol al 2%), especialmente para transferencias Western.

La presente invención tiene igualmente como objeto un procedimiento de detección de PrPres en una muestra biológica, caracterizado porque comprende:

- el tratamiento de dicha muestra tal como se define anteriormente,
- la dilución de la muestra obtenida si es necesario, y
- la detección de PrPres mediante cualquier procedimiento analítico apropiado tal como un procedimiento inmunológico (ELISA, transferencia Western), produciendo una señal específica.

La etapa de dilución anteriormente citada permite neutralizar el tampón C con vistas a una detección de PrPres mediante un procedimiento ELISA; se realiza por ejemplo con un tampón que comprende albúmina, conduciendo a una concentración final de albúmina comprendida entre 2 y 10% (p/v) o con un tampón basado en desoxicolato al 1%, por ejemplo.

ES 2 270 582 T3

Una muestra biológica así tratada contiene una concentración eficaz de PrPres, de manera que esta última pueda detectarse mediante cualquier procedimiento analítico, especialmente un procedimiento inmunológico, directamente en esta muestra.

5 Como variante, la presente invención tiene como objeto un procedimiento de purificación de PrPres a partir de una muestra biológica, caracterizado porque comprende esencialmente:

- 10 (1) la incubación durante 30 segundos a 2 horas, preferiblemente durante 30 segundos a 10 minutos, a una temperatura inferior a 80°C, de dicha muestra biológica con un tampón A que comprende al menos un agente tensioactivo, en una cantidad comprendida entre un cuarto y cuatro veces, preferiblemente entre un cuarto y una vez y media el peso de la muestra biológica y, eventualmente, la incubación previa, posterior o simultánea con una proteasa para formar una suspensión micelar o lamelar S1 opalescente turbia; según la invención, la proteasa se añade efectivamente o bien antes de la adición del agente tensioactivo o bien después, o bien simultáneamente;
- 15 (2) la adición a dicha suspensión micelar o lamelar S1 obtenida en (1) de un tampón B en una cantidad adecuada para formar una separación de fases, estando constituido dicho tampón B por un disolvente o una mezcla de disolventes que no solubiliza la PrPres y presenta una constante dieléctrica comprendida entre 10 y 25;
- 20 (3) la centrifugación de la suspensión obtenida en la etapa (2); dicha centrifugación se efectúa por ejemplo durante 2 a 10 minutos, a una velocidad inferior a 20.000 g, preferiblemente a una velocidad comprendida entre 3.500 y 17.500 g; la PrPres se encuentra en la interfase;
- 25 (4) la recuperación de la película presente en la interfase;
- (5) la resolubilización de dicha película con un tampón A sin proteasa;
- 30 (6) la centrifugación de la suspensión obtenida en la etapa (5) durante 2 a 10 minutos a una velocidad inferior a 20.000 g, preferiblemente a una velocidad comprendida entre 3.500 y 17.500 g; la PrPres se encuentra en el sedimento de centrifugación, con un rendimiento de purificación de PrPres comprendido, sorprendentemente, entre 70 y 100%; ventajosamente, el tiempo y la velocidad de centrifugación pueden adaptarse para llegar al mismo resultado, a saber, la obtención de un rendimiento de purificación de PrPres comprendido entre 70 y 100% y
- 35 (7) la solubilización de dicho sedimento en un tampón C que comprende al menos un agente tensioactivo tal como se define en la etapa (1) a una concentración comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,25% y 1%, con relación al volumen de tampón C (p/v) y/o al menos un agente caotrópico a una concentración comprendida entre 0,1 M y 8 M y a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 100°C, preferiblemente igual o superior a 80°C; en dichas condiciones de temperatura,
- 40 los agentes tensioactivos anteriormente citados, preferiblemente agentes tensioactivos iónicos y/o agentes caotrópicos, solubilizan la PrPres.

Las cantidades de tampón B a añadir para obtener una microemulsión, una microsuspensión o una separación de fases se establecen con ayuda de un conjunto de tampones B, como se ilustra con el 1-butanol en la figura 1: pueden
45 variar en función del tampón A y de los constituyentes seleccionados para el tampón B.

En una variante, la etapa de solubilización (etapa (4) del primer procedimiento o etapa (7) del segundo procedimiento) en dicho tampón C comprende el calentamiento a una temperatura igual o superior a 80°C, durante 10 minutos, seguido de una centrifugación, preferiblemente durante 2 a 10 minutos, a una velocidad inferior a 20.000 g, preferi-
50 blemente a una velocidad comprendida entre 3.500 y 17.500 g; en este caso, la PrPres se resolubiliza y se encuentra en el sobrenadante; en dichas condiciones, se obtiene una muestra particularmente bien adaptada a una dosificación de PrPres mediante un procedimiento ELISA.

La presente invención tiene igualmente como objeto un kit de tratamiento de una muestra biológica, caracterizado porque comprende además un tampón de homogeneización de dicha muestra biológica, cantidades convenientes de
55 tampón A, de tampón B y de tampón C tales como se definen anteriormente.

La presente invención tiene igualmente como objeto un kit de detección de PrPres, caracterizado porque comprende cantidades convenientes de tampón de homogeneización de la muestra biológica en la que la PrPres debe detectarse, cantidades convenientes de tampón A, de tampón B y de tampón C tales como se definen anteriormente, así como al
60 menos un anticuerpo anti-PrPres conveniente.

Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende también otras disposiciones que se deducirán de la descripción siguiente, que se refiere a ejemplos de empleo del procedimiento objeto de la presente invención, así
65 como a los dibujos anexos, en los que:

- la figura 1 ilustra la influencia de la cantidad de tampón B (butanol) sobre el rendimiento de purificación de PrPres (en %) y la cantidad de sedimento obtenido después de centrifugación;

ES 2 270 582 T3

- la figura 2 ilustra la influencia de diferentes tampones B sobre el rendimiento de purificación de PrPres (en %) y la cantidad de sedimento obtenido después de centrifugación;

5 - la figura 3 ilustra el papel de la constante dieléctrica teórica media, tal como se define anteriormente, para comparar diferentes mezclas de alcoholes utilizadas como tampón B;

- la figura 4 ilustra un ejemplo de detección de PrPres mediante transferencia Western;

10 - la figura 5 ilustra la sensibilidad y el rendimiento del ensayo ELISA sobre diferentes diluciones de muestras tratadas según la invención;

- la figura 6 ilustra un ensayo ELISA efectuado directamente sobre los homogeneizados, y

15 - la figura 7 ilustra una comparación de diferentes tampones C.

Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se dan únicamente a modo de ilustración del objeto de la invención, de la que no constituyen en modo alguno una limitación.

Ejemplo 1

20 *Tratamiento de una muestra de cerebro bovino para la dosificación de PrPres sobre el terreno: selección de la cantidad de tampón B conveniente*

25 - Se extraen 500 mg de cerebro bovino, se tritura y se homogeneiza al 25% (p/v) en una solución de glucosa al 5%.

30 Para realizar la homogeneización, se introducen la extracción de cerebro (500 mg) y 1 ml de glucosa en tubos que comprenden bolas de cerámica con agitación. Se recupera el sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml); se aclaran las bolas en suspensión con 500 μ l de glucosa y se agitan; se recupera el sobrenadante obtenido, que se mezcla con el sobrenadante precedente (2 ml).

35 - Se incuban 400 μ l de homogeneizado tal como se obtiene anteriormente (equivalente a 100 mg de cerebro/con 400 μ l de tampón A que comprende una mezcla a partes iguales de 25% (p/v) de SDS y 25% (p/v) de Tween 80 a una relación 1/1 (v/v), así como proteasa K (0,1 mg/ml de tampón A, o sea 0,4 mg/g de tejido) durante 10 minutos (2 veces 5 min) a 37°C (etapa 1)). Como variante, el tampón A comprende ventajosamente sarcosilo al 10% y Triton X100 al 10%; este último tampón A, que no comprende SDS, es más ventajoso, puesto que no conlleva perturbaciones en la detección de PrPres mediante anticuerpos específicos mediante un procedimiento de tipo ELISA.

40 - Se añaden 0 a 1.000 μ l de butanol (tampón B) (etapa (2)).

La figura 1 muestra el rendimiento de purificación de PrPres (%), cuantificado en transferencia Western y la cantidad de sedimento (en mg) en función de la cantidad de tampón B añadida.

45 Esta figura muestra que, entre 10 y 53%, la PrPres se mantiene en suspensión y que, entre 30 y 50% de butanol, se obtiene un rendimiento de purificación del orden del 100% y un sedimento inferior a 10 mg.

50 - Se centrifuga a 3.800 g (4.000 rpm, centrífuga JOUAN) durante 10 minutos (etapa 3)), se elimina el sobrenadante y se disuelve el sedimento obtenido que contiene la PrPres con 80-100 μ l de un tampón C (etapa (4)) que comprende:

- 55
- o bien SDS al 0,5% y urea 0,5 M,
 - o bien un tampón de Laemmli,
 - o bien sarcosilo al 0,5% y urea 6 M

60 durante 5 minutos a 100°C.

Este tratamiento permite la disolución de la PrPres, la muestra está directamente lista para utilizar en una dosificación de tipo inmunológico tal como ELISA o transferencia Western.

65 Para realizar una ELISA, se disuelve preferiblemente el sedimento en un tampón C que comprende sarcosilo (0,25-1%) y urea (0,25-8 M) o SDS (0,25-1%) y urea (0,25-1 M); la muestra obtenida se diluirá preferiblemente (a ¼ o ½) después de calentamiento con un tampón que contiene albúmina, conduciendo a una concentración final de albúmina comprendida entre 2 y 10% (p/v), o con un tampón que contiene desoxicolato al 1%.

ES 2 270 582 T3

Como variante, se calienta la mezcla diluida a 100°C durante 5-10 minutos, después se centrifuga durante 2 a 10 minutos a una velocidad inferior a 20.000 g, preferiblemente a una velocidad comprendida entre 3.500 y 17.500 g; se diluye el sobrenadante entre ¼ y ½ con un tampón ELISA.

En el caso presente, se realiza la cuantificación de PrPres con transferencia Western, mediante mezcla vol/vol con tampón de Laemmli; la muestra diluida se deposita a continuación sobre gel para una detección mediante transferencia Western; las cantidades de PrPres detectadas se relacionan con un conjunto lineal de diluciones de PrPres purificada en las mismas condiciones que anteriormente, a partir de un mismo homogeneizado de cerebro de vaca aquejado de EEB en el estado terminal de la enfermedad (control positivo).

Se liberan del ruido de fondo las muestras tratadas según el procedimiento según la invención, y permiten una dosificación fiable, específica y cuantitativa de la PrPres.

El procedimiento según la invención permite aumentar el rendimiento de purificación de PrPre de manera significativa:

- Efectivamente, cuando sólo se añade tampón A, el rendimiento de PrPres sólo es del orden de 40%; se observa por tanto una pérdida del orden de 60% de PrPres, especialmente por el hecho de su reparto entre la fase sólida y la fase líquida; además, el sedimento es considerable. Esto explica porqué en la técnica anterior los protocolos descritos utilizan sarcosilo, que conlleva la obtención de sedimentos más bajos, pero que impone ultracentrifugaciones pesadas para tener un rendimiento suficiente.
- La etapa (2) permite aumentar el rendimiento de PrPres en la fase sólida: se obtiene un rendimiento del orden de 80-100% en la fase sólida de la suspensión S2, reduciendo la cantidad de sedimento como se precisa anteriormente.

Ejemplo 2

Tratamiento de una mezcla de cerebro bovino para la dosificación de PrPres sobre el terreno: variante de la etapa (1) y de la etapa (2)

- La etapa de homogeneización es idéntica a la descrita en el ejemplo 1,
- a continuación, se incuban los 2 ml de homogeneizado obtenidos a partir de 500 mg de cerebro bovino con 2 ml de tampón A en las mismas condiciones que las expuestas en el ejemplo 1 (etapa (1)),
- se añaden 3 ml de tampón B en las mismas condiciones que las expuestas en el ejemplo 1 (etapa (2)),
- la continuación del procedimiento es idéntica a la del ejemplo 1.

Ejemplo 3

Tratamiento de una muestra de cerebro bovino para la dosificación de PrPres sobre el terreno: variante de la etapa de homogeneización

- Se extraen 250 mg de cerebro bovino, se trituran y se homogeneizan al 25% (p/v) en una solución de glucosa al 5%.

Para realizar la homogeneización, se introducen la extracción de cerebro (250 mg) y 750 µl de glucosa en tubos que comprenden bolas de cerámica con agitación durante 40 segundos (aparato RIBOLYSER-HYBAID); se extraen 400 µl de sobrenadante y después se procede como en el ejemplo 1.

Ejemplo 4

Comparación de diferentes tampones B frente a la relación de rendimiento de purificación de PrPres/cantidad de sedimento

Se trata la muestra en las mismas condiciones que las expuestas en el ejemplo 1, con excepción de la cantidad de tampón B, que es de 600 µl.

La figura 2 ilustra las relaciones obtenidas en transferencia Western con diferentes tampones B: pentanol, butanol, mezcla de isopropanol + pentanol, mezcla de etanol + hexanol, isopropanol y etanol; las mezclas se realizan vol/vol.

ES 2 270 582 T3

Ejemplo 5

Comparación de las constantes dieléctricas de diferentes mezclas y su influencia sobre el rendimiento de purificación de PrPres y la cantidad de sedimento

Se realiza el procedimiento en las condiciones expuestas en el ejemplo 4. La figura 3 ilustra los resultados obtenidos: en el caso en que el tampón B sea una mezcla de alcoholes, el volumen de cada alcohol se calcula en función de su constante dieléctrica y de la constante dieléctrica teórica de la mezcla deseada (por ejemplo 17) y referido a 600 μ l de volumen total de alcohol. Por ejemplo, para la mezcla hexanol/etanol, se obtiene la fórmula siguiente:

$$13y + 25(1 - y) = 17$$

representando y el porcentaje de hexanol, siendo 13 la constante dieléctrica del hexanol y siendo 25 la constante dieléctrica del etanol.

Para una constante dieléctrica teórica media de 15 o menor, se observa una separación de fases.

Ejemplo 6

Detección de PrPres mediante transferencia Western

**Protocolo*

- 1) Incubación a 37°C, 2 veces 5 min, de 400 mg de homogeneizado de cerebro de vaca al 25% (peso/volumen) y de 400 ml de tampón A que comprende 400 μ l de una mezcla a partes iguales (v/v) de SDS al 25% (p/v) y Tween 80 al 25% (v/v) (50/50) y de proteasa K (PK) a 0,1 mg/ml de tampón A,
- 2) Se añaden 600 μ l de tampón B (salvo muestras de los carriles 7 y 8: 1.000 μ l de tampón B), constituido por 1-butanol,
- 3) Se centrifuga a 15.000 rpm durante 5 min (aproximadamente 17.000 g),
- 4) Se retoma el sedimento de centrifugación en 100 μ l de tampón de Laemmli que contiene 4% de SDS y se calienta a 100°C durante 5 min.

**Transferencia Western*

Se utilizan las muestras obtenidas para realizar una electroforesis SDS-PAGE y se transfieren a membrana de nitrocelulosa en las condiciones descritas por Towbin *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 4350-4354) o por Lasmézas *et al.*, (*J. Gen. Virol.*, 1996, anteriormente citado).

Antes de depositarse sobre el gel de electroforesis, se han diluido las muestras 1/20 en un testigo negativo, producido en las mismas condiciones que las expuestas en el ejemplo 1 a partir de un homogeneizado de vaca sana, a causa de la amplitud de las señales (gel de poliacrilamida al 12% cargado con el equivalente a 10 mg (10 μ l) de cerebro, correspondiente a 9,5 mg de cerebro de vaca sana y 0,5 mg de cerebro de vaca infectada).

La inmunodetección de PrPres se ha realizado con el antisuero JB007 (R. Demaimay *et al.*, *J. Virol.* 1997, 71, 12, 9685-9689 a 1/5.000, y las Ig de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa (1/2.500). Se ha revelado la inmunorreactividad mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham), y se ha cuantificado y visualizado sobre películas autorradiográficas como se ilustra en la figura 4.

La figura 4 ilustra los resultados obtenidos y corresponde a la curva propanol/hexanol de la figura 3A.

En esta figura, los carriles 1 a 6 corresponden a muestras tratadas empleando como tampón B diferentes mezclas de propanol/hexanol, conduciendo a diferentes constantes dieléctricas teóricas medias; los carriles 8 y 9 corresponden a muestras biológicas sometidas a un procedimiento que emplea como tampón B 1.000 μ l de butanol (punto 53% de la figura 1); se observa en este caso que el conjunto de PrPres se encuentra en la interfase; los carriles 9 y 10 corresponden a muestras biológicas sometidas a un procedimiento que emplea como tampón B 600 μ l de butanol (punto 43% de la figura 1); se observa en este caso que el conjunto de PrPres se encuentra en el sedimento (carril 10), mientras que en un testigo negativo, tratado en las mismas condiciones (carril 9), no se observa ninguna señal.

ES 2 270 582 T3

Ejemplo 7

Dosificación ELISA de PrPres a partir de una muestra obtenida según la invención

- 5 Se prepara una muestra en las condiciones siguientes:
- Se extraen 400 mg de cerebro bovino, se trituran y se homogeneizan al 20% en una solución de glucosa al 5% (1,6 ml) en las mismas condiciones que las expuestas en el ejemplo 1,
 - 10 - se incuban a 37°C durante 10 min (2 veces 5 min con agitación intermedia), 500 μ l del homogeneizado obtenido con 500 μ l de tampón A que comprende sarcosilo al 10% y Triton X100 al 10%, así como proteasa K (80 μ g/ml),
 - 15 - se añaden 500 μ l de tampón B (butanol),
 - se centrifuga a 15.000 rpm con un rotor que permite obtener 17.608 g durante 5 min, se obtienen los mismos resultados con un tiempo de centrifugación de 4 min a 20.627 g,
 - 20 - se elimina el sobrenadante y se disuelve el sedimento obtenido que contiene la PrPres con 100 μ l de tampón C que comprende urea 6 M y sarcosilo al 0,5% durante 5 min a 100°C,
 - se centrifuga a 15.000 rpm con un rotor que permite obtener 17.608 g durante 5 min, se obtienen los mismos resultados con un tiempo de centrifugación de 4 min a 20.627 g. Se diluye el sobrenadante 1/3 con tampón EIA (tampón fosfato con 0,5% de desoxicolato).

25 Para efectuar la ELISA, se deposita la muestra obtenida a razón de 100 μ l por pocillo por duplicado sobre una placa recubierta con un primer anticuerpo anti-PrP (8G8, ref. Kraseman *et al.*, *Molecular Medicine* 1996), después se incuba, se lava y se revela con un segundo anticuerpo anti-PrP (12F10, ref. Kraseman *et al.*, 1996) acoplado a acetilcolinesterasa (ref. Grassi *et al.*, *J. Immunol. Methods* 1989). Se incuba con el sustrato de acetilcolinesterasa,

30 después se hace la lectura a 415 nm durante 1 min ó 30 min, después de adición del sustrato (reactivo de Ellmann).

Los resultados presentados en la figura 5 se refieren a un homogeneizado al 20% (peso/volumen) de cerebro de vaca clínicamente aquejado de EEB, diluido a 1/10, 1/100, 1/1.000 o 1/10.000 en un homogeneizado al 20% (peso/volumen) de cerebro de vaca sana.

35 Se tratan entonces las muestras en las condiciones descritas anteriormente y se ensayan con un ensayo EIA con el anticuerpo 8G8 como captura y el anticuerpo 12F10 como anticuerpo de detección.

Se ensayan las muestras diluidas en el tampón de depósito EIA (diluciones a 1/3, después de 3 en 3).

40 La figura 5 ilustra los resultados obtenidos (densidad óptica de la señal en función de la dilución final del homogeneizado, a saber, dilución en el homogeneizado negativo x dilución en el tampón EIA); la curva semilogarítmica presenta un aspecto sigmoidal, observado clásicamente en todas las dosificaciones de tipo EIA. Además, ha de observarse una buena superposición de las curvas obtenidas a partir de los homogeneizados a 1/10, 1/100 y 1/1.000.

45 Finalmente, el nivel de sensibilidad del ensayo permite detectar este cerebro positivo diluido a 1/10.000.

En la figura 6, se ha ensayado otro homogeneizado a 1/1.000 mediante la técnica EIA o bien después de tratamiento como se describe anteriormente, (con una concentración de PK de 400 ng/mg), o bien después de tratamiento de los homogeneizados directamente mediante concentraciones diferentes de PK. Se deduce que el tratamiento directo de los homogeneizados mediante PK sin purificación da o bien señales elevadas de los testigos negativos por bajas concentraciones de PK (destrucción incompleta de PrPc), o bien señales bajas por vacas positivas con concentraciones elevadas de PK. Este ejemplo subraya por tanto el carácter indispensable del tratamiento de los homogeneizados tal como se ha descrito anteriormente para obtener una detección correcta de la PrPres.

55 Ejemplo 8

Comparación de diferentes tampones C

El protocolo de tratamiento de la muestra utilizada es el del ejemplo 7.

60 La figura 7 ilustra los resultados obtenidos.

La guanidina parece aportar más y la combinación urea-guanidina parece la más interesante (sabiendo que la urea se soporta mejor por el ensayo ELISA).

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de purificación de proteína priónica en forma anormal (PrPres) a partir de una muestra biológica, **caracterizado** porque comprende:

- (1) la incubación durante 30 segundos a 2 horas, a una temperatura inferior a 80°C, de dicha muestra biológica con un tampón A que comprende al menos un agente tensioactivo, en una cantidad comprendida entre un cuarto y cuatro veces el peso de la muestra biológica para formar una suspensión S1;
- (2) la adición a dicha suspensión S1 obtenida en (1) de un tampón B en una cantidad adecuada para aclarar dicha suspensión mediante la formación de una microemulsión o de una microsuspensión, estando constituido dicho tampón B por un disolvente o una mezcla de disolventes que no solubiliza la PrPres y presenta una constante dieléctrica comprendida entre 10 y 25;
- (3) la centrifugación de la suspensión S2 obtenida en la etapa (2); y
- (4) la solubilización de dicho sedimento en un tampón C que comprende al menos un agente tensioactivo del mismo tipo que el de la etapa (1), a una concentración comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,25% y 1%, con relación al volumen de tampón C (p/v) y/o al menos un agente caotrópico a una concentración comprendida entre 0,1 M y 8 M y a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 100°C, preferiblemente igual o superior a 80°C.

2. Procedimiento de purificación de proteína priónica en forma anormal (PrPres) a partir de una muestra biológica, **caracterizado** porque comprende:

- (1) la incubación durante 30 segundos a 2 horas, a una temperatura inferior a 80°C, de dicha muestra biológica con un tampón A que comprende al menos un agente tensioactivo, en una cantidad comprendida entre un cuarto y cuatro veces el peso de la muestra biológica para formar una suspensión S1;
- (2) la adición a dicha suspensión S1 obtenida en (1) de un tampón B en una cantidad adecuada para formar una separación de fases, estando constituido dicho tampón B por un disolvente o una mezcla de disolventes que no solubiliza la PrPres y presenta una constante dieléctrica comprendida entre 10 y 25;
- (3) la centrifugación de la suspensión obtenida en la etapa (2);
- (4) la recuperación de la película presente en la interfase;
- (5) la resolubilización de dicha película con un tampón A sin proteasa;
- (6) la centrifugación de la suspensión obtenida en la etapa (5), y
- (7) la solubilización de dicho sedimento en un tampón C que comprende al menos un agente tensioactivo del mismo tipo que el de la etapa (1), a una concentración comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,25% y 1%, con relación al volumen de tampón C (p/v) y/o al menos un agente caotrópico a una concentración comprendida entre 0,1 M y 8 M y a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 100°C, preferiblemente igual o superior a 80°C.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado** porque cuando la muestra biológica es un tejido o un órgano, este último se homogeneiza previamente a la etapa (a) en un tampón de homogeneización seleccionado del grupo constituido por tampones neutros y tampones isotónicos.

4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la duración de la incubación está comprendida preferiblemente entre 30 segundos y 10 minutos.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el tampón A y/o el tampón C comprenden un agente tensioactivo seleccionado del grupo constituido por:

- tensioactivos aniónicos tales como SDS (dodecilsulfato de sodio), sarcosilo (laurosilsarcosina), colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio,
- tensioactivos dipolares tales como SB 3-10 (decilsulfobetaina), SB 3-12 (dodecilsulfobetaina), SB 3-14, SB 3-16 (hexadecilsulfobetaina), CHAPS y desoxiCHAPS,
- tensioactivos no iónicos tales como C12E8 (dodeciloctaetilenglicol), Triton X100, Triton X114, Tween 20, Tween 80, MEGA 9 (nonanoilmetilglucamina), octilglucósido, LDAO (óxido de dodecildimetilamina) o NP40, o

ES 2 270 582 T3

- mezclas de tensioactivos tales como una mezcla de un agente tensioactivo iónico y un agente tensioactivo no iónico, una mezcla de dos agentes tensioactivos iónicos o una mezcla de un agente tensioactivo iónico y de un agente tensioactivo dipolar.

5 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la temperatura empleada en la etapa (1) está comprendida entre la temperatura ambiente y 50°C, preferiblemente a 37°C.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque en la etapa (1) la cantidad de agente tensioactivo presente en el tampón A está comprendida preferiblemente entre un cuarto y una vez
10 y media el peso de la muestra biológica.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la etapa (1) consta de la incubación de la muestra biológica con una proteasa de forma previa, posterior o simultánea a la incubación de dicha muestra biológica con el tampón A.

15 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque el tampón B se selecciona del grupo constituido por alcoholes C3-C6 y mezclas de alcoholes cuya constante dieléctrica teórica media está comprendida entre 10 y 25.

20 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque se prefieren los alcoholes o mezclas de alcoholes siguientes: 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, isopropanol, isopropanol + pentanol, etanol + hexanol, butanol + pentanol.

25 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la centrifugación de la etapa (3) y de la etapa (5) se realiza durante 2 a 10 minutos a una velocidad inferior a 20.000 g, preferiblemente a una velocidad comprendida entre 3.500 y 17.500 g.

30 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque el tampón C comprende como agente caotrópico un agente que se selecciona del grupo constituido por urea y guanidina o una mezcla de éstas.

35 13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la etapa de solubilización (etapa (4)) del procedimiento según la reivindicación 1 o etapa (7) del procedimiento según la reivindicación 2) en dicho tampón C comprende el calentamiento a una temperatura igual o superior a 80°C durante 5 a 10 minutos, seguido de una centrifugación.

14. Procedimiento de detección de PrPres en una muestra biológica, **caracterizado** porque comprende:

- el tratamiento de dicha muestra biológica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y
40
- la detección de PrPres mediante cualquier procedimiento analítico apropiado.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque comprende una etapa de dilución de la muestra biológica.

45 16. Kit de tratamiento de una muestra biológica con vistas a la purificación de PrPres a partir de dicha muestra, **caracterizado** porque comprende, además de un tampón neutro en una cantidad que permita la homogeneización de dicha muestra biológica:

- un tampón A que comprende al menos un agente tensioactivo en una cantidad comprendida entre un cuarto y cuatro veces el peso de la muestra biológica,
50
- un tampón B constituido por un disolvente o una mezcla de disolventes, que no solubiliza la PrPres y presenta una constante dieléctrica comprendida entre 10 y 25, en una cantidad adecuada para aclarar una suspensión obtenida por la incubación de la muestra biológica en el tampón A;
55
- un tampón C que comprende al menos un agente tensioactivo del mismo tipo que el del tampón A, a una concentración comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,25% y 1%, con relación al volumen del tampón C (p/v) y/o al menos un agente caotrópico a una concentración comprendida entre 0,1 M y 8 M, en una cantidad suficiente para permitir la solubilización de la PrPres.
60

17. Kit de detección de PrPres, **caracterizado** porque comprende:

- un tampón neutro en una cantidad que permite la homogeneización de la muestra biológica en la que la PrPres debe detectarse,
65

ES 2 270 582 T3

- un tampón A que comprende al menos un agente tensioactivo en una cantidad comprendida entre un cuarto y cuatro veces el peso de la muestra biológica,
- un tampón B constituido por un disolvente o una mezcla de disolventes que no solubiliza la PrPres y presenta una constante dieléctrica comprendida entre 10 y 25, en una cantidad adecuada para aclarar una suspensión obtenida por la incubación de la muestra biológica en el tampón A;
- un tampón C que comprende al menos un agente tensioactivo del mismo tipo que el del tampón A, a una concentración comprendida entre 0,1% y 5%, preferiblemente comprendida entre 0,25% y 1%, con relación al volumen de tampón C (p/v) y/o al menos un agente caotrópico a una concentración comprendida entre 0,1 M y 8 M, en una cantidad suficiente para permitir la solubilización de la PrPres.
- al menos un anticuerpo anti-PrPres que permite la detección de PrPres.

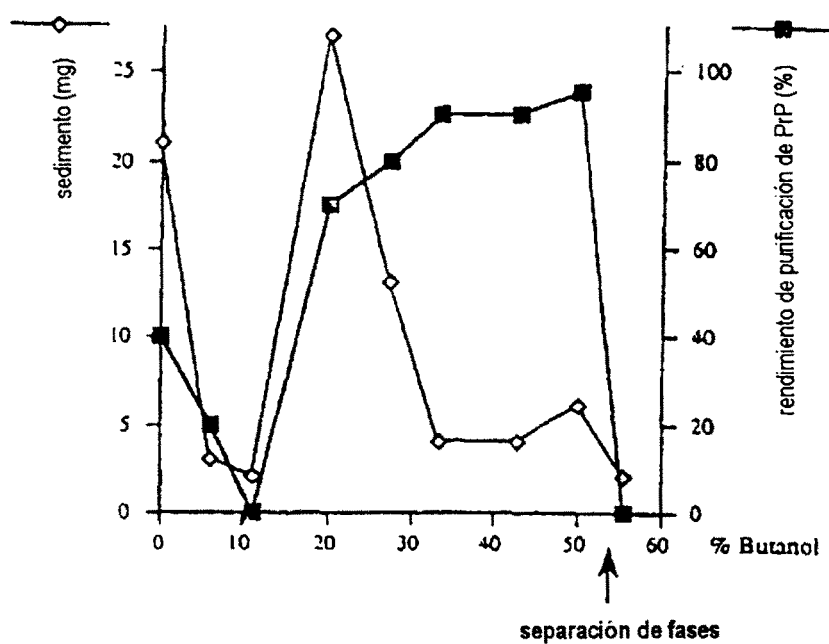


FIGURA 1

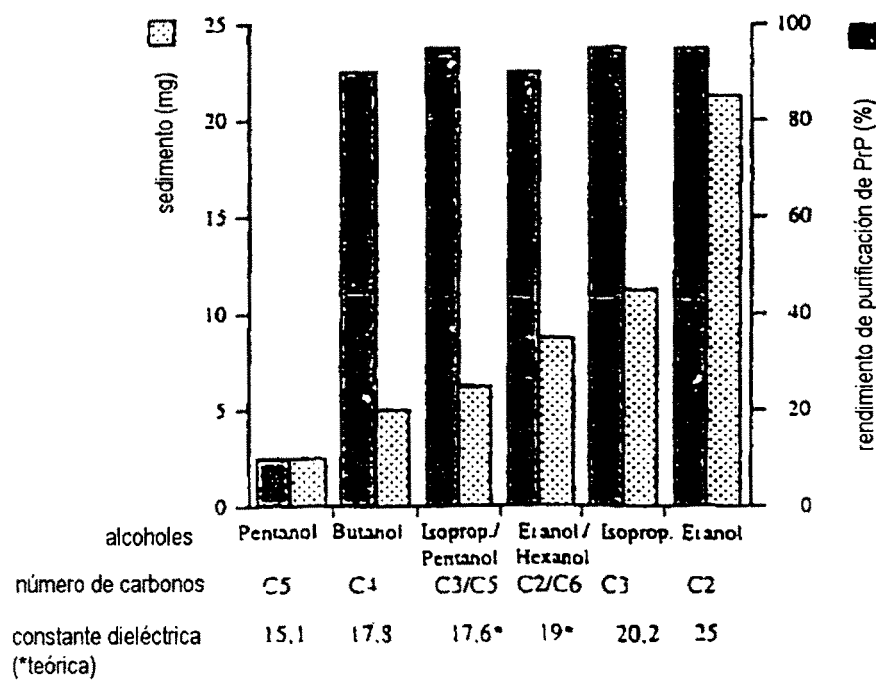


FIGURA 2

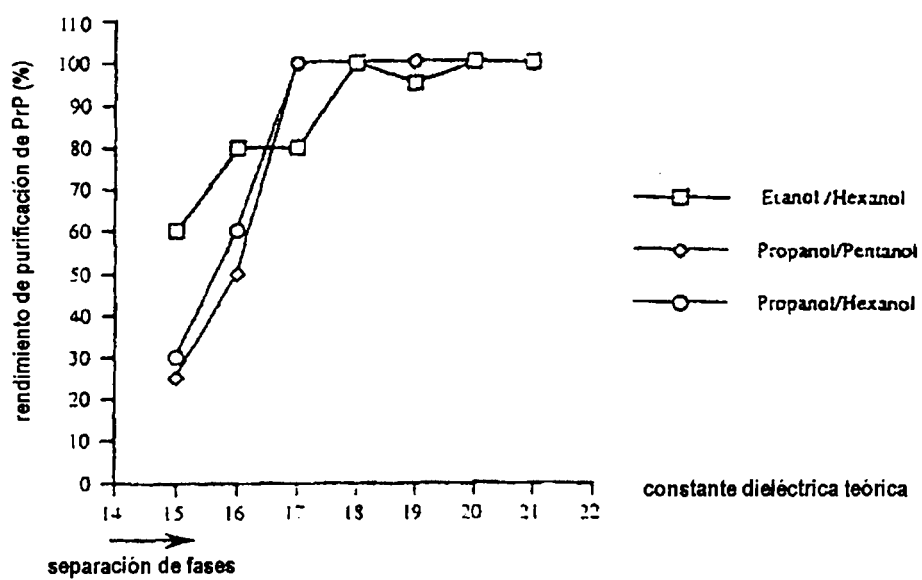


FIGURA 3A

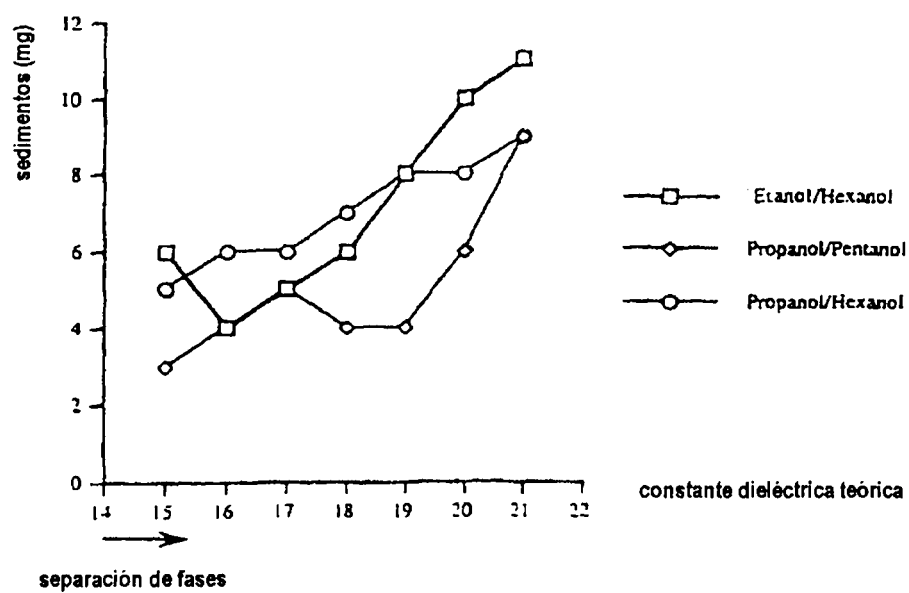


FIGURA 3B

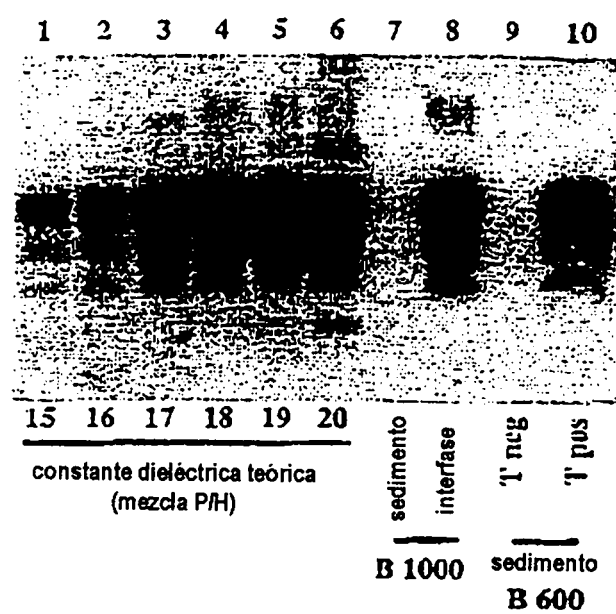


FIGURA 4

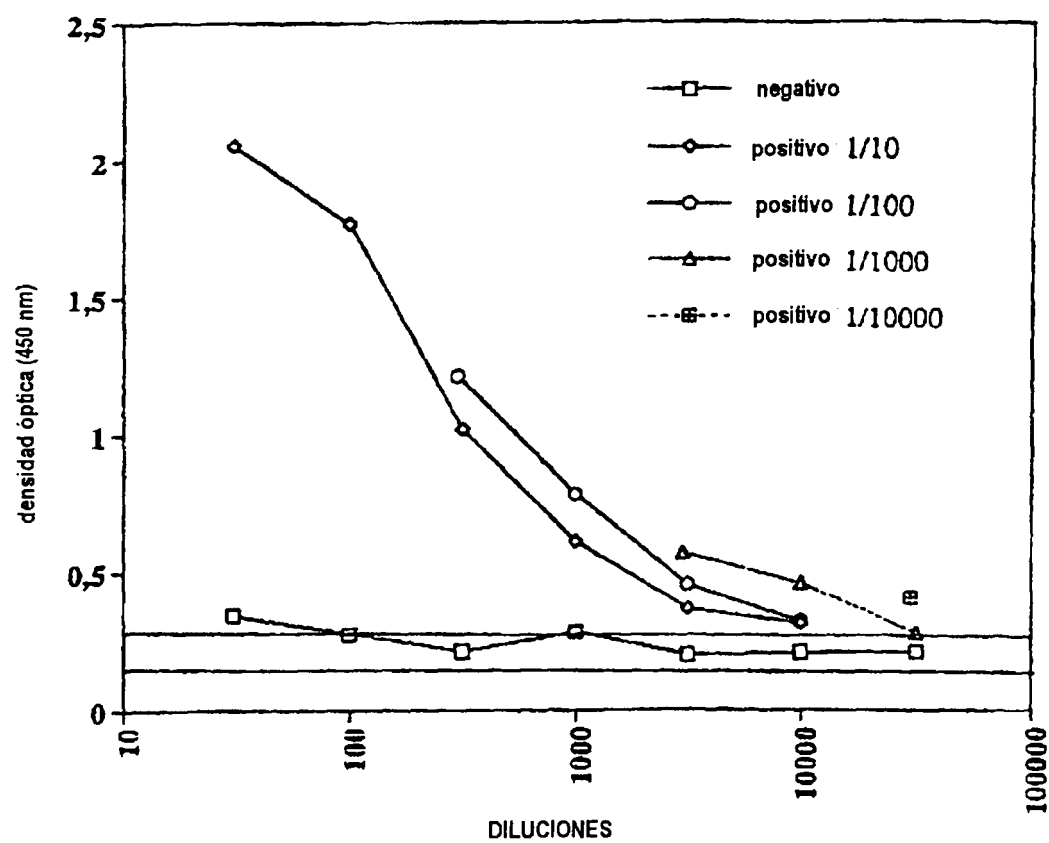


FIGURA 5

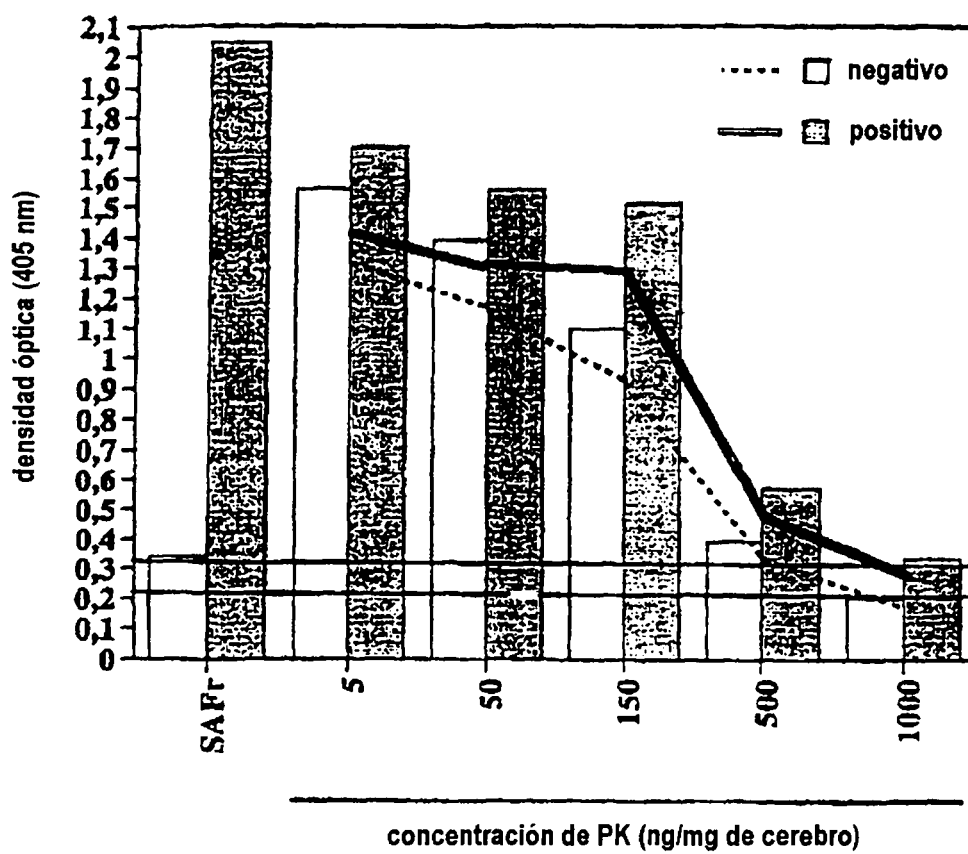


FIGURA 6

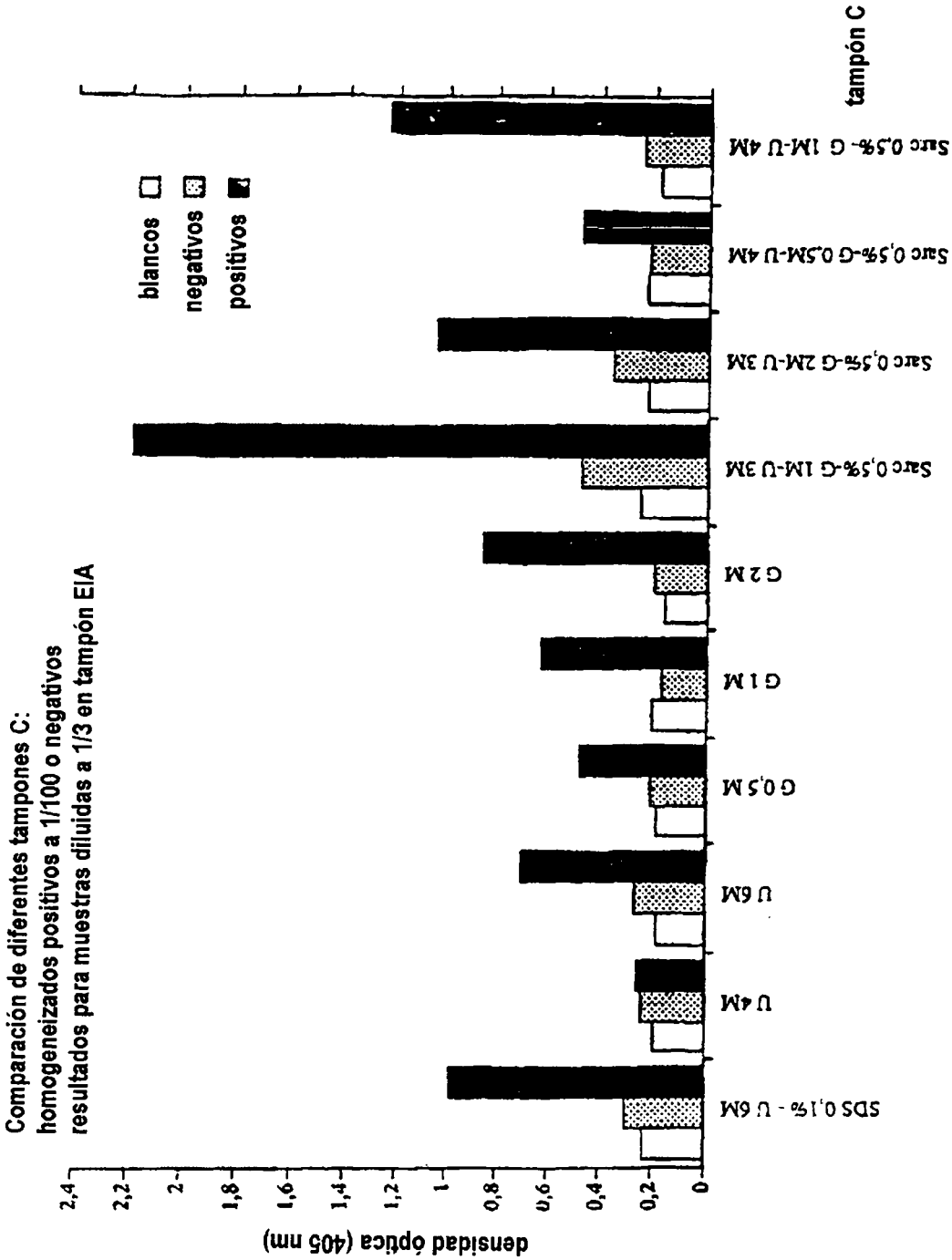


FIGURA 7