

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

(21) **PI0711096-0 A2**

(22) Data de Depósito: 30/04/2007  
(43) Data da Publicação: 23/08/2011  
(RPI 2120)



(51) *Int.Cl.:*  
G01N 33/68 2006.01

(54) Título: **IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PRION NO LEITE**

(30) Prioridade Unionista: 02/05/2006 EP 06 009023.0

(73) Titular(es): Alicon AG

(72) Inventor(es): Ahmed El Gedaily, Nicola Franscini, Ralph Zahn

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007003800 de 30/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/128450 de 15/11/2007

(57) Resumo: IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PRION NO LEITE. A presente invenção refere-se ao uso de leite ou um derivado do mesmo para identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , em um mamífero. A presente invenção também é dirigida a um método para a identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , em mamíferos, compreendendo a etapa de contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo afinidade e seletividade elevadas por proteínas de prion, de preferência por proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Além disso, um outro aspecto da presente invenção se refere a um método para remoção de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , do leite ou um derivado de leite, em que o leite ou um derivado do mesmo é contatado com sepharose, de preferência sepharose compreendendo íons de metal divalente imobilizados.



PI0711096-0

PI-0711096-0

## Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PRION NO LEITE".

A presente invenção refere-se ao uso de leite ou um derivado do mesmo para identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>, em um mamífero. A presente invenção é também dirigida a um método para identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>, em mamíferos, compreendendo a etapa de contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo alta afinidade e seletividade por proteínas de prion, de preferência por proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>. Além disso, um outro aspecto da presente invenção se refere a um método para remoção de proteínas de prion PrP<sup>C</sup> e/ou PrP<sup>Sc</sup>, de preferência proteína de prion PrP<sup>Sc</sup>, de leite ou um derivado de leite, em que leite ou um derivado do mesmo é contatado com sepharose, de preferência sepharose compreendendo íons de metal divalente imobilizados.

### 15 Antecedentes da Invenção

A proteína de prion nativa, referida como "PrP<sup>C</sup>" para proteína de prion celular, está amplamente distribuída por toda a natureza e é proteína bem conservada em mamíferos. Acredita-se que a conversão da proteína PrP<sup>C</sup> nativa em proteína infecciosa, referida como "PrP<sup>Sc</sup>" para proteína prion de paraplexia enzoótica ou como "PrP<sup>res</sup>" para proteína de prion resistente à proteinase K, leve à propagação de várias doenças. Exemplos de doenças prion-associadas incluem, por exemplo, doença de kuru e Creutzfeldt-Jakob (CJD) em seres humanos, paraplexia enzoótica em ovelha, encefalopatia espongiforme bovina (BSE) em gado, encefalopatia transmissível de marta e tuberculose em cervos e alces.

A BSE é uma forma de doença da "vaca louca" e é transmissível para uma ampla variedade de outros mamíferos, incluindo seres humanos. A forma humana de BSE é referida como nova variante de doença de Creutzfeldt-Jakob ou vCJD. Estima-se que 40 milhões de pessoas no Reino Unido tenham ingerido carne contaminada com BSE durante metade até o final da década de 1980. Em virtude do fato de que o período de incubação para a doença oralmente transmitida pode ser de 20-30 anos, a verdadeira exten

são dessa doença pode não se tornar evidente até após 2010.

Além da ingestão de carne infectada, há um potencial para transmissão de doenças prion-associadas entre seres humanos através de transfusão de sangue. Uma vez que existem agora (duas) indicações diretas de transmissão de prion através de transfusões de sangue, há uma preocupação crescente sobre a segurança de produtos de sangue. Também, já foi mostrado que os prions infectados estão presentes em linfócitos e também há evidência indicando que prions estão presentes no plasma, além de serem célula-associados. Além disso, animais podem se tornar infectados com doenças prion-associadas pastando sobre solo contaminado com prion ou ingerindo feno que contém ácaros de feno infectados com prion.

Atualmente, proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> são identificadas no sistema nervoso central, sangue e tecido linfático, em particular no baço, tonsilas, placas de Peyer e nódulos linfáticos de hospedeiros infectados. Estados inflamatórios crônicos são acompanhados por extravasamento local de células B e outras células inflamatórias, as quais pode induzir à maturação linfotóxica-dependente de FDCs ectópicas (células dendríticas foliculares). Conseqüentemente, a infecção paraplexia enzoótica de camundongos sofrendo de nefrite, hepatite ou pancreatite induz a depósitos inesperados de prion nos locais de inflamação (Helkenwalder e outros, Science 307, 1107-1110, 2005). Ligios e outros, (Nature Medicine, Vol. 11, Nº 11, Novembro de 2005, páginas 1137-1138) mostraram um fenômeno análogo em animais de fazenda. Eles demonstraram a presença de proteínas de prion em glândulas inflamatórias de ovelhas afetadas com mastite e paraplexia enzoótica ao mesmo tempo, um local onde o sangue e células linfocíticas são recrutadas após eventos associados à inflamação.

Em resumo, proteínas de prion são encontradas em animais saudáveis no sistema nervoso central, sangue e tecido linfóide, em particular no baço, tonsilas, placas de Peyer e nódulos linfáticos e também em hospedeiros infectados com TSE (encefalopatia espongiforme transmissível) em locais de inflamação, por exemplo, nefrite, hepatite, pancreatite, mastite, após recrutamento de sangue e células linfocíticas. Conseqüentemente, os

presentes métodos para detecção de proteínas de prion requerem ações invasivas para obter material de amostra.

O leite contribui com 13% do suprimento mundial de proteína para seres humanos. A produção mundial de leite oscila em torno de 500 milhões de toneladas por ano. Em média, uma "vaca marrom Swiss" produz 6.500 litros de leite por ano (associação de criadores de Swiss "Braunvieh", Zug, Suíça). Antes que o leite fresco chegue ao consumidor, ele é usualmente homogeneizado e aquecido. O procedimento de homogeneização envolve redução do tamanho de partícula de gordura de forma a aumentar a tolerância do consumidor. O aquecimento prolonga a vida útil e inativa patógenos existentes. Durante pasteurização, o leite é aquecido entre 72°C e 75°C durante não mais do que 30 segundos e imediatamente esfriado para 4°C. O leite pasteurizado é estável durante cerca de cinco dias e pode conter vitamina e aditivos flavorizantes. Leite UHT (aquecido em temperatura ultra-elevada) é aquecido entre 1 e 4 segundos em temperaturas entre 135°C e 150°C. Esse procedimento mata todos os patógenos convencionais e o leite é adaptado para consumo durante várias semanas ou meses, mas também contém uma quantidade reduzida de nutrientes.

Durante os últimos 10 anos, grupos científicos, agências de avaliação de risco e organizações de saúde pública (EC. Scientific Veterinary Committee, Report on the risk analysis for colostrum, milk and milk products (documento Nº VI/8197/96 Versão J, Final, 1997); EC. Multidisciplinary Scientific Committee, Opinion on the possible risk related to the use of colostrums, milk and products (1997) têm debatido o risco TSE-associado ao leite e produtos de leite. Dados epidemiológicos e de bioensaio disponíveis até o momento não fornecem evidência de que o leite abriga quaisquer proteínas de prion. Portanto, conclui-se que é improvável que o leite apresente qualquer risco de contaminação por TSE, contanto que ele se origine de animais saudáveis.

É um objetivo da presente invenção identificar proteínas de prion, em particular proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>, sem ter de aplicar métodos invasivos para obtenção de material de amostra. É ainda um outro objetivo iden-

tificar proteínas de prion, em particular proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>, de animais de outro modo saudáveis, isto é, animais que não sofrem de condições inflamatórias próximas da TSE (encefalopatia espongiforme transmissível). Outro objetivo da invenção se refere à remoção de proteínas de prion do leite ou derivados de leite.

### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Surpreendentemente, descobriu-se que o leite e mesmo produtos de leite processados de mamíferos contêm proteínas de prion, isto é, proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou proteínas de prion PrP<sup>C</sup>.

Isso altamente inesperado para aqueles na técnica porque as proteínas PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup> tinham sido detectadas, até o momento, apenas em células fixadas ou da fração celular do sangue. Sua presença em fluidos corporais é marginal na melhor das hipóteses. Além disso, o número de células normalmente contidas no leite está abaixo de 100000 por ml e, assim, extremamente baixo. Além disso, o leite contém uma quantidade relativamente alta de lipídios (35 mg/ml), o que é conhecido por tornar a análise de proteína através de métodos bioquímicos comuns exigente.

Para produzir um litro de leite, cerca de 400 a 500 litros de sangue devem passar através da teta da vaca. Embora não se deseje estar preso a qualquer teoria, parece, assim, possível que proteínas de prion encontradas no leite derivem de sangue ou, alternativamente, tenham sido secretadas de células epiteliais glandulares. Tipos de células que foram identificados no leite de vacas saudáveis são principalmente macrófagos e outros leucócitos. Contudo, em ensaios abaixo, é demonstrado que a presença de células de proteínas de prions é completamente removida através de centrifugação (veja exemplo 1). Portanto, era improvável que as proteínas de prion recuperadas estivessem célula-associadas mas, antes, ligadas a outras proteínas ou lipídios, resultando em complexos moleculares estáveis. O fato de que o leite contém PrP<sup>C</sup> de comprimento total provavelmente compreendendo a âncora glicolipídica indica que proteínas de prion no leite eram originalmente célula-ligadas e não representam qualquer um dos produtos de truncamento amino-terminal de PrP<sup>C</sup> conhecidos como sendo liberados de

células normais sob condições fisiológicas (Laffont-Proust e outros, FEBS Lett. 579, 6333-6337 (2005); Zhao e outros, Virus Res. 115: 43-55, 2006).

Portanto, em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de leite ou um derivado do mesmo para identificação de proteínas de prion em um mamífero.

Os termos leite e derivado de leite se destinam a abranger leite natural, bem como todas as formas processadas de leite tais como, por exemplo, leite homogeneizado, leite pasteurizado, leite desnatado, leite UHT (tratado em temperatura ultra-elevada), manteiga, etc. e produtos de leite, tais como iogurte, queijo, etc. e mesmo produtos altamente processados contendo leite, tais como bolos, pudins, etc.

O termo "proteína de prion" se refere a qualquer proteína de prion PrP<sup>C</sup> que ocorre naturalmente e proteína de prion PrP<sup>Sc</sup> relacionada à TSE (encefalite espongiforme transmissível), bem como a seus derivados resultantes de processamento posterior fora do corpo, por exemplo, processamento da amostra de leite para fins de análise ou processamento de alimento da referida proteína. De preferência, o termo "derivado de proteína de prion" se refere a quaisquer fragmentos de proteínas de prion que compreendem pelo menos uma ou mais estruturas repetidas de prion, de preferência 2 a 5, mais preferivelmente 5 estruturas repetidas de prion, de preferência estruturas repetidas de prion que são um octapeptídeo, pseudo-octapeptídeo, hexapeptídeo ou pseudo-hexapeptídeo, mais preferivelmente um octapeptídeo tendo uma seqüência selecionada do grupo consistindo em PHGGGWGQ (humana), PHGGSWGQ (camundongo) e PHGGGWSQ (rato) ou um pseudo-octapeptídeo, hexapeptídeo ou pseudo-hexapeptídeo derivado das referidas seqüências. Estruturas repetidas exemplificativas são mostradas abaixo.

Ovelha: PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQ (4 repetições)

Gado: PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ-PHGGGGWGQ (5 repetições)

Um estudo recente mostrou que, em ovelhas naturalmente afe-

tadas por paraplexia enzoótica e mastite linfocítica ou linfofolicular, o acúmulo de PrP<sup>Sc</sup> estava presente adjacente aos dutos de leite (Ligios e outros, veja acima). Pelo menos em paraplexia enzoótica que ocorre naturalmente em ovelhas, a replicação de prion pode ocorrer após uma infecção com vírus linfotrópico na glândula mamária inflamada. Esse estudo não detectou PrP<sup>C</sup>, PrP<sup>Sc</sup> nem infectividade por prion no leite em si. Contudo, em virtude do fato de que, sob tais condições inflamatórias, o número total de células imunes aumenta no leite, é altamente provável que PrP<sup>Sc</sup> infecciosa chegue ao leite. Nesse contexto, o leite de animais afetados com mastite e TSE também é, provavelmente, responsável pela disseminação de paraplexia enzoótica das ovelhas para seus filhotes em rebanhos de ovelhas ou cabra não afetados. Além disso, o leite de ovelha e cabra provavelmente também contribui para um risco de exposição à TSE para seres humanos que consomem esses produtos.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere ao uso de leite ou um derivado do mesmo para a identificação de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> em um mamífero.

Deve ser notado que a identificação de proteínas de prion não requer que a fonte mamífera sofra de mastite ou qualquer outra doença inflamatória. Surpreendentemente, descobriu-se que proteínas de prion podem ser identificadas no leite ou um derivado do mesmo de mamíferos saudáveis ou mamíferos afetados com TSE apenas. Em uma modalidade preferida, o uso da presente invenção se refere ao uso de leite ou um derivado do mesmo para a identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion PrP<sup>C</sup>, em mamíferos saudáveis, mais preferivelmente proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> em mamíferos sem condições inflamatórias, mais preferivelmente sem mastite.

A presente invenção não está limitada à identificação de qualquer proteína de prion de mamífero em particular ou derivado da mesma.

Em uma modalidade preferida, o mamífero é selecionado do grupo consistindo em um ser humano, bovino, ovino, camundongo, hamster, cervo, cabra ou rato, de preferência bovino e ovino.

O uso de leite ou um derivado de leite de acordo com a presente invenção para identificação de proteínas de prion em um mamífero, em particular para a identificação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , não está limitado a qualquer método em particular para a identificação de proteínas de prion, na  
5 medida em que o método seja suficientemente seletivo para proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

Em um outro aspecto, a presente invenção é dirigida a um método para identificação de proteínas de prion em mamíferos, isto é, proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , compreendendo a etapa de  
10 contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo afinidade e seletividade suficientes pelas referidas proteínas de prion.

Agentes adequados são conhecidos e estão comercialmente disponíveis para aqueles habilitados na técnica. Tipicamente, esses agentes são anticorpos policlonais ou monoclonais ou derivados padrão dos mes-  
15 mos. Anticorpos adequados são fornecidos nos exemplos em anexo. Contudo, agentes adequados para a prática da presente invenção também incluem proteínas de ligação de domínios de não-imunoglobulina. Tais proteínas de ligação são revistas em Binz e outros, Nature Biotechnology, Vol. 23, Nº 10, Outubro de 2005, páginas 1257-1268.

Conseqüentemente e em uma modalidade preferida, o referido agente tendo alta afinidade e seletividade pelas proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou  $\text{PrP}^{\text{C}}$  é selecionado do grupo consistindo em anticorpos policlonais ou monoclonais ou derivados dos mesmos e/ou proteínas de ligação de domínios de não-imunoglobulina.

Em um método preferido de acordo com a invenção, o método se refere à identificação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  em um mamífero e o referido agente tem alta afinidade e seletividade por proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

Para a prática do método, o referido mamífero é, de preferência, selecionado do grupo consistindo em um ser humano, bovino, ovino, camundongo, hamster, cervo, cabra ou rato.

Em virtude do fato de que a quantidade de proteínas de prion no

leite ou um derivado de leite é muito pequena, pode ser vantajoso, em alguns casos, pré-tratar o leite ou derivado de forma a enriquecer, isto é, concentrar e/ou purificar as proteínas de prion.

5 Em uma modalidade preferida, o método de acordo com a invenção compreende as etapas de:

(i) concentração e/ou purificação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  do leite ou um derivado do mesmo,

10 (ii) contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo alta afinidade e seletividade por proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

O termo "concentração e/ou purificação", conforme usado aqui, se destina a indicar que a concentração de proteínas de prion é elevada e/ou proteínas de não-prion e/ou material(is) não proteínáceos são removidos.

15 Deve ser notado que a tecnologia em particular e métodos discutidos abaixo baseados em sepharose não ligada, bem como ligante-modificada referentes à concentração e/ou purificação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , à separação e/ou enriquecimento de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  a partir de proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e à remoção de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e/ou  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  é um assunto em questão dos pedidos de patente  
20 internacional co-pendentes do Requerente EP/2005/011565 depositado em 28/10/2005 e PCT/EP2006/010272 depositado em 25/10/2006. Para a prática dos métodos da presente invenção, esses métodos em particular representam modalidades preferidas. Outros métodos de concentração/purificação, separação e remoção adequados podem ser empregados  
25 também para a prática do método da presente invenção. Contudo, os métodos identificados abaixo são considerados como o melhor modo para a prática o assunto em questão da invenção.

Surpreendentemente, descobriu-se que a sepharose em si (isto é, como tal, nua, com ligantes inativados, removidos, expostos) tem uma  
30 afinidade de ligação elevada e específica por proteínas  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou derivados funcionais das mesmas. Portanto, a ligação de sepharose a proteínas  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou derivados funcionais da mesma é suficiente para sua concentração

e/ou purificação. É necessário, meramente, remover as proteínas de não-prion não ligadas da referida sepharose.

Portanto, em um método preferido de acordo com a invenção, a etapa (i) compreende as seguintes etapas:

5 a) contato de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  de leite ou um derivado do mesmo com sepharose sob condições que permitem a ligação, de preferência específica e em alta afinidade, da referida sepharose às referidas proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  (de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  apenas);

10 b) remoção das proteínas de não-prion não ligadas da referida sepharose, em que a sepharose não é, de preferência, uma sepharose de quelação de  $\text{Cu}^{2+}$ .

15 Se a sepharose está não ligada, ela se ligará à proteínas  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  apenas, deixando proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  não ligadas. Surpreendentemente, a sepharose para uso no método preferido da presente invenção não está limitada a qualquer tipo em particular de sepharose, exceto que o núcleo de sepharose deverá estar suficientemente acessível às proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou derivados funcionais das mesmas para ligação.

20 É preferido que, na etapa a), a sepharose se ligue com afinidade específica e elevada às proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  apenas e não a proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , em particular quando detecção de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  apenas é desejada.

25 O termo "ligação com afinidade específica e elevada de sepharose ao prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ", conforme usado aqui, se destina a indicar que a sepharose como tal (isto é, o núcleo de sepharose, mas não quaisquer ligantes sobre o mesmo) se liga especificamente à  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , mas não à  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . De preferência, ligação específica de sepharose, no contexto da invenção, significa a ligação de sepharose como tal a multímeros de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , mas não à  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . O  
30 termo ligação com alta afinidade, a esse respeito, se destina a se referir a uma afinidade de ligação referente a uma constante de dissociação de  $10^{-6}$  a  $10^{-12}$  M ou menor, de preferência  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  M ou menor. Aqueles habilita-

dos podem determinar facilmente uma afinidade de ligação específica e elevada de uma determinada sepharose pelo prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  através de ensaios de ligação de rotina e simples. Por exemplo, um de tais ensaios compreenderia as seguintes etapas:

- 5 a) fornecimento da sepharose a ser ensaiada e remoção, inativação e/ou exposição de quaisquer ligante sobre o núcleo da referida sepharose se presentes,
- b) diluição da  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  usada para uma concentração que evitará remoção não específica, por exemplo, precipitação, ligação não específica,  
10 etc.,
- c) incubação da sepharose de a) e  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  de b) em um tampão adequado sob condições e durante um tempo que permitirão a ligação uma da outra,
- d) uma ou mais etapas de lavagem, de preferência em 3 a 10  
15 volumes de tampão de incubação, para lavagem de qualquer proteína não ligada da sepharose,
- e) opcionalmente, lavagem com um excesso, de preferência um excesso de 1000 vezes, de proteína de ligação não específica, de preferência BSA (albumina de soro bovino), de forma a remover ou bloquear quaisquer  
20 sítios de ligação não específica sobre a sepharose,
- f) uma etapa de eluição com um tampão compreendendo um agente caotrópico, de preferência uréia e/ou cloreto de guanidínio e/ou SDS, de forma a remover a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sepharose-ligada,
- g) detecção da  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  no tampão eluído e, desse modo, demonstrando a ligação em alta afinidade da sepharose à  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  como tal.  
25

Para determinação da especificidade da sepharose ensaiada, o ensaio acima é repetido, exceto que  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ao invés de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  é incubada na etapa c) e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  é detectada na solução de lavagem, desse modo, indicando a falta de ligação. Alternativamente,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  podem ser incubadas simultaneamente com a sepharose na etapa c) e uma sepharose com afinidade  
30 de específica e elevada resultará em detecção de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  na solução de lavagem e  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  no tampão de eluição caotrópico apenas.

Em resumo, o termo "ligação com afinidade específica e elevada de sepharose a proteínas PrP<sup>Sc</sup>" se destina a distinguir sepharoses e métodos de uso dessas sepharoses e os referidos métodos que meramente se ligam à PrP<sup>Sc</sup> não especificamente e com baixa afinidade, por exemplo, através de precipitação e/ou baixa adsorção.

Os termos "concentração e/ou purificação", conforme usado aqui, se destinam a indicar que a concentração de proteínas PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas é elevada e/ou proteínas de não-PrP<sup>Sc</sup> e/ou material(is) não proteináceos são removidos.

De preferência, a sepharose é selecionada de sepharoses não ligadas, de preferência selecionadas do grupo consistindo em Sepharose 2B<sup>®</sup>, 4B<sup>®</sup>, 6B<sup>®</sup>, Sepharose CL-4B<sup>®</sup>, Sepharose-6B<sup>®</sup>, Superdex 75<sup>®</sup>, Sephacryl 100HR<sup>®</sup> e Sephadex G10<sup>®</sup>.

Opcionalmente, outros ligantes presentes sobre a sepharose podem ser vantajosos, por exemplo, quando se deseja ligar PrP<sup>C</sup> também ou quando se deseja intensificar a ligação da sepharose à PrP<sup>Sc</sup> e/ou PrP<sup>C</sup>.

Em uma modalidade mais preferida, a sepharose é selecionada de sepharoses ligante-modificadas, de preferência aquelas selecionadas do grupo consistindo em sepharoses de quelação de metal, agaroses de lectina, sepharose iminodiacética, agarose de proteína A, sepharose de estreptavidina, sepharose de sulfopropila e sepharose de carboximetila.

Para a prática dos métodos preferidos da presente invenção, é necessário que os ligantes opcionais não expõem o núcleo de sepharose, de modo que proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas tenham acesso livre. Esse é o problema com muitas sepharoses ligante-modificadas empregadas na técnica anterior. Aqueles habilitados podem selecionar rotineiramente sepharoses ligante-modificadas que são suficientemente acessíveis para ligação de PrP<sup>Sc</sup> simplesmente testando a afinidade de ligação da sepharose a proteínas PrP<sup>Sc</sup> e, se desejado, projetando sepharoses ligante-modificadas apropriadas, por exemplo, empregando moléculas espaçadoras que posicionam o ligante em uma distância apropriada para que a sepharose não seja exposta pelo ligante.

Quando de identificação de proteínas de prion, pode também ser desejado ou vantajoso separar e/ou enriquecer proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> de proteínas PrP<sup>C</sup>.

5 Outra vantagem inesperada do método preferido da presente invenção é que a ligação de sepharose a proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> é altamente seletiva com relação à proteínas de prion PrP<sup>C</sup> as quais não têm qualquer afinidade de ligação significativa pela sepharose em si.

Quando sepharoses ligante-modificadas são usadas, em que a parte do ligante se liga à proteínas de prion PrP<sup>C</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas, o método da presente invenção permite a concentração e/ou purificação simultâneas de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup>. As proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup> podem, então, ser separadas através de remoção seletiva de proteínas PrP<sup>C</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas da sepharose.

15 Conseqüentemente, em uma modalidade mais preferida, o método da invenção compreende, adicionalmente, a etapa de separação e/ou enriquecimento de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> a partir de proteínas PrP<sup>C</sup>.

A etapa de separação e/ou enriquecimento de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> a partir de proteínas PrP<sup>C</sup> compreende, de preferência, as seguintes etapas adicionais:

20 a) contanto de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e proteínas PrP<sup>C</sup> de leite ou um derivado funcional do mesmo com sepharose ligante-modificada sob condições que permitem:

(i) a ligação da referida parte de sepharose às referidas proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e

25 (ii) a ligação da referida parte de ligante da sepharose a proteínas PrP<sup>C</sup>,

b) opcionalmente, remoção do material não ligado da referida sepharose ligante-modificada,

30 c) opcionalmente, aguardar um período de tempo suficiente para que algumas ou a maioria das proteínas PrP<sup>C</sup> ligante-ligadas e/ou derivados funcionais das mesmas se convertam em proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados funcionais em proximidade íntima com as proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>

e/ou derivados funcionais das mesmas,

d) adição de uma agente de liberação seletivo às proteínas sepharose-ligadas e/ou derivados funcionais das mesmas da etapa a), b) ou c) sob condições que permitem a liberação de proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e opcionalmente proteínas de não-prion da parte do ligante da sepharose, mas não a liberação das proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou derivados funcionais das mesmas da parte de sepharose e

e) remoção de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e opcionalmente proteínas de não-prion da sepharose.

10 Quando proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  estavam presentes sobre a sepharose ligante-modificada, inesperadamente, descobriu-se que a quantidade de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  é elevada, em muitos casos, às custas de  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Acredita-se que proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  são convertidas através de uma alteração conformacional espontânea na proximidade íntima da  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  que tem alteração semelhante à chaperona. Essa descoberta está em concordância com a compreensão de que a presença de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  é requerida para "produção" de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  a partir de precursores de  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

Além disso, é preferido que o método acima ainda compreenda a etapa de:

20 f) liberação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou derivados das mesmas da sepharose.

Para liberação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou derivados da mesma da sepharose, é preferido adicionar agentes caotrópicos e/ou detergentes, de preferência uréia e/ou cloreto de guanidínio e/ou SDS, mais preferivelmente adicionar uréia e/ou SDS, mais preferivelmente adicionar um tampão de carregamento de gel compreendendo uréia a 8 M e SDS a 5% e aplicar um campo elétrico. Naturalmente, qualquer outro método não destrutivo rotineiramente aplicado para interrupção de afinidade de enzimas por polímeros, de preferência polímeros derivados de açúcar, também pode ser empregado.

Sepharoses de quelação de metal, bem como sepharoses negativamente carregadas, tais como sepharose de sulfopropila e sepharose de

carboximetila, podem se ligar a proteínas  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , bem como  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , em virtude da ligação da parte de sepharose e opcionalmente da parte de ligante de metal e/ou negativamente carregado da sepharose à  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e da parte de ligante de metal e/ou negativamente carregada da sepharose à  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

5 O mecanismo que fundamenta o método de separação preferido da presente invenção conta com as diferentes propriedades de ligação de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  com relação a íons de metal sepharose-imobilizados. Enquanto a  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  parece ter uma afinidade intrínseca pela sepharose, íons de metal divalentes e cargas negativas, a  $\text{PrP}^{\text{C}}$  parece ter uma afinidade intrínseca  
10 por íons de metal divalente e cargas negativas apenas. Conseqüentemente, suas diferentes afinidades pela sepharose podem ser empregadas para separação das mesmas.

De preferência, os íons de metal da sepharose de quelação de metal são selecionados do grupo consistindo em  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$   
15 e  $\text{Mn}^{2+}$ .

A ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  é mais fraca e ambos os íons se ligam apenas a monômeros de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

Os outros íons de metal mencionados,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , se ligam mais fortemente a monômeros e oligômeros de  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e são  
20 preferidos por essa razão. Em virtude de suas excelentes propriedades de ligação e em virtude de sua falta de toxicidade sob condições fisiológicas *in vivo*,  $\text{Zn}^{2+}$  é mais preferido para a sepharose de quelação de metal para a prática dos métodos preferidos da presente invenção.

Incidentalmente, Cu-sepharose não reterá proteínas  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  eficientemente. Conforme demonstrado no exemplo um do pedido de patente co-  
25 pendente acima mencionado, a recarga de Ni-High Performance Sepharose com  $\text{Cu}^{2+}$  resulta em ligação não específica de grandes quantidades de BSA e, portanto, não é adequada para o enriquecimento de proteínas de prion em soluções de proteína complexas. Portanto, geralmente é preferido, para to-  
30 dos os métodos da invenção, que a sepharose não seja uma sepharose de quelação de metal de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Para enriquecimento, isto é, concentração e/ou purificação de

proteínas de prion ou separação e/ou enriquecimento de proteínas PrP<sup>Sc</sup> a partir de proteínas PrP<sup>C</sup>, a sepharose de quelação de metal é, de preferência, Ni-Sepharose, mais preferivelmente Ni Sepharose<sup>®</sup> High Performance (número de código 17-5268-01, 25 ml, 17-5268-02, 100 ml) da Ge Healthcare (Amersham Biosciences Europe GmbH, Industrienstrasse 30, CH-8112 Otelfingen) ou HisTrap HP Column da mesma companhia (número de código dependente do volume 17-5247-01, 17-5247-05, 17-5248-01, 17-5248-02, 17-5248-05 ou 17-5249-01).

Quando uma sepharose de quelação de metal é empregada para a prática de um método preferido da presente invenção, o agente de liberação seletivo é, de preferência, um agente de quelação de metal, de preferência um agente selecionado de EDTA e/ou EGTA, mais preferivelmente EDTA.

Para separação de proteínas PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas de uma sepharose de quelação de metal em um método preferido da invenção, é mais preferido que o metal seja Ni<sup>2+</sup> ou Zn<sup>2+</sup> e o agente de quelação de metal seja EDTA.

Também, é preferido que as condições na etapa d) do método preferido da presente invenção para separação de proteínas PrP<sup>Sc</sup> e PrP<sup>C</sup> que permite a liberação de PrP<sup>C</sup> e opcionalmente proteínas de não-prion dos íons de metal sepharose-imobilizados compreendam a presença de um agente de quelação de metal em uma concentração de 10 a 100 mM, mais preferivelmente 20 a 80 mM, ainda mais preferivelmente EDTA em uma concentração de 40 a 80 mM.

Também, descobriu-se que a adição de pequenas quantidades de queladores, tais como EDTA e/ou EGTA, às frações de proteína complexa no leite ou derivados de leite pode ajudar a evitar ligação não específica e, portanto, ajuda na separação de material não específico de proteínas PrP<sup>Sc</sup> e/ou PrP<sup>C</sup>. Por exemplo, para alguns derivados, descobriu-se que EDTA a 20 a 40 mM reduziu a ligação não específica eficazmente. Quando trabalhando com íons de metal sepharose-imobilizados, deve-se tomar cuidado para que os efeitos de redução de ligação não específica e liberação de

PrP<sup>C</sup> por queladores não se sobreponha se a liberação de PrP<sup>C</sup> ainda não é desejada. Além disso, dependendo da presença e quantidades de proteínas de ligação não específicas, as faixas de concentração preferidas acima terão de ser adaptadas, isto é, aumentadas, para compensar a presença de proteí-  
 5 ínas não específicas que removem os queladores para liberação de PrP<sup>C</sup>. Tal otimização está dentro da rotina daqueles habilitados na técnica.

Embora a sepharose em si seja suficiente para ligar quantidades significativas de PrP<sup>C</sup> em si, se exposta, pode ser desejável empregar sepharoses com pelo menos um ligante adicional para ligação específica a proteí-  
 10 teínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou PrP<sup>C</sup>, em que o referido ligante é ligado direta ou indiretamente, por exemplo, por meio de uma molécula espaçadora, à sepharose.

Em uma modalidade preferida, o ligante adicional é selecionado do grupo consistindo em proteínas de prion, derivados funcionais de proteínas de prion, proteínas de prion His-marcado, proteínas de ligação a proteínas de prion, anticorpos de ligação a proteínas de prion e ligantes específicos para proteínas de prion.  
 15

Mais preferivelmente, o ligante adicional é uma proteína de prion e/ou um derivado funcional da mesma, por exemplo, um fragmento de prion tal como, por exemplo, PrP bovina (25-241), isto é, direta ou indiretamente  
 20 ligado, por exemplo, através de um quelador de metal, à sepharose.

A agregação reversível de proteínas de prion ou derivados das mesmas a uma ou mais estruturas de prion repetidas que oligomerizam com proteínas de prion em um pH de 6,2 a 7,8 e as quais podem se dissociar novamente em um pH de 4,5 a 5,5 proporciona meios altamente seletivos e  
 25 eficientes para ligação, concentração, purificação e/ou remoção de proteínas de prion e/ou derivados funcionais das mesmas (PCT/EP2004 003 060). Para a prática de um método preferido da presente invenção, estrutura(s) de prion repetida(s) pode(m) ser presa(s) à sepharose como ligantes adicionais  
 30 de forma a oligomerizar especificamente com proteínas de prion e, desse modo, se ligar às mesmas.

Em uma modalidade mais preferida, o ligante adicional é uma

proteína de prion e/ou um derivado funcional da mesma.

O ligante adicional sobre sepharoses para a prática dos métodos preferidos da presente invenção pode ser ligado à sepharose direta ou indiretamente e é, de preferência, ligado através de uma porção espaçadora entre a sepharose e o ligante em si.

Embora os métodos preferidos da presente invenção não estejam limitados a quaisquer proteínas de prion ou derivados das mesmas em particular como o ligante de sepharose, as proteínas de prion e/ou derivados funcionais das mesmas para a referida finalidade são selecionadas do grupo consistindo em proteínas de prion originárias de ser humano, bovino, ovino, cabra, camundongo, hamster, cervo ou rato e derivados das mesmas.

O termo "derivados funcionais de proteínas de prion", conforme ele é usado na descrição e nas reivindicações, se refere a quaisquer derivados de proteínas de prion, em particular fragmentos das mesmas, que compreendem pelo menos uma ou mais estruturas de prion repetidas, de preferência 2 a 5, mais preferivelmente 5 estruturas de prion repetidas.

Em uma modalidade preferida, o derivado funcional de uma proteína de prion para uso como um ligante de sepharose tem pelo menos uma estrutura de prion repetida que é um octapeptídeo, pseudo-octapeptídeo, hexapeptídeo ou pseudo-hexapeptídeo, mais preferivelmente um octapeptídeo tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em PHGGGWGQ (ser humano), PHGGSWGQ (camundongo) e PHGGGWSQ (rato) ou um pseudo-octapeptídeo derivado das referidas seqüências, de preferência selecionadas do grupo consistindo em PHGGGGWSQ (várias espécies) e PHGGGSNWGQ (marsupial) ou um hexapeptídeo tendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em PHNPGY (galinha), PHNPSY, PHNPGY (tartaruga) ou é um pseudo-hexapeptídeo derivado das referidas seqüências.

Em uma modalidade mais preferida, pelo menos uma, de preferência cada uma das estruturas repetidas de prion compreende uma conformação em loop N-terminal conectada a uma estrutura de  $\alpha$ -giro C-terminal.

Mais preferivelmente, os derivados funcionais para uso como

ligantes de sepharose são também capazes de agregação e/ou dissociação reversível, isto é, oligomerização em um pH de 6,2 a 7,8 e/ou dissociação do agregado oligomérico em um pH de 4,5 a 5,5 em um ambiente fluido aquoso.

5 Os derivados funcionais de proteínas de prion úteis como ligantes de sepharose para a prática dos métodos preferidos da presente invenção podem também ser caracterizados pelo fato de que eles se ligam à sepharose não exposta em um grau significativo. Um grau significativo significa que, de preferência, pelo menos 50, mais preferivelmente pelo menos 70,  
10 ainda mais preferivelmente pelo menos 80 e, ainda mais preferivelmente pelo menos 90% dos derivados se ligam à sepharose exposta com relação à proteína de prion que ocorre naturalmente a partir da qual o derivado é oriundo. Para determinação da extensão de ligação de sepharose a derivados de proteína de prion, a ligação à sepharose pode ser ensaiada usando, por  
15 exemplo, Sepharose® 4 B (Sigma, código de produto 4B-200). Os parâmetros para tal ensaio podem ser rotineiramente determinados por aqueles habilitados na técnica.

Conforme aqueles habilitados na técnica de proteínas de prion apreciarão, os derivados funcionais de proteínas de prion mencionados aqui  
20 podem ser rápida e suficientemente caracterizados pelo fato de que eles compreendem pelo menos uma das estruturas de prion repetidas acima e são capazes de ligação à sepharose não exposta. Para proteínas de prion bovinas ou derivados das mesmas, admite-se que a ligação de uma proteína de prion à sepharose seja realizada através do domínio 102-241, correspondendo aos resíduos de aminoácido 90 a 230 em PrP humana. Regiões análogas em proteínas de prion e derivados das mesmas de outras espécies  
25 têm atividade de ligação à sepharose similar.

Em uma modalidade preferida, o derivado funcional para uso como ligante de sepharose para a prática dos métodos preferidos da presente invenção é derivado de proteínas de prion através de uma ou mais deleções, substituições e/ou inserções de aminoácido(s) e/ou modificação(ões) covalente(s) de um ou mais aminoácidos.

Em uma modalidade mais preferida, o derivado funcional para uso como um ligante de sepharose compreende uma ou mais seqüências octapeptídicas repetidas, de preferência os aminoácidos 51-90 e/ou o domínio C-terminal, de preferência os aminoácidos 121-230 de PrP humana.

5 As condições para contato das proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> com sepharose sob condições que permitem a ligação da referida sepharose às referidas proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e, opcionalmente, a ligação da parte de ligante da sepharose ligante-modificada à proteínas PrP<sup>C</sup>, se sepharose li-  
 10 gante-modificada é empregada são, de preferência, condições fisiológicas, mais preferivelmente um pH de 5 a 8 e 2 a 39°C, ainda mais preferivelmente um pH de cerca de 7 e cerca de 20 a 25°C.

Outras condições para ligação de sepharose a proteínas de pri-  
 on são resistência iônica, substâncias tampão, etc. Aqueles habilitados na  
 técnica podem determinar rotineiramente as condições adequadas e otimi-  
 15 zadas para ligação de sepharose a proteínas de prion.

Se sepharoses com os ligantes adicionais mencionados acima para ligação a proteínas de prion através de agregação de proteína de prion são usadas, naturalmente, um pH de 6,2 a 7,8 é preferido.

Em outra modalidade preferida, as condições para contato de  
 20 sepharose e proteínas de prion compreendem a presença de pelo menos um detergente e/ou um tampão de lise de célula. Dessa forma, células e/ou fra-  
 ções de membrana presentes em uma amostra de interesse podem ser tra-  
 tadas através de um método de acordo com a presente invenção diretamen-  
 te sem quaisquer etapas pré-requeridas para liberação das proteínas de pri-  
 25 on ou derivados funcionais das mesmas e tornando as mesmas acessíveis.

Em um último aspecto, a presente invenção se refere a um mé-  
 todo para remoção de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou PrP<sup>C</sup> do leite ou um de-  
 rivado do leite, compreendendo a etapa de:

(a) contanto do leite ou um derivado do mesmo com sepharose sob  
 30 condições que permitem a ligação da referida sepharose às referidas proteí-  
 nas de prion.

Sepharoses adequadas para remoção são discutidas acima. Pa-

ra a remoção de proteínas de prion, sepharoses de quelação de metal são preferidas.

O termo remoção, conforme ele é usado no contexto da remoção de proteínas de prion, se refere a técnicas padrão para separação de proteínas e material de sepharose, tais como centrifugação, filtração, ultrafiltração, etc.

Os referidos íons de metal de sepharoses de quelação de metal adequadas são, de preferência, selecionados do grupo consistindo em  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , mais preferivelmente do grupo consistindo em  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , ainda mais preferivelmente  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ .

Em uma modalidade particularmente preferida, a sepharose de quelação de metal para remoção de proteína de prion é Ni Sepharose® High Performance (número de código 17-5268-01, 25 ml, 17-5268-02, 100 ml) da Ge Healthcare (Amersham Biosciences Europe GmbH, Industrienstrasse 30, CH-8112 Otelfingen) ou HisTrap HP Column da mesma companhia (número de código depende do volume 17-5247-01, 17-5247-05, 17-5248-01, 17-5248-02, 17-5248-05 ou 17-5249-01).

Para remoção de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  do leite ou um derivado de leite, cerca de 800  $\mu\text{l}$  de EDTA a 500 mM são, de preferência, adicionados a 10 ml de leite ou um derivado do mesmo antes da etapa (a).

Surpreendentemente, descobriu-se que proteínas de prion podem ser removidas de modo fácil e essencialmente completo do leite, produtos de leite comerciais ou outros derivados do leite. Aqueles habilitados podem agora analisar a presença de proteínas de prion, remover as mesmas se desejado e verificar o resultado da remoção do leite e derivados do mesmo.

Finalmente, deve ser notado que a tecnologia acima e métodos referentes à concentração e/ou purificação de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , a separação e/ou enriquecimento de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  a partir de proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e a remoção de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e  $\text{PrP}^{\text{C}}$  é o assunto em questão do pedido de patente internacional co-pendente ainda não publicado dos Requerentes EP/2005/011565, deposita-

do em 28/10/2005.

A seguir, o assunto em questão da invenção será descrito em maiores detalhes em exemplos/modalidades com referência às figuras. Nenhum desses deve ser considerado como limitando o escopo da invenção, conforme ela é apresentada na descrição e nas reivindicações em anexo.

### Figuras

A figura 1 mostra uma Western blot de proteína de prion PrP<sup>C</sup> após enriquecimento a partir de 10 ml de leite de vaca, ovelha, cabra e ser humano não infectado usando a matriz *PrioTrap*<sup>®</sup> de acordo com o exemplo 1.

A figura 2 mostra uma Western blot demonstrando a ligação específica de vários anticorpos monoclonais anti-PrP à PrP<sup>C</sup> do leite de acordo com o exemplo 2.

A figura 3 mostra uma Western blot demonstrando o efeito de tratamento com PNGase (N-glicosidase F) sobre a PrP<sup>C</sup> no leite e cérebro de acordo com o exemplo 3.

A figura 4 mostra uma Western blot demonstrando a remoção altamente seletiva de PrP<sup>C</sup> do leite e um gel corado com prata das mesmas amostras tratadas e não tratadas, não demonstrando efeito do tratamento de remoção sobre as proteínas do leite restantes de acordo com o exemplo 4.

A figura 5 mostra uma Western blot demonstrando a capacidade de ligação de *PrioTrap*<sup>®</sup> à PrP<sup>C</sup> após reforço do leite com homogenato de cérebro de acordo com o exemplo 5.

### Exemplos

#### Exemplo 1: Detecção de PrP<sup>C</sup> nativa no leite de seres humanos e animais

Um volume de 10 ml de leite (fresco ou UHT (tratamento em temperatura ultra-elevada padrão) ou pasteurizado) foi centrifugado a 3000 g durante 10 min para assegurar a remoção completa de células. O sobrenadante de leite pobre em gordura e isento de células foi incubado com 800 ml de solução de EDTA a 500 mM, pH de 7,4 e agitado durante 30 min na presença de 50 µl de matriz *PrioTrap*<sup>®</sup> (Ni Sepharose<sup>®</sup> High Performance (número de código 17-5268-01, 25 ml, 17-5268-02, 100 ml) da Ge Healthcare

(Amersham Biosciences Europe GmbH, Industrienstrasse 30, CH-8112 Oetlingen). A matriz foi lavada quatro vezes em RT com 10 ml de solução de lavagem contendo tampão de fosfato de sódio a 100 mM, Tris a 20 mM, imidazol a 10 mM, pH de 8. Para eluir as proteínas da matriz, 15  $\mu$ l de tampão de amostra (tampão de amostra XT, Biorad, Biorad Laboratoires Nenzlingerweg 2, 4153 Reinach, CH) foram adicionados e aquecidos durante 10 min a 70°C. O tampão de amostra contendo matriz foi carregado sobre um gel Criterion XT 12 % Precast (Biorad). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma modalidade de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences) através de uma transferência semi-seca, usando um sistema com três tampões (anodo 1: Tris a 300 mM, metanol a 20%, pH de 10,4; anodo 2: Tris a 25 mM, metanol a 20%, pH de 10,4; catodo: Tris a 25 mM, ácido aminohexanóico a 40 mM, SDS a 0,05%, pH de 9,4). As proteínas de prion foram detectadas através de Western blotting usando o anticorpo monoclonal PrP-mab 8B4 (Alicon AG; número de Produto A0001; Schlieren, Suíça; Li e outros, J. Mol. Biol. 301, 567-573, 2000)) em combinação com o ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences. Os marcadores de peso molecular são indicados do lado esquerdo. PrP bovina recombinante (aa 25-241) foi usada como um padrão. Os resultados são mostrados na figura 1, uma Western blot de PrP<sup>C</sup> após enriquecimento a partir de 10 ml de leite de vaca, ovelha, cabra e ser humano não infectado usando a matriz *PrioTrap*<sup>®</sup> (veja acima). Em leite de vaca, três isoformas de PrP<sup>C</sup> são observadas, com uma massa molecular evidente de cerca de 34 kD, 30 kD e 27 kD, correspondendo à PrP<sup>C</sup> diglicosilada, monoglicosilada e não glicosilada, respectivamente. Além disso, em alguns preparados, PrP<sup>C</sup> monoglicosilada aparece como uma banda dupla, indicando que os dois sítios de glicosilação podem estar ligados a diferentes carboidratos. A massa molecular evidente da PrP<sup>C</sup> não glicosilada é ligeiramente maior quando comparado com um padrão de PrP bovina recombinante (25-241) a 26 kD, indicando que a PrP<sup>C</sup> nativa no leite contém uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (Stahl e outros, Cell, 51, 229-240, 1987; Stahl e outros, Biochemistry 29, 8879-8884, 1990). Cerca da mesma distribuição de isoformas de PrP<sup>C</sup> é observada em

leite de ovelha, cabra e humano, embora a quantidade total de PrP<sup>C</sup> nativa venha a diferir significativamente entre as espécies. A proporção relativa de PrP<sup>C</sup> em ovelha/vaca/cabra/ser humano é estimada a 100/20/4/1.

A partir dos experimentos realizados quando de incubações sequenciais com *PrioTrap*<sup>®</sup>, a concentração total de PrP<sup>C</sup> no leite de vaca fresco pode ser estimada como sendo de cerca de 200 pg/ml. Levando-se em conta as proporções relativas de PrP<sup>C</sup> no leite de diferentes espécies, leite de ovelha fresco e leite de cabra contêm cerca de 1 ng/ml e 40 pg/ml de PrP, respectivamente. Leite humano contém menos de 10 pg/ml de PrP<sup>C</sup>. A concentração de PrP<sup>C</sup> em leite de Swiss em circulação é reduzida quando comparado com leite fresco, mas pode ser claramente detectada (Figura 1). Cerca da mesma concentração de PrP<sup>C</sup> foi medida para leite de fazenda orgânico e leite de fazenda não orgânico, bem como para leite pasteurizado e tratado em temperatura ultra-elevada (UHT) quando comparados, do mesmo fornecedor (dados não mostrados).

Exemplo 2: Ligação específica de anticorpos monoclonais anti-PrP à PrP<sup>C</sup> do leite

Para confirmar a especificidade da detecção imunoquímica de PrP<sup>C</sup> em leite, diferentes anticorpos monoclonais anti-PrP foram comparados, os quais são dirigidos contra epítomos não em sobreposição (Figura 2).

Amostras de leite de vaca fresco foram tratadas conforme descrito no exemplo 1, exceto que vários primeiros anticorpos foram usados para a detecção de PrP<sup>C</sup> em leite de vaca fresco: PrP-mab 8B4 (Alicon AG, veja acima), mAB 6H4 (Prionics AG, Suíça; Korth e outros, Nature, 390, 74-77, 1997) e PrP-mab 8H4 (Alicon AG, Número de Produto A0002; Schlieren, Suíça; Zanusso e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 8812-8816, 1998). Um anticorpo monoclonal específico para a proteína tau-1 (Chemicon International, Inc., Califórnia, EUA) foi usado como um controle negativo. PrP-mab 8B4 se liga aos resíduos 37-44 dentro do domínio amino-terminal flexivelmente desordenado de PrP de camundongo; mAB 6H4 objetiva os resíduos 144-152 dentro da hélice 1 do domínio carboxi-terminal globular; e PrP-mab 8H4 se liga aos resíduos 175-185 da hélice 2 dentro do domínio globu-

lar. Os três anticorpos reconhecem as mesmas proteínas e, assim, confirmam a presença de PrP<sup>C</sup> no leite. Em experimentos de controle, com um anticorpo não-PrP, por exemplo, anticorpo monoclonal antiproteína Tau (Figura 2) e anticorpo monoclonal anti-A $\beta$  (Calbiochem, Alemanha; dados não mostrados), nenhuma das isoformas de PrP<sup>C</sup> foi detectada, assim, confirmando a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais anti-PrP. Uma observação interessante com relação ao anticorpo 8B4 é seu perfil de detecção "claro" quando comparado com os anticorpos 6H4 e 8B4. Pode-se concluir que o 8B4 não reconhece uma variedade de fragmentos carboxi-terminais da PrP<sup>C</sup> do leite, a qual aparece como uma mancha na Western blot.

Exemplo 3: Identificação de glicoformas de PrP através de tratamento com PNGase de PrP<sup>C</sup> de leite e cérebro

A identificação de glicoformas de PrP foi realizada com PNGase (Figura 3), uma enzima que corta oligossacarídeos de glicoproteínas N-ligadas, por exemplo, os dois açúcares N-ligados de PrP<sup>C</sup> (Haraguchi e outros, Arch. Biochem. Biophys. 274, 1-13, 1989).

Para tratamento com PNGase, proteína de prion extraída de 10 ml de leite de vaca fresco conforme descrito no exemplo 1 ou 10 ml de homogenato de cérebro de vaca a 1% (peso/v) foram incubados sob agitação durante 12 h a 37°C em tampão contendo fosfato de sódio a 100 mM, Tris a 10 mM, imidazol a 20 mM, NP-40 a 1%, MEGA-8 a 1%, pH de 8 e 1,5 unidades de N-Glicosidase F (Roche, Mannheim, Alemanha). Sob as condições de clivagem mais estridentes, as proteínas foram desnaturadas através de aquecimento durante 10 minutos a 100°C na presença de SDS a 0,5% antes de tratamento com 4 unidades de N-glicosidase. As proteínas foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS e Western blotting usando o anticorpo PrP-mab 8B4 conforme descrito no exemplo 1. Após clivagem parcial com PNGase, a isoforma de PrP superior na Western blot representando PrP<sup>C</sup> diglicosilada (34 kD) desaparece em favor de PrP<sup>C</sup> monoglicosilada (30 kD) e não glicosilada (27 kD). Em paralelo, parece haver um pequeno desvio da forma monoglicosilada com peso molecular superior para

a forma com peso molecular menor. Um ligeiro desvio da PrP<sup>C</sup> monoglicosilada também é observado para o homogenato de cérebro após tratamento com PNGase (Figura 3). As isoformas de PrP<sup>C</sup> diglicosiladas diferem ligeiramente quanto à massa molecular, indicando que a estrutura de carboidrato da PrP<sup>C</sup> no leite e cérebro pode não ser idêntica. Condições de reação mais estridentes resultam em truncamento completo de carboidratos da PrP<sup>C</sup>. De modo mais importante, as massas moleculares evidentes de PrP<sup>C</sup> não glicosilada no leite são exatamente equivalentes àsquelas da PrP<sup>C</sup> correspondente em homogenato de cérebro.

#### 10 Exemplo 4: Remoção de PrP<sup>C</sup> do leite

*PrioTrap*<sup>®</sup> pode também ser aplicada para remoção de PrP<sup>C</sup> do leite. PrP<sup>C</sup> foi detectada em 10 ml de leite de vaca fresco, conforme descrito acima no exemplo 1. Entre as etapas de detecção, o leite foi incubado com 500  $\mu$ l de *PrioTrap*<sup>®</sup> (Ni-Sepharose<sup>®</sup> High Performance GeHealthcare, Amersham Biosciences) durante 30 min para remover a PrP<sup>C</sup>. Os sobrenadantes, antes e após as etapas de remoção, foram analisados através de Western blotting conforme descrito no exemplo 1 e as proteínas totais no leite foram detectadas através de coloração com prata (SilverSNAP Stain Kit II, Pierce, Perbioscience, Lausanne, Suíça).

Conforme mostrado na Figura 4, após o primeiro tratamento de 10 ml de leite com matriz, mais de 95% da PrP<sup>C</sup> endógena já tinham sido removidos e, após o segundo tratamento, PrP<sup>C</sup> foi completamente removida dentro do limite de detecção de 1 pg. Contudo, a concentração global de proteína (medida através do ensaio com ácido bicinonínico, Perbioscience, Suíça) era constante, com cerca de 40 mg/ml antes e após eliminação de PrP<sup>C</sup>. A composição de proteína do leite, conforme analisado através de SDS PAGE (Figura 4B) não foi afetada. A proteína de prion também foi completamente removida quando o leite foi reforçado com PrP<sup>Sc</sup> de homogenato de cérebro de camundongo Rocky Mountain Laboratory (RML) (dados não mostrados). Assim, *PrioTrap*<sup>®</sup> pode ser usada para enriquecimento e identificação de proteínas de prion em leite e também para sua remoção completa.

### Exemplo 5: Detecção de PrP<sup>Sc</sup> no leite

*PrioTrap*<sup>®</sup> pode também ser aplicada para a detecção de PrP<sup>Sc</sup> no leite. 10 ml de leite de ovelha pasteurizado foram reforçados com 10  $\mu$ l de homogenato de cérebro de camundongo a 1% (peso/v) Rocky Mountain Laboratory (RML) contendo cerca de 1 ng de PrP<sup>C</sup>. Após agitação durante 30 min, o leite foi centrifugado a 3000 g durante 10 min. A fração de pélete foi dissolvida em 10 ml de tampão de fosfato de sódio a 100 mM, Tris a 20 mM, imidazol a 10 mM, pH de 8 contendo Triton X-100 a 1% e subsequentemente incubado sob agitação durante 30 min na presença de 50  $\mu$ l de *PrioTrap*<sup>®</sup>. Subsequentemente, a matriz foi lavada quatro vezes com 10 ml de solução de lavagem contendo tampão de fosfato de sódio a 100 mM, Tris a 20 mM, imidazol a 10 mM, pH de 8. Proteínas ligadas à matriz foram tratadas com 0,88 U de proteinase K (PK) (Roche, Suíça) durante 60 min a 37°C. A reação foi cessada através da adição de PMSF em uma concentração final de 3 mM. As proteínas foram analisadas através de Western blotting, conforme descrito no exemplo 1, com anticorpo 8H4.

As três bandas desviadas detectadas após tratamento com PK no leite reforçado com homogenato de cérebro representam claramente PrP<sup>Sc</sup> após enriquecimento com *PrioTrap*<sup>®</sup> (veja figura 5). A intensidade dos sinais de PrP<sup>Sc</sup> indica que o enriquecimento é quantitativo. O experimento de controle na ausência de PrP<sup>Sc</sup> não mostra sinal após tratamento com PK, indicando que a detecção de sinal resulta de reforço do leite com homogenato de cérebro contendo PrP<sup>Sc</sup>.

## REIVINDICAÇÕES

1. Uso de leite ou um derivado do mesmo para a identificação de proteínas de prion em um mamífero.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1 em que as proteínas de prion são proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o mamífero é selecionado do grupo consistindo em um ser humano, bovino, ovino, camundongo, hamster, cervo, cabra ou rato.

4. Método para identificação de proteínas de prion em mamíferos compreendendo a etapa de:

contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo afinidade e seletividade elevadas por proteínas de prion.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que as proteínas de prion são proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e o agente tem elevada afinidade e seletividade por proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup>.

6. Método de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que o mamífero é selecionado do grupo consistindo em um ser humano, bovino, ovino, camundongo, hamster, cervo, cabra ou rato.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, em que o agente tendo alta afinidade e seletividade por proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou PrP<sup>C</sup> é selecionado do grupo consistindo em anticorpos policlonais ou monoclonais ou derivados dos mesmos e/ou proteínas de ligação de domínios de não-imunoglobulina.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7, compreendendo as etapas de:

- (i) concentração e/ou purificação de proteínas de prion PrP<sup>C</sup> e/ou proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> do leite ou um derivado do mesmo,
- (ii) contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo alta afinidade e seletividade por proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou proteínas de prion PrP<sup>C</sup>.

9. Método de acordo com a reivindicação 8 em que a etapa (i) ainda compreende as seguintes etapas:

a) contato das proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  do leite ou um derivado do mesmo com sepharose sob condições que permitem a ligação da referida sepharose às referidas proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ,

5 b) remoção das proteínas de não-prion não ligadas da referida sepharose.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a sepharose é selecionada de sepharoses não ligadas, de preferência selecionadas do grupo consistindo em Sepharose 2B<sup>®</sup>, 4B<sup>®</sup>, 6B<sup>®</sup>, Sepharose CL-4B<sup>®</sup>, Sepharose-6B<sup>®</sup>, Superdex 75<sup>®</sup>, Sephacryl 100HR<sup>®</sup> e Sephadex G10<sup>®</sup>.

10 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 10 em que a sepharose é selecionada de sepharoses ligante-modificadas, de preferência selecionadas do grupo consistindo em sepharoses de quelação de metal, agaroses de lectina, sepharose iminodiacética, agarose de proteína A, sepharose de estreptavidina, sepharose de sulfopropila e sepharose de carboximetila.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, compreendendo adicionalmente a etapa de separação e/ou enriquecimento de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  a partir de proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

13. Método de acordo com a reivindicação 12, compreendendo  
20 as seguintes etapas adicionais:

a) contato de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  de leite ou um derivado funcional do mesmo com sepharose ligante-modificada sob condições que permitem:

25 (i) a ligação da referida parte de sepharose às referidas proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e

(ii) a ligação da referida parte de ligante da sepharose a proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$ ,

b) opcionalmente, remoção do material não ligado da referida sepharose ligante-modificada,

30 c) opcionalmente, aguardar um período de tempo suficiente para que algumas ou a maioria das proteínas  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ligante-ligadas e/ou derivados funcionais das mesmas se convertam em proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou

derivados funcionais em proximidade íntima com as proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas,

- d) adição de uma agente de liberação seletivo às proteínas sepharose-ligadas e/ou derivados funcionais das mesmas da etapa a), b) ou c) sob condições que permitem a liberação de proteínas PrP<sup>C</sup> e opcionalmente proteínas de não-prion da parte do ligante da sepharose, mas não a liberação das proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados funcionais das mesmas da parte de sepharose e
- e) remoção de PrP<sup>C</sup> e opcionalmente proteínas de não-prion da sepharose.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, ainda compreendendo a etapa de:

- f) liberação de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados das mesmas da sepharose.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que a liberação de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou derivados das mesmas é realizada através da adição de agentes caotrópicos e/ou detergentes, de preferência uréia e/ou cloreto de guanidínio e/ou SDS, mais preferivelmente adição de uréia e/ou SDS, ainda mais preferivelmente adição de um tampão de carregamento de gel compreendendo uréia a 8 M e SDS a 5% e aplicação de um campo elétrico.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, em que a sepharose ligante-modificada é uma sepharose de quelação de metal compreendendo íons de metal imobilizados divalentes.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que os íons de metal são selecionados do grupo consistindo em Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que os íons de metal são selecionados do grupo consistindo em Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, de preferência Ni<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que a sepharose ligante-modificada é Ni Sepharose<sup>®</sup> High Performance da GeHealthca-

re, Amersham.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 19, em que a sepharose ligante-modificada é uma sepharose de quelação de metal de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19 e o agente de liberação seletivo é um agente de quelação de metal, de preferência um agente selecionado de EDTA e/ou EGTA.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que o agente de quelação de metal é EDTA.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que a sepharose de quelação de metal compreende  $Zn^{2+}$  e o agente de quelação de metal é EDTA.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 22, em que as condições na etapa d) da reivindicação 13 que permitem a liberação de proteínas de não-prion e  $PrP^C$  dos íons de metal sepharose-imobilizados compreendem a presença de um agente de quelação de metal em uma concentração de 10 a 100 mM, mais preferivelmente 20 a 80 mM, ainda mais preferivelmente EDTA em uma concentração de 40 a 80 mM.

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 23, em que pelo menos um ligante adicional para ligação de proteínas de prion  $PrP^{Sc}$  e/ou  $PrP^C$  é ligado direta ou indiretamente à sepharose.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o ligante adicional é selecionado do grupo consistindo em proteínas de prion, derivados funcionais de proteínas de prion, proteínas de prion His-marcado, proteínas de ligação a proteínas de prion, anticorpos de ligação a proteínas de prion e ligantes específicos à proteínas de prion.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o ligante adicional é uma proteína de prion e/ou um derivado funcional da mesma.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, em que o ligante adicional é ligado à sepharose direta ou indiretamente, de preferência através de uma porção espaçadora.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 27, em que as condições para ligação de sepharose a proteínas de prion

PrP<sup>Sc</sup> são condições fisiológicas, de preferência em um pH de 5 a 8 e 2 a 39°C, mais preferivelmente um pH de cerca de 7 e cerca de 2 a 8°C.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que as condições compreendem a presença de pelo menos um detergente e/ou um tampão de lise de célula.

30. Método para remoção de proteínas de prion PrP<sup>Sc</sup> e/ou PrP<sup>C</sup> do leite ou um derivado de leite compreendendo as etapas de:

(a) contato do leite ou um derivado do mesmo com sepharose sob condições que permitem a ligação da referida sepharose às referidas proteínas de prion,

(b) remoção do leite ou derivado do leite da referida sepharose.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que a referida sepharose é uma sepharose de quelação de metal compreendendo íons de metal divalente imobilizados.

32. Método de acordo com a reivindicação 31, em que os íons de metal são selecionados do grupo consistindo em Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, de preferência do grupo consistindo em Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, mais preferivelmente em que os íons de metal são Zn<sup>2+</sup>.

33. Método de acordo com as reivindicações 30 a 32, em que a sepharose de quelação de metal é Ni Sepharose<sup>®</sup> High Performance da Ge-Healthcare, Amersham.

34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 33, em que cerca de 800 µl de EDTA a 500 mM são adicionados a 10 ml de leite ou um derivado do mesmo antes da etapa (a).

Fig. 1

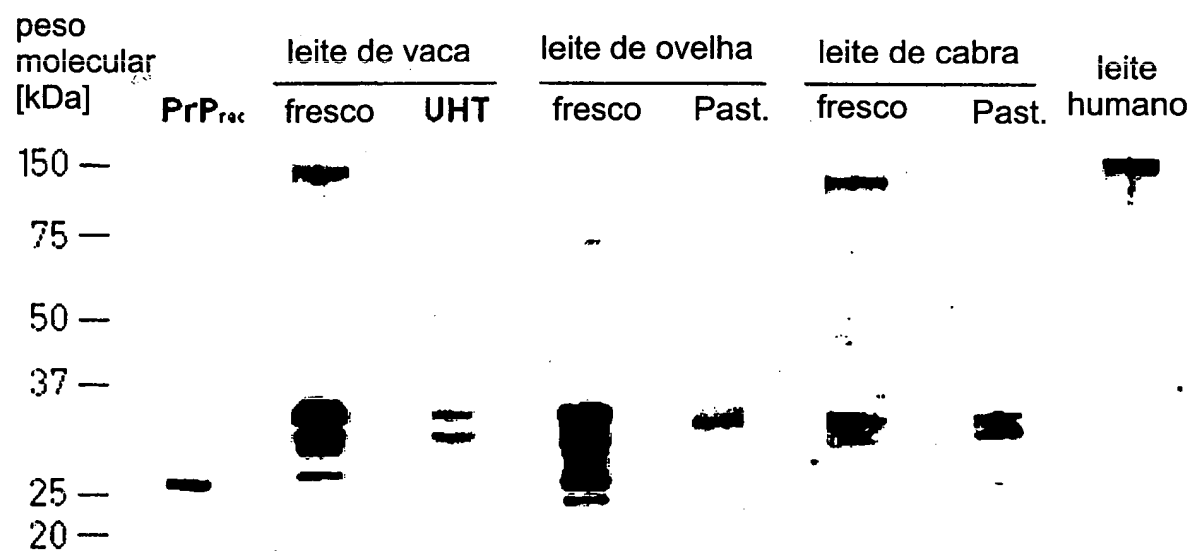


Fig. 2

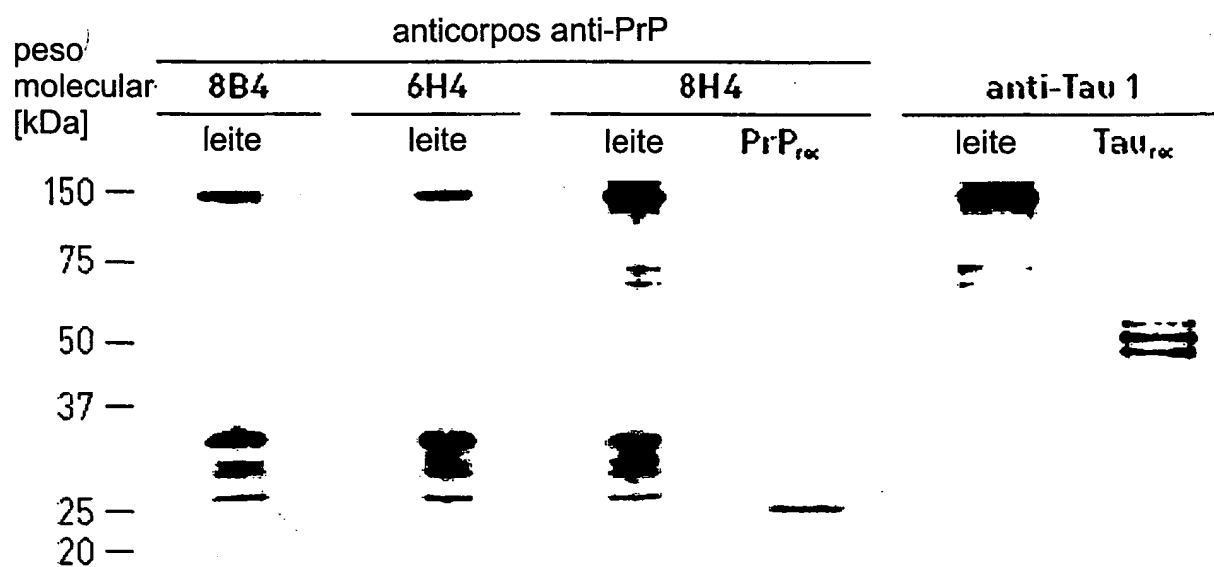


Fig. 3

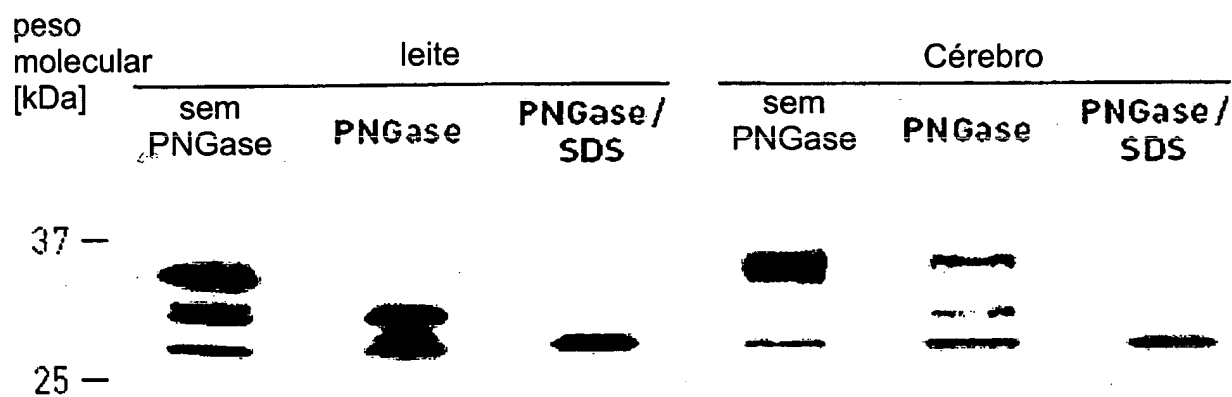


Fig. 4

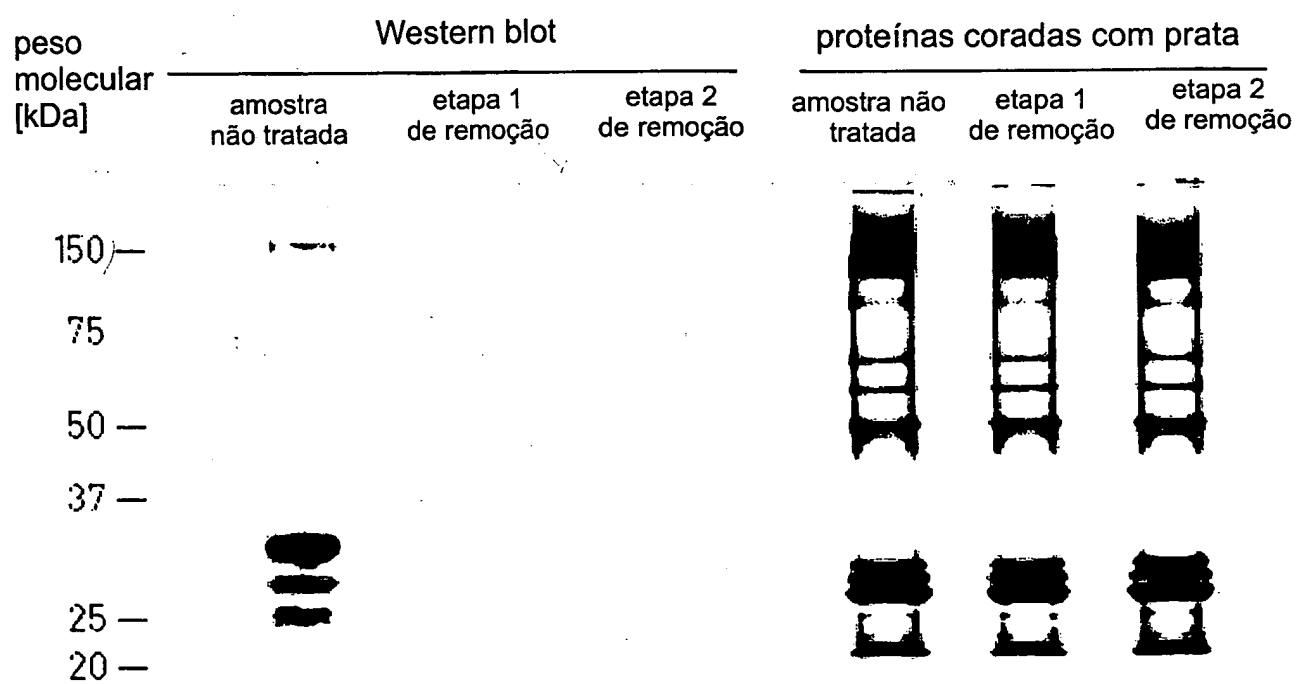
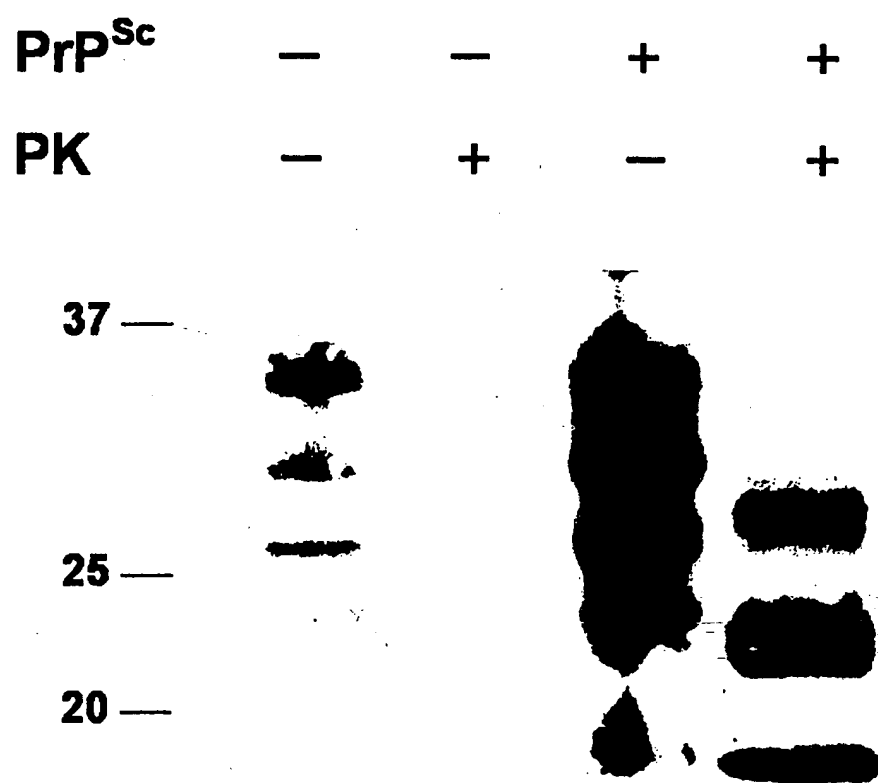


Fig. 5



**RESUMO**

Patente de Invenção: "**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE PRION NO LEITE**".

A presente invenção refere-se ao uso de leite ou um derivado do mesmo para identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , em um mamífero. A presente invenção também é dirigida a um método para a identificação de proteínas de prion, de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , em mamíferos, compreendendo a etapa de contato do leite ou um derivado do mesmo com um agente tendo afinidade e seletividade elevadas por proteínas de prion, de preferência por proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Além disso, um outro aspecto da presente invenção se refere a um método para remoção de proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  e/ou  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , de preferência proteínas de prion  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , do leite ou um derivado de leite, em que o leite ou um derivado do mesmo é contatado com sepharose, de preferência sepharose compreendendo íons de metal divalente imobilizados.