



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1054897 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/47 (2006.01) **C07K 14/435** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.02.16**

(30) Prioridade(s): **1998.02.16 FR 9801823**

(43) Data de publicação do pedido: **2000.11.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.02**
012/2006

(73) Titular(es):
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
31-33, RUE DE LA FÉDÉRATION 75015 PARISFR

(72) Inventor(es):
JEAN-PHILIPPE DESLYS **FR**

(74) Mandatário:
ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA
RUA NOVA DO DESTERRO, Nº 7, 1º ANDAR 1169-101
LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE PRPRES A PARTIR DE UMA AMOSTRA BIOLÓGICA E SUAS APLICAÇÕES**

(57) Resumo:

Resumo

"Processo para a purificação de PrPres a partir de uma amostra biológica e suas aplicações"

A invenção diz respeito a um método para purificar PrPres a partir de uma amostra biológica para ser utilizada na determinação qualitativa e/ ou quantitativa da PrPres na dita amostra. O dito processo consiste essencialmente em: (1) incubação durante 30 segundos a 2 horas, a uma temperatura inferior a 80°C, da dita amostra biológica com uma solução tampão A compreendendo pelo menos um agente tensioactivo numa quantidade compreendida entre um quarto a quatro vezes o peso da amostra biológica e opcionalmente uma protease para formar uma suspensão S1; (2) adicionar à dita suspensão S1 resultante de (1) uma solução tampão B numa quantidade suficiente para clarificar a dita suspensão, cujo tampão B é constituído por um solvente, ou uma mistura de solventes que não solubilizam a PrPres e apresentam uma constante dieléctrica compreendida entre 10 e 25; (3) a centrifugação da suspensão S2 obtida na etapa (2); e (4) a solubilização do dito sedimento num tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo e/ ou pelo menos um agente caotrópico a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 100°C.

Descrição

"Processo para a purificação de PrPres a partir de uma amostra biológica e suas aplicações"

A presente invenção diz respeito a um novo processo de purificação da PrPres a partir de uma amostra biológica tendo em vista a sua utilização para a determinação qualitativa e/ ou quantitativa da PrPres na dita amostra.

As encefalopatias subagudas espongiformes transmissíveis são provocadas por agentes transmissíveis não convencionais (ANTC), ainda designados por priões, cuja natureza precisa permanece desconhecida até à data. As ESST compreendem essencialmente a doença de Creutzfeldt-Jakob, no ser humano (DCJ, ou CJC de Creutzfeldt-Jakob disease), a doença das tremuras no carneiro e na cabra e a encefalopatia espongiforme bovina (ESB ou BSE de *bovine spongiform encephalopathy*), nos bovinos; foram evidenciadas outras encefalopatias no vison ou em determinados animais selvagens, tais como o veado e o alce.

Estas doenças são de evolução constantemente fatal e não existe até à data nenhum tratamento eficaz.

Nas encefalopatias subagudas espongiformes transmissíveis, existe uma acumulação de uma proteína do hospedeiro, a PrP (ou proteína do prião), sob uma forma anormal (PrPres), principalmente no sistema nervoso central; a PrPres copurifica com a infecciosidade e a sua acumulação precede a aparição de lesões histológicas. In vitro é tóxica para a cultura de neurónios.

Duas propriedades bioquímicas permitem habitualmente distinguir a PrPres da PrP normal: a PrPres é parcialmente resistente às proteases e é insolúvel nos agentes tensioactivos aniónicos.

Para poder detectar a PrPres presente numa amostra é necessário submeter esta última a diferentes operações para enriquecer a dita amostra em PrPres eliminando a PrP normal, de maneira a que a PrPres possa ser de seguida detectada por todo o método específico apropriado sem acarretar:

- falsos positivos devido a uma presença de PrP normal ou de outros contaminantes, ou
- falsos negativos, devido a uma concentração insuficiente de PrPres na amostra biológica final.

Com este objectivo, foi proposto um determinado número de processos de isolamento e/ ou purificação da PrPres. Eles encontram-se essencialmente baseados no método desenvolvido por Hilmert e Diringer (*Nature*, 1983, 306, 476-478) e compreendem, de maneira geral, uma extracção por um detergente, ultracentrifugações diferenciais e um tratamento por 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 KUD et al., *Arch. Virol.*, 1996, 141, 1863-1874; Kascsak RJ 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 e *J. Gen. Virol.*, 1996, 77, 1941-1946). O documento *Nature Medicine*, vol. 3, nº 9, 1996, Chen et al., p. 1009-1015 descreve um método de purificação da PrPres compreendendo vários ciclos de extracção com um detergente (sarkosil), seguido de uma centrifugação diferencial, uma ultracentrifugação, e um tratamento por uma enzima proteolítica. O documento *Cell*, vol. 86, 1996, Thuret et al., p. 565-576 descreve um método

de isolamento da PrPres que compreende uma extracção por um detergente e uma ultracentrifugação. Estes processos possuem o inconveniente de comportar um número importante de etapas incluindo várias ultracentrifugações, que são pesadas de realizar e acarretam perdas cumulativas de PrPres, que conduzem a uma sensibilidade insuficiente para obter um limite de detecção e quantificação finos da PrPres.

Estes diferentes métodos necessitam de um equipamento de laboratório de investigação e de tempos de operação que não são compatíveis com uma utilização no terreno, em particular nos matadores.

Existe assim a necessidade de uma verificação rápida da ausência, ou da presença de uma encefalopatia subaguda espongiiforme transmissível no momento do abate do animal.

Como consequência o objectivo do inventor foi de fornecer um processo de purificação de uma amostra biológica com vista à sua utilização numa detecção rápida e fiável da PrPres, que seja suficientemente simples de realizar para que possa ser utilizada no terreno, e em particular nos matadores e que responde assim melhor às necessidades da prática que os processos do estado da técnica anterior.

Com efeito, o processo de acordo com a invenção:

- é simples de realizar
- é fiável
- é fácil de interpretar: aumenta o limite de sensibilidade de detecção da PrPres, eliminando os falsos positivos (PrP normal e outros contaminantes)

e elimina os falsos negativos, uma vez que permite obter em valor absoluto, uma quantidade importante de PrPres, uma vez que é possível de tratar quantidades importantes de

material biológico com um rendimento de purificação superior a 80%; este é particularmente interessante nos matadores e fornece amostras nas quais a PrPres é facilmente detectável com os testes de diagnósticos usuais.

A presente invenção tem como objectivo um processo de purificação da PrPres a partir de uma amostra biológica, caracterizada por compreender essencialmente:

(1) incubação durante 30 segundos a 2 horas de preferência durante 30 segundos a 10 minutos a uma temperatura inferior a 80°C da dita amostra biológica com um tampão A compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, numa quantidade compreendida entre um quarto e quatro vezes, de preferência entre um quarto e uma vez e meia, o peso de uma amostra biológica e eventualmente incubação prévia, posterior, ou simultânea com uma protease, para formar uma suspensão micelar ou lamelar S1 opalescente a turva; qualquer agente tensioactivo ou mistura de agentes tensioactivos nas condições de temperatura e das quantidades mencionadas anteriormente não solubiliza a maioria da PrPres, que permanece em suspensão, enquanto que a PrP normal é solubilizada ou destruída, quando se adiciona protease; a dita incubação é realizada de preferência a uma temperatura inferior a 50°C na presença de uma quantidade de agente tensioactivo compreendido entre um quarto e uma vez e meia o peso de uma amostra biológica; de acordo com a invenção, a protease pode de facto ser adicionada antes da adição de agente tensioactivo, depois, ou simultaneamente:

(2) a adição à dita suspensão micelar ou lamelar S1 obtida em (1) de um tampão (B) numa quantidade apta a clarificar a dita suspensão (formação de uma microemulsão ou duma microsuspensão por exemplo), cujo tampão B é constituído por um solvente ou por uma mistura de solventes que não solubiliza a PrPres e apresenta uma constante dieléctrica

compreendida entre 10 e 25: obtém-se assim uma suspensão S2 límpida a olho nu;

(3) a centrifugação da suspensão S2 obtida na etapa (2); a dita centrifugação é por exemplo efectuada durante 2 a 10 minutos a uma velocidade inferior a 20.000 g de preferência a uma velocidade compreendida entre 3500 e 17500 g; a PrPres encontra-se no sedimento de centrifugação com um rendimento de purificação em PrPres, compreendendo de maneira surpreendente, a gama entre 80 e 100%; de forma vantajosa o tempo e a velocidade de centrifugação podem ser adaptados para chegar ao mesmo resultado, a saber, a obtenção de um rendimento de purificação em PrPres compreendido entre 80 e 100% e

(4) a solubilização do dito sedimento num tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, tal como definido na etapa (1), a uma concentração compreendida entre 0,1% e 5%, de preferência compreendida 0,25% e 1%, em relação ao volume de tampão C (p/v) e/ ou pelo menos um agente caotrópico numa concentração compreendida entre 0,1 M e 8 M e a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 100°C, de preferência igual, ou superior a 80°C; em tais condições de temperatura, os agentes tensioactivos anteriormente mencionados, de preferência os agentes tensioactivos iónicos, e/ ou os agentes caotrópicos solubilizam a PrPres.

As ditas etapas (1) e (2) podem ser realizados simultaneamente ou sucessivamente; de preferência elas são realizadas sucessivamente.

Segundo uma concretização preferida do dito processo, quando a amostra biológica é um tecido ou um órgão, esta última é previamente à etapa (1), homogeneizada, por exemplo por trituração mecânica num tampão de homogeneização, constituído por um tampão neutro, tal como água, ou um tampão isotónico, tal como a glucose a 5%.

De acordo com outra concretização vantajosa do dito processo, a temperatura de realização da etapa (1) encontra-se compreendida entre a temperatura ambiente e 50°C; ela é de preferência de 37°C.

De forma preferida o tampão A compreende um agente tensioactivo seleccionado no grupo constituído por:

- agentes tensioactivos aniónicos, tais como SDS (dodecilsulfato de sódio), sarcosil (lauroil sarcosina) colato de sódio, desoxicolato de sódio, taurocolato de sódio.
- tensioactivos zwitter iónicos, tais como o SB 3-10 (decilsulfobetaina), o SB 3-12 (dodecilsulfobetaina), o SB 3-14, o SB 3-16 (hexadecil sulfobetaina), o CHAPS e o desoxiCHAPS.
- tensioactivos não iónicos, tais como o C12E8 (dodecil octaetileno glicol), o Triton X100, o Triton X114, o Tween 20, o Tween 80, o MEGA 9 (nonanoil metilglucamina), o octilglucosídeo, o LDAO (óxido de dodecil dimetilamina), ou o NP40 ou
- Misturas de tensioactivos, tais como uma mistura de um agente tensioactivo iónico e uma agente tensioactivo não iónico e em particular a mistura SDS Tween 80 ou a mistura sarcosil-Triton X 100, ou a mistura de dois agentes tensioactivos iónicos, tal como a mistura SDS-desoxicolato ou a mistura de um agente tensioactivo iónico e de um agente tensioactivo zwitteriónico.

De acordo com outra concretização vantajosa do dito processo, o tampão B é seleccionado de preferência entre os álcoois C₃-C₆ e as misturas de álcoois, cuja constante dieléctrica teórica média se encontra compreendida entre 10 e 25. Os álcoois ou misturas de álcoois seguintes são particularmente preferidas: butanol-1, butanol-2, metil-2

propanol 1, isopropanol, isopropanol + pentanol, etanol + hexanol, butanol + pentanol, etc...

Entende-se por constante dielétrica no sentido da presente invenção, a constante dielétrica estática ϵ , medida em campos estáticos ou a frequência relativamente fraca; ela corresponde à razão deslocamento eléctrico D/força do campo eléctrico E. Quando um campo eléctrico é aplicado à solução, a uma temperatura compreendida 293,15 e 298,15 K.

A constante dielétrica dos líquidos, tal como definida abaixo, é mais particularmente descrita no CRC Handbook of Chemistry and Physics (Ed. David R. Lide 75ª edição, 1994, CRC Press).

Para uma mistura de solventes entende-se por constante dielétrica teórica média, a média das constantes dielétricas de cada solvente, ponderada pela sua proporção na mistura.

A adição do tampão B na etapa (2) permite de maneira surpreendente obter rendimentos de purificação superiores a 90%, com as condições de centrifugação a baixa velocidade: ela permite mantendo um rendimento importante, diminuir de maneira significativa a quantidade de sedimento final: de maneira vantajosa, a quantidade de sedimento final é de preferência inferior a 10% do peso da amostra biológica de partida para permitir a sua utilização eficaz no âmbito de um doseamento imunológico, quando só se adiciona tampão A encontramos nas condições do estado da técnica anterior que impõem uma ultracentrifugação para obter rendimentos suficientes em PrPres, tendo em vista uma detecção. Pode-se verificar que se pode igualmente obter rendimentos de purificação superiores a 80% fazendo variar o tempo e a velocidade de centrifugação: 2 a 10 minutos a uma velocidade inferior a 20 000 g ou durante uma duração diminuída proporcionalmente ao aumento do número de g.

De forma preferida a relação entre rendimento em PrePres na fase sólida/ quantidade de sedimento recuperado depois da centrifugação da suspensão S2 é superior a 10, quando a amostra de partida corresponde a 100 mg de cérebro.

Igualmente de forma preferida, o tampão C preparado na etapa (4) compreende um agente caotrópico que é em particular seleccionado no grupo constituído por ureia e guanidina ou uma mistura destes: pode ser igualmente utilizado, qualquer outro agente caotrópico.

De preferência a ureia encontra-se a uma concentração compreendida entre 0,25 e 8 M e a guanidina encontra-se numa concentração compreendida entre 0,1 e 6 M.

Quando o tampão C é uma mistura de pelo menos um agente tensioactivo e pelo menos um agente caotrópico, ele é seleccionado de maneira preferida no grupo constituído pelas misturas seguintes: mistura de SDS e ureia, mistura de sarcosil e ureia, mistura de desoxicolate e ureia ou mistura de sarcosil e guanidina e ureia. De forma preferida na mistura de SDS e ureia, o SDS encontra-se numa concentração de 0,25-1% e a ureia encontra-se a 0,25 a 6 M: na mistura sarcosil e ureia, o sarcosil encontra-se numa concentração compreendida entre 0,25 e 1%, e a ureia encontra-se numa concentração compreendida entre 0,25 e 8 M; na mistura de sarcosil e guanidina o sarcosil encontra-se numa concentração compreendida entre 0,25 e 1%, e a guanidina encontra-se numa concentração compreendida entre 0,5 e 3 M e na mistura sarcosil, guanidina e ureia, o sarcosil encontra-se numa concentração compreendida entre 0,25 e 1%, a guanidina encontra-se numa concentração compreendida entre 0,5 M - 3 M e a ureia encontra-se numa concentração compreendida entre 2 e 6 M.

O tampão de Laemmli (SDS a 4%. Tris-HCl 0,1 M pH 8, sacarose a 5% e β -mercaptoetanol a 2%) pode igualmente ser utilizado em particular para as transferências de Western.

É igualmente objecto da presente invenção um processo de detecção da PrPres numa amostra biológica, caracterizada por compreender:

- O tratamento da dita amostra, tal como definido abaixo.
- A diluição da amostra obtida se necessário e
- A determinação da PrPres, através de qualquer método analítico adequado, tal como um método imunológico (ELISA, transferência de Western), produzindo um sinal específico.

A etapa de diluição mencionada anteriormente permite neutralizar o tampão C, tendo em vista uma determinação da PrPres por um método de ELISA; ela é por exemplo realizada com um tampão compreendendo a albumina, conduzindo a uma concentração final em albumina compreendida entre 2 e 10% (p/v), ou com um tampão à base de desoxicolato, a 1 %, por exemplo.

Uma amostra biológica tratada desta maneira contém uma concentração eficaz em PrPres, de maneira a que esta última possa ser determinada directamente nesta amostra através de qualquer método analítico, em particular um método imunológico.

Numa variante, é objecto da presente invenção um processo de purificação da PrPres a partir de uma amostra biológica, caracterizada por compreender essencialmente:

- (1) incubação durante 30 segundos a 2 horas de preferência durante 30 segundos a 10 minutos a uma temperatura inferior a 80°C da dita amostra biológica com um tampão A compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, numa quantidade

compreendida entre um quarto e quatro vezes, de preferência entre um quarto e uma vez e meia, o peso de uma amostra biológica e eventualmente incubação prévia, posterior, ou simultânea com uma protease, para formar uma suspensão micelar ou lamelar S1 opalescente a turva;

de acordo com a invenção a protease é adicionada mesmo antes da junção do agente tensioactivo, seja depois, seja simultaneamente:

- (2) a adição à dita suspensão micelar ou lamelar S1 obtida em (1) de um tampão (B) numa quantidade apta a provocar uma separação de fases, cujo tampão B é constituído por um solvente ou por uma mistura de solventes que não solubiliza a PrPres e apresenta uma constante dieléctrica compreendida entre 10 e 25:
- (3) a centrifugação da suspensão obtida na etapa (2): a dita centrifugação é por exemplo efectuada durante 2 a 10 minutos a uma velocidade inferior a 20.000 g de preferência a uma velocidade compreendida entre 3500 e 17500 g; a PrPres encontra-se na interface:
- (4) a recuperação do filme presente na interface;
- (5) o dito filme é novamente solubilizado com um tampão A sem protease.
- (6) A centrifugação da suspensão obtida na etapa (5), durante 2 a 10 minutos, a uma velocidade inferior a 20 000 g de preferência a uma velocidade compreendida entre 3 500 e 17 500; a PrPres encontra-se no sedimento de centrifugação com um rendimento de purificação em PrPres, compreendido de maneira surpreendente, entre 70 e 100%; de forma vantajosa o tempo e a velocidade de centrifugação podem ser adaptados para chegar ao mesmo resultado,

a saber, a obtenção de um rendimento de purificação em PrPres compreendido entre 70 e 100% e

- (7) a solubilização do dito sedimento num tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, tal como definido na etapa (1), a uma concentração compreendida entre 0,1% e 5%, de preferência compreendida 0,25% e 1%, em relação ao volume de tampão C (p/v) e/ ou pelo menos um agente caotrópico numa concentração compreendida entre 0,1 M e 8 M e a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 100°C, de preferência igual, ou superior a 80°C; em tais condições de temperatura, os agentes tensioactivos mencionados anteriormente, de preferência os agentes tensioactivos iónicos, e/ ou os agentes caotrópicos solubilizam a PrPres.

As quantidade de tampão B a adicionar para obter uma microemulsão, uma microsuspensão, ou uma separação de fase são estabelecidas com o auxílio de uma gama de tampão B como ilustrado para o butanol-1, na figura 1: elas podem variar em função do tempo A e dos constituintes seleccionados para o tampão B.

Uma variante da etapa de solubilização (etapa (4) do primeiro processo ou etapa (7) do segundo processo) no dito tampão C compreende o aquecimento a uma temperatura igual ou superior a 80°C durante 10 minutos seguida de uma centrifugação de preferência durante 2 a 10 minutos, a uma velocidade inferior a 20 000 g, de preferência a uma velocidade compreendida entre 3500 g e 17500 g; neste caso a PrPres é novamente solubilizada e encontra-se no sobrenadante: nestas condições obtém-se uma amostra particularmente bem adaptada a um doseamento da PrPres por um método ELISA.

É igualmente objecto da presente invenção um kit de tratamento de uma amostra biológica, caracterizado por compreender adicionalmente um tampão de homogeneização da dita amostra biológica, quantidades convenientes do tampão A, do tampão B e do tampão C, tais como as definidas abaixo.

É igualmente objecto da presente invenção um kit de detecção da PrPres, caracterizado por compreender quantidades convenientes do tampão de homogeneização da amostra biológica na qual a PrPres deverá ser detectada, quantidades convenientes de tampão A, tampão B e tampão C, tal como definido abaixo, tal como pelo menos um anticorpo anti-PrPres adequado.

Além das disposições precedentes a invenção compreende ainda outras disposições que decorrem da descrição que se segue que se refere a exemplos da concretização do processo objecto da presente invenção e também às figuras em anexo nas quais:

- a figura 1 ilustra a influência da quantidade de tampão B (butanol) no rendimento da purificação da PrPres (em %) e a quantidade de sedimento obtida após a centrifugação;
- a figura 2 ilustra a influência dos diferentes tampões B sobre o rendimento da purificação da PrPres (em %) e a quantidade de sedimento obtida após a centrifugação;
- a figura 3 ilustra o papel da constante dieléctrica teórica média, tal como definida abaixo para comparar as diferentes misturas de álcoois utilizadas como tampão B;
- a figura 4 ilustra um exemplo de detecção da PrPres por transferência de Western:

- a figura ilustra a sensibilidade e o rendimento do teste ELISA para diferentes eluições de amostras tratadas de acordo com a invenção:
- a figura 6 ilustra um teste ELISA efectuado directamente sobre os homogeneizados, e
- a figura 7 ilustra uma comparação de diferentes tampões C.

De qualquer forma, deverá ser entendido que estes exemplos são fornecidos unicamente a título de ilustração do objecto da invenção e são de maneira nenhuma limitantes da invenção.

Exemplo 1: Tratamento de uma amostra do cérebro de bovino para o doseamento da PrPres no terreno: selecção da quantidade de tampão B conveniente.

-Retira-se 500 mg de cérebro de bovino: mói-se e homogeniza-se a 25% (p/v) numa solução de glucose a 5%.

Para realizar a homogeneização a amostra de cérebro (500 mg) e 1 ml de glucose são introduzidas nos tubos que incluem esferas cerâmicas para agitação. Recupera-se o sobrenadante (cerca de 1,5 ml); as esferas são lavadas em suspensão com 500 µl de glucose e agitadas: recupera-se o sobrenadante obtido que é misturado com o sobrenadante anterior (2 ml).

- Incuba-se 400 µl de homogeneizado obtido como abaixo indicado (equivalente a 100 mg de cérebro/ com 400 µl de tampão A compreendido por uma mistura de partes iguais de 25% (p/v) de SDS e 25% (v/v) de Tween 80 numa proporção 1/1 (v/v), tal como a proteinase K (0,1 mg/ml de tampão A, ou 0,4 mg/g de tecido durante 10 minutos (2 vezes 5 min) a 37°C (etapa (1)). Numa variante o tampão A compreende vantajosamente sarcosil a 10% e Triton X 100 a 10%: este último tampão A, que não compreende SDS é mais vantajoso, uma vez que não acarreta perturbações na detecção da PrPres

por anticorpos específicos, através de um método do tipo ELISA.

-Adiciona-se 0 a 1000 μ l de butanol (tampão B) etapa (2)). A figura 1 mostra o rendimento da purificação em PrPres (%), quantificado por transferência de Western e a quantidade de sedimento (em mg) em função da quantidade de tampão B adicionada.

Esta figura mostra que entre 10 e 53%, a PrPres é mantida em suspensão e que entre 30 e 50% de butanol, obtém-se um rendimento de purificação da ordem de 100% e um sedimento inferior a 10 mg.

Centrifuga-se a 3800 g (4000 RPM, centrifugadora JOUAN) durante 10 minutos (etapa (3)); elimina-se o sobrenadante e dissolve-se o sedimento obtido que contém a PrPres com 80-100 μ l de um tampão C (etapa (4)) compreendendo:

- Seja do SDS a 0,5% e ureia a 0,5 M
- Seja do tampão de Laemmli
- Seja de sarcosil a 0,5% e de ureia 6 M

Durante 5 minutos a 100°C.

Este tratamento permite a dissolução da PrPres: a amostra está pronta directamente a ser utilizada num doseamento do tipo imunológico, tal como ELISA ou transferência de Western.

Para realizar um ELISA o sedimento é de preferência dissolvido num tampão C compreendendo sarcosil (0,25-1%) e ureia (0,25 -8 M) ou SDS (0,25 -1%) e ureia (0,25- 1 M); a amostra obtida é de preferência diluída (para $\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{2}$), após aquecimento com um tampão contendo albumina conducente a uma concentração final em albumina compreendida entre 2 e 10% (p/v), ou com um tampão contendo desoxicolato a 1%.

Numa variante a amostra é diluída e aquecida a 100°C durante 5 a 10 minutos, depois centrifugada durante 2 a 10

minutos a uma velocidade inferior a 20000 g, de preferência a uma velocidade compreendida entre 3500 e 17500 g; o sobrenadante é diluído entre $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ com um tampão ELISA.

No presente caso, a quantificação da PrPres é efectuada por transferência de Western, misturando vol /vol com tampão Laemmli: a amostra diluída é de seguida colocada sobre gel para uma detecção por transferência de Western; as quantidades de PrPres detectadas são reportadas a uma gama linear de diluições de PrPres purificada nas mesmas condições abaixo, a partir de um mesmo homogeneizado de cérebro de vaca doente com ESB no estado terminal da doença (controlo positivo).

As amostras tratadas de acordo com o processo de acordo com a invenção encontram-se desembaraçadas do ruído de fundo e permitem um doseamento fiável, específico e quantitativo da PrPres.

O processo de acordo com a invenção permite aumentar o rendimento de purificação de PrPres de maneira significativa:

- com efeito, quando só se adiciona o tampão A, o rendimento em PrPres só é da ordem de 40%; observa-se então uma perda da ordem de 60% da PrPres, em particular do facto da sua repartição entre a fase sólida e a fase líquida; além disso o sedimento é importante. Isto explica porque nos estado da técnica anterior os protocolos descritos utilizam o sarcosil que acarreta a obtenção de sedimentos mais fracos, mas que impõem ultracentrifugações pesadas para possuírem um rendimento suficiente.
- a etapa (2) permite aumentar o rendimento em PrPres na fase sólida: obtém-se um rendimento da ordem de 80-100% na fase sólida da suspensão S2, diminuindo a quantidade de sedimento como indicado abaixo.

Exemplo 2; Tratamento de uma amostra de cérebro de bovino para o doseamento de PrPres no terreno: variante da etapa (1) e da etapa (2).

- a etapa de homogeneização é idêntica aquela descrita no exemplo 1.
- De seguida incuba-se os 2 ml de homogeneizado obtidos a partir de 500 mg de cérebro de bovino com 2 ml de tampão A nas mesmas condições que as expostas ao exemplo 1 (etapa (1)).
- Adiciona-se 3 ml de tampão B, nas mesmas condições que as expostas no exemplo 1 (etapa (2)).
- A continuação do processo é idêntica à do exemplo 1.

Exemplo 3: Tratamento de uma amostra de cérebro de bovino para a doseamento de PrPres no terreno: variante da etapa de homogeneização

-Retira-se 250 mg de cérebro de bovino: tritura-se e homogeniza-se a 25% (p/v) numa solução de glucose a 5%.

Para efectuar a homogeneização a amostra de cérebro (250 mg) e 750 µl de glucose são introduzidos nos tubos compreendendo esferas em cerâmica com agitação durante 40 segundos (aparelho RIBOLYSER-HYBAID) : retira-se 400 µl de sobrenadante e depois procede-se como no exemplo 1.

Exemplo 4: Comparação de diferentes tampões B em relação à razão rendimento de purificação em PrPres/ quantidade de sedimento.

A amostra é tratada nas mesmas condições que as expostas no exemplo 1, com excepção da quantidade do tampão B que é de 600 µl.

A figura 2 ilustra as diferentes proporções obtidas por transferência de Western com diferentes tampões B: pentanol, butanol, mistura isopropanol + pentanol, mistura etanol +hexanol, isopropanol e etanol; as misturas foram efectuadas em vol/ vol.

Exemplo 5: comparação das constantes dieléctricas de diferentes misturas e sua influência sobre o rendimento de purificação em PrPres e a quantidade de sedimento.

O processo é realizado nas condições expostas no exemplo 4. A figura 3 ilustra os resultados obtidos: no caso onde o tampão B é uma mistura de álcoois, o volume de cada álcool é calculado em função da sua constante dieléctrica e da constante dieléctrica teórica da mistura desejada (por exemplo 17) e reportar a 600 µl de volume total de álcool. Por exemplo, para a mistura hexano/ etanol obtém-se a fórmula seguinte:

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

y representa a percentagem de hexanol, sendo 13 a constante dieléctrica do hexanol e sendo 25 a constante dieléctrica do etanol.

Para uma constante dieléctrica teórica média de 15 ou menos, observa-se uma separação de fase.

Exemplo 6: Detecção da PrPres por transferência de Western

***Protocolo:**

- 1) incubação a 37°C, 2 vezes 5 min de 400 mg de homogeneizado de cérebro de vaca a 25% (peso/ volume) e de 400 µl de tampão A compreendendo 400 µl de uma mistura em partes iguais (v/v) de SDS a 25% (p/v) e de

- Tween 80 a 25% (v/v) (50/50) e de proteinase K (PK) a 0,1 mg/ml de tampão A.
- 2) adiciona-se 600 μ l de tampão B (excluindo as amostras das pistas 7 e 8:1000 μ l de tampão B), constituído por butanol-1.
 - 3) Centrifuga-se a 15000 RPM durante 5 min (cerca de 17000 g).
 - 4) O sedimento de centrifugação é colocado novamente em 100 μ l tampão de Laemmli contendo 4% de SDS e aquecido a 100°C durante 5 min.

*Transferência de Western:

As amostras obtidas são utilizadas para efectuar uma electroforese SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose nas condições descritas por Towin et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 4350-4354) ou por C.I. Lasmézas et al. (J. Gen. Virol., 1996, mencionado anteriormente).

Antes de ser deposto sobre o gel de electroforese, as amostras foram diluídas de 1/20 num controlo negativo produzido nas mesmas condições que aquelas expostas no exemplo 1, a partir de um homogeneizado de vaca saudável, devido à importância dos sinais (gel de poliacrilamida a 12% carregado com o equivalente de 10 mg (10 μ l) de cérebro, correspondendo a 9,5 mg de cérebro de vaca saudável e 0,5 mg de cérebro de vaca infectada).

A imunodeteção da PrPres foi realizada com o antisoro JB007 (R. Demaimay et al., J. Virol, 1997. 71, 12, 9685-9689) a 1/5000, e as Ig de cabra anti-coelho conjugadas à peroxidase (1/2500). A imunoreactividade é revelada por quimioluminescência (ECL, Amersham), quantificada e visualizada sobre filmes autoradiográficos, como ilustrado na Figura 4.

A figura 4 ilustra os resultados obtidos e corresponde à curva propanol/ hexanol da figura 3A.

Nesta figura as bandas 1 a 6 correspondem a amostras tratadas preparando como tampão B diferentes misturas de propanol/ hexanol conduzindo a diferentes constantes dieléctricas teóricas médias; as bandas 8 e 9 correspondem a amostras biológicas submetidas a um procedimento de preparação como tampão B, 1000 µl de butanol (ponto 53 % da figura 1): observa-se neste caso que o conjunto da PrPres encontra-se na interface: as bandas 9 e 10 correspondem a amostras biológicas submetidas a um procedimento de preparação como tampão B. 600 µl de butanol (ponto 43% da figura 1): observa-se que neste caso que o conjunto da PrPres encontra-se no sedimento (pista 10), enquanto que num controlo negativo tratada nas mesmas condições (pista 9), não se observa nenhum sinal.

Exemplo 7: Doseamento por ELISA da PrPres a partir de uma amostra obtida de acordo com a invenção.

Prepara-se uma amostra nas condições seguintes:

- retira-se 400 mg de cérebro de bovino: tritura-se e homogeniza-se a 20% numa solução de glucose a 5% (1,6 ml), nas mesmas condições que as expostas no exemplo 1.
- Incuba-se a 37°C durante 10 min (2 vezes 5 min com agitação intermédia), 500 µl de homogeneizado obtido com 500 µl de tampão A compreendendo sarcosil a 105 e triton X 100 a 10% assim como proteinase K (80 µg/ml).
- adiciona-se 500 µl de tampão B (butanol).
- Centrifuga-se a 15000 rpm com um rotor permitindo obter 17608 g, durante 5 min: os mesmos resultados são obtidos com um tempo de centrifugação de 4 min a 20 627 g.

- Elimina-se o sobrenadante e dissolve-se o sedimento obtido que contém a PrPres com 100 μ l de tampão C compreendendo ureia 6 M e sarcosil 0,5% durante 5 min a 100°C.
- Centrifuga-se a 15000 rpm com um rotor permitindo obter 17608 g, durante 5 min: são obtidos os mesmos resultados com um tempo de centrifugação de 4 min a 20627 g. O sobrenadante é diluído a 1/3 num tampão EIA (tampão fosfato com 0,5% de desoxicolato).

Para efectuar o ELISA a amostra obtida é colocado numa razão de 100 μ l por poço, em duplicado sobre uma placa coberta com um primeiro anticorpo antiPrP (8G8, ref. Kraseman et al. Molecular Medicine 1996), e depois incubase, lava-se e revela-se com um segundo anti-corpo anti-PrP (12F10, ref.^a Kraseman et al., 1996) acoplado à acetilcolineesterase (ref^a Grassi et al., J. Immunol Methods. 1998). Incuba-se com o substracto de acetilcolina esterase e depois a leitura é feita a 415 nm, 1 min ou 30 min. depois adiciona-se substracto (reagente d'Ellmann).

Os resultados apresentados na figura 5 são relativos a um homogeneizado a 20% (peso/ volume) de cérebro de vaca considerada clinicamente doente de ESB diluído de 1/10, 1/100, 1/1000 ou 1/10000 num homogeneizado a 20% (peso: volume) de um cérebro de vaca saudável.

As amostras são depois tratadas nas condições descritas abaixo e testadas num teste EIA com anticorpo 8G8 para captura do anticorpo 12F10 como anticorpo de detecção.

As amostras são testadas diluídas no tampão de depósito EIA (diluídas a 1/3, depois de 3 em 3).

A figura 5 ilustra os resultados obtidos (densidade óptica do sinal em função da diluição final do homogeneizado a saber diluição num homogeneizado negativo x diluição no tampão EIA): a curva semi-logaritmica apresenta

um aspecto sigmoide, observado classicamente em todos os doseamentos do tipo EIA. Além disso, é de salientar uma boa sobreposição das curvas obtidas a partir de homogeneizados a 1/10, 1/100 e 1/1000. Finalmente o nível de sensibilidade do teste permite detectar este cérebro positivo diluído de 1/10000.

Na figura 6, um outro homogeneizado a 1/100 é testado pela técnica de EIA seja após tratamento como descrito abaixo, com uma concentração de PK a 400 ng/mg), seja após tratamento dos homogeneizados directamente com diferentes concentrações de PK. Verifica-se que o tratamento directo dos homogeneizados com a PK sem purificação dá sinais elevados de controlos negativos para pequenas concentrações de PK (destruição incompleta de PrPc), ou sinais fracos para as vacas positivas com concentrações elevadas de PK. Este exemplo sublinha o carácter indispensável do tratamento dos homogeneizados, tal como foi descrito anteriormente para obter uma detecção correcta da PrPres.

Exemplo 8: Comparação dos diferentes tampões C.

O protocolo de tratamento da amostra utiliza o do exemplo 7.

A figura 7 ilustra os resultados obtidos.

A guanidina parece trazer vantagens e a combinação ureia- guanidina parece ser a mais interessante (sabendo que a ureia é melhor tolerada pelo teste ELISA).

Lisboa, 2 de Novembro de 2006

Reivindicações

1. Processo de purificação da proteína do prião sob uma forma anormal (PrPres) a partir de uma amostra biológica, caracterizado por compreender:

(1) incubação durante 30 segundos a 2 horas a uma temperatura inferior a 80°C da dita amostra biológica com um tampão A compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, numa quantidade compreendida entre um quarto e quatro vezes o peso de uma amostra biológica para formar uma suspensão S1:

(2) a adição à dita suspensão S1 obtida em (1) de um tampão (B) numa quantidade apta a clarificar a dita suspensão por formação de uma microemulsão ou duma microsuspensão, cujo tampão B é constituído por um solvente ou por uma mistura de solventes que não solubiliza a PrPres e apresenta uma constante dieléctrica compreendida entre 10 e 25;

(3) a centrifugação da suspensão S2 obtida na etapa (2); e
(4) a solubilização do dito sedimento num tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, do mesmo tipo que o da etapa (1), a uma concentração compreendida entre 0,1% e 5%, de preferência compreendida 0,25% e 1%, em relação ao volume de tampão C (p/v) e/ ou pelo menos um agente caotrópico numa concentração compreendida entre 0,1 M e 8 M e a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 100°C, de preferência igual, ou superior a 80°C.

2. Processo de purificação da proteína do prião sob uma forma anormal (PrPres) a partir de uma amostra biológica, caracterizada por compreender:

(1) incubação durante 30 segundos a 2 horas a uma temperatura inferior a 80°C da dita amostra biológica com um tampão A compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, numa quantidade compreendida entre um quarto e quatro vezes o peso de uma amostra biológica para formar uma suspensão S1:

(2) a adição à dita suspensão S1 obtida em (1) de um tampão (B) numa quantidade apta a formar uma separação de fase, cujo tampão B é constituído por um solvente ou por uma mistura de solventes que não solubiliza a PrPres e apresenta uma constante dieléctrica compreendida entre 10 e 25;

(3) a centrifugação da suspensão obtida na etapa (2); (4) a recuperação do filme presente na interface;

(5) o dito filme é novamente solubilizado com um tampão A sem protease.

(6) A centrifugação da suspensão obtida na etapa (5), e

(7) a solubilização do dito sedimento num tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo, do mesmo tipo como o da etapa (1), a uma concentração compreendida entre 0,1% e 5%, de preferência compreendida 0,25% e 1%, em relação ao volume de tampão C (p/v) e/ ou pelo menos um agente caotrópico numa concentração compreendida entre 0,1 M e 8 M e a uma temperatura compreendida entre a temperatura ambiente e 100°C, de preferência igual, ou superior a 80°C,

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2, caracterizado por quando a amostra biológica é um tecido ou um órgão esta é antes da etapa 1 homogeneizada num tampão de homogeneização seleccionado no grupo constituído por tampões neutros e tampões isotónicos.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado por a duração da incubação estar de preferência compreendida entre 30 segundos a 10 minutos.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por o tampão A ou o tampão C compreender um agente tensioactivo seleccionado no grupo constituído por :

- agentes tensioactivos aniónicos, tais como SDS (dodecilsulfato de sódio), sarcosil (lauroil sarcosina) colato de sódio, desoxicolato de sódio, taurocolato de sódio,
- tensioactivos zwitter iónicos, tais como o SB 3-10 (decilsulfobetaina), o SB 3-12 (dodecilsulfobetaina), o SB 3-14, o SB 3-16 (hexadecil sulfobetaina), o CHAPS e o desoxiCHAPS.
- tensioactivos não iónicos, tais como o C12E8 (dodecil octaetileno glicol), o Triton X100, o Triton X114, o Tween 20, o Tween 80, o MEGA 9 (nonanoil metilglucamina), o octilglucosídeo, o LDAO (óxido de dodecil dimetilamina), ou o NP40 ou
- misturas de tensioactivos, tais como uma mistura de um agente tensioactivo iónico e de um agente tensioactivo não iónico, uma mistura de dois agentes tensioactivos iónicos, ou uma mistura de um agente tensioactivo iónico e um agente tensioactivo zwitter iónico.

6. Processo de acordo com quaisquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por a temperatura da etapa (1) estar compreendida entre a temperatura ambiente e 50°C, de preferência a 37°C.

7. processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por na etapa (1) , a quantidade de agente tensioactivo presente no tampão A estar de preferência compreendida entre um quarto e uma vez e meia o peso da amostra biológica.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por na etapa (1) compreender a incubação da amostra biológica com uma protease previamente, posteriormente ou simultaneamente à incubação da dita amostra biológica com o tampão A.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por o tampão B ser seleccionado no grupo constituído por álcoois em C3-C6 e por misturas de álcoois, cuja constante dieléctrica teórica média está compreendida entre 10 e 25.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por os álcoois ou misturas dos álcoois seguintes serem particularmente preferidos: butanol-1, butanol-2, metil -2-propanol-1, isopropanol, isopropanol + pentanol, etanol+ hexanol, butanol + pentanol.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado por a centrifugação da etapa (3) e da etapa (5) ser realizada durante 2 a 10 minutos a uma velocidade inferior a 20 000 g, de preferência a uma velocidade compreendida entre 3500 g e 17500 g.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado por o tampão C compreender como agente caotrópico um agente que é seleccionado no grupo

constituído por ureia e pela guanidina ou uma mistura destes dois.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado por a etapa de solubilização (etapa (4)) do processo de acordo com a reivindicação 1 ou etapa (7) do processo de acordo com a reivindicação 2) no dito tampão C compreendendo o aquecimento a uma temperatura igual ou superior a 80°C durante 5 a 10 minutos seguido de uma centrifugação.

14. Processo de detecção da PrPres numa amostra biológica, caracterizado por compreender:

- o tratamento da dita amostra de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, e
- detecção da PrPres por qualquer método analítico apropriado.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por compreender uma etapa de diluição da amostra biológica.

16. Kit de tratamento de uma amostra biológica tendo em vista a purificação da PrPres a partir da dita amostra, caracterizado por compreender adicionalmente um tampão neutro numa quantidade que permite a homogeneização da dita amostra biológica:

- um tampão A que compreende pelo menos um agente tensioactivo numa quantidade compreendida entre um quarto e quatro vezes o peso da amostra biológica,
- um tampão B constituído por um solvente, ou uma mistura de solventes que não solubiliza a PrPres e apresenta uma constante dieléctrica compreendida entre 10 e 25, numa

quantidade apta a clarificar uma suspensão resultante da incubação da amostra biológica no tampão A;

- um tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo do mesmo tipo que aquele do tampão A a uma concentração compreendida entre 0,1% e 5%, de preferência compreendida entre 0,25% e 1% em relação ao volume do tampão C (p/v) e/ ou pelo menos um agente caotrópico a uma concentração compreendida entre 0,1 M e 8M numa quantidade suficiente para permitir a solubilização da PrPres.

17. Kit de detecção da PrPres, caracterizado por compreender:

- um tampão neutro numa quantidade que permite a homogeneização da amostra biológica, na qual a PrPres deverá ser detectado.
- um tampão A compreendendo pelo menos um agente tensioactivo numa quantidade compreendida entre um quarto e quatro vezes o peso da amostra biológica,
- um tampão B constituído por um solvente ou por uma mistura de solventes que não solubiliza a PrPres e apresenta uma constante dieléctrica compreendida entre 10 e 25, numa quantidade apta a clarificar uma suspensão resultante da incubação da amostra biológica no tampão A;
- um tampão C compreendendo pelo menos um agente tensioactivo do mesmo tipo que o do tampão A, a uma concentração compreendida entre 0,1% e 5%, de preferência compreendida entre 0,25% e 1% em relação ao volume do tampão C (p/v) e/ ou pelo menos um agente caotrópico a uma concentração compreendida entre 0,1 M e 8 M, numa quantidade suficiente para permitir a solubilização da PrPres.

- Pelo menos um anticorpo anti-PrPres que permite a detecção de PrPres.

Lisboa, 2 de Novembro de 2006

1/6

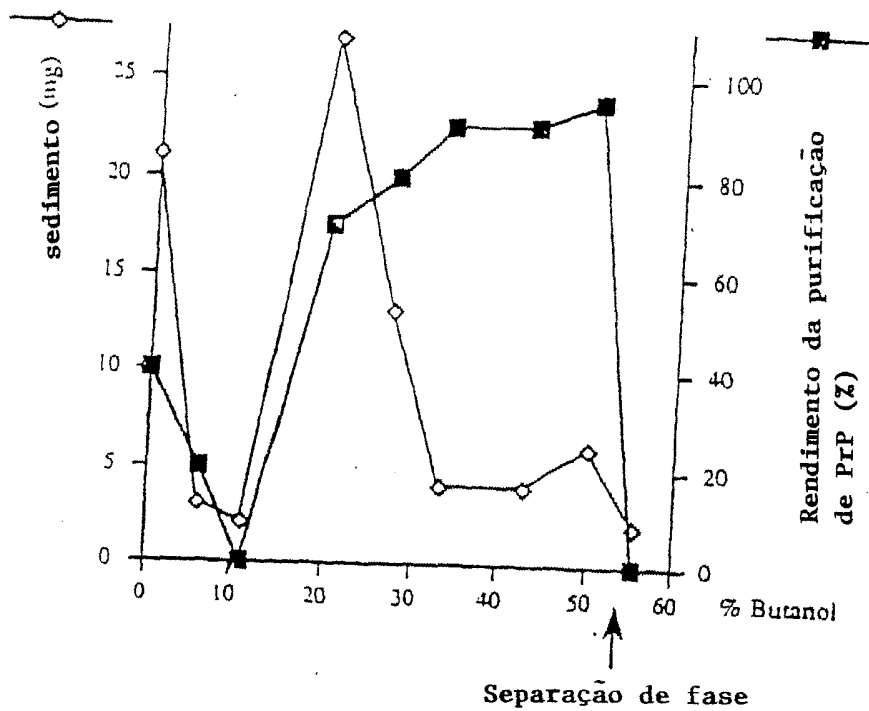


FIGURA 1

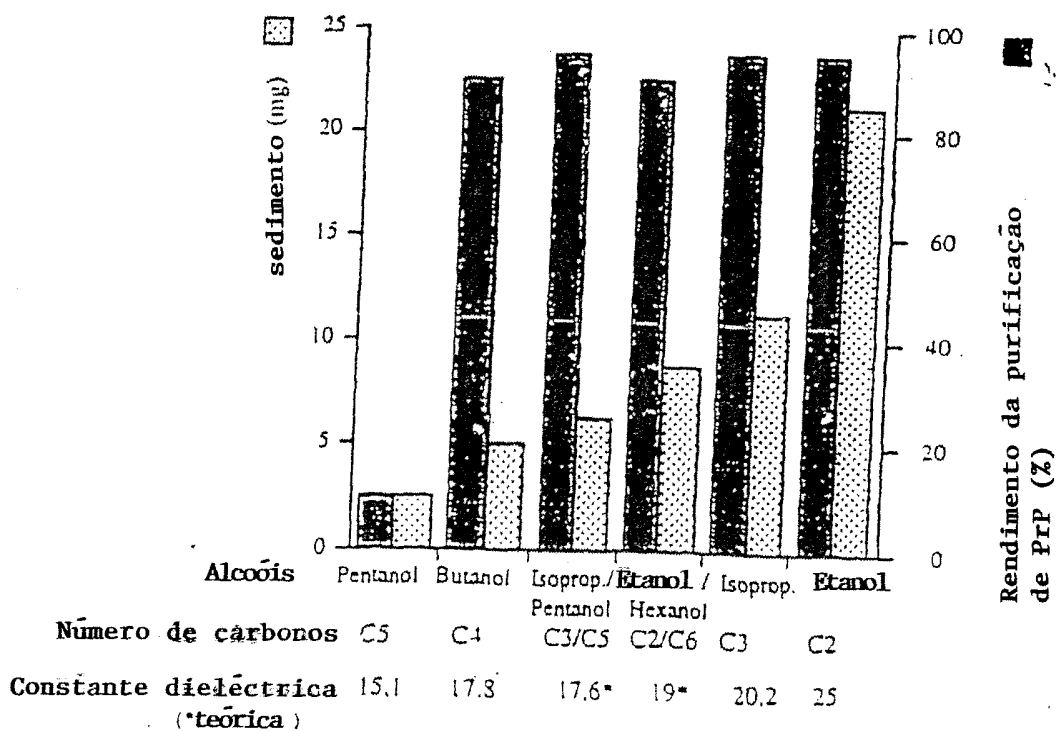


FIGURA 2

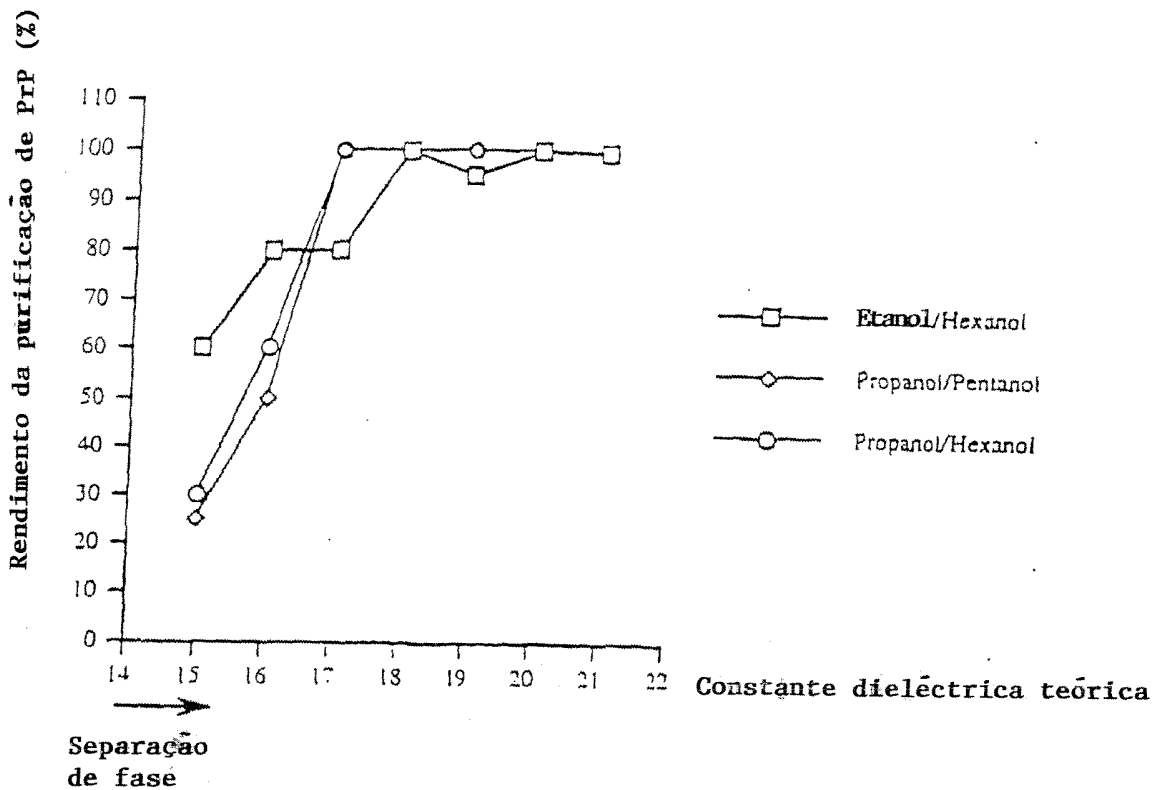


FIGURA 3A

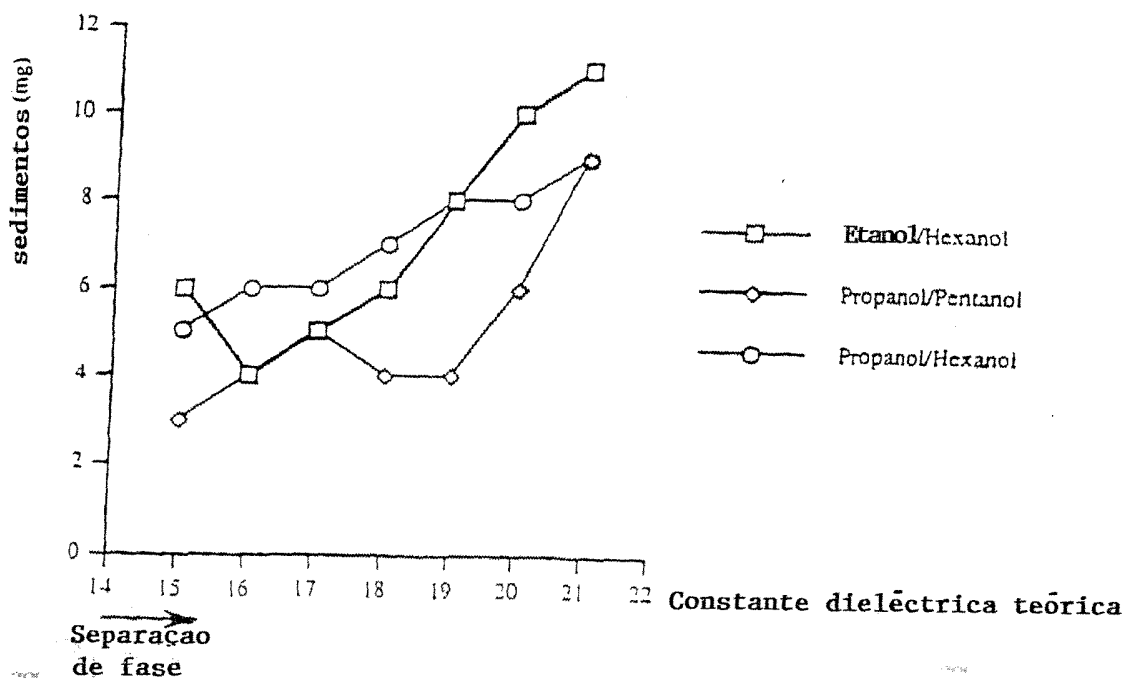
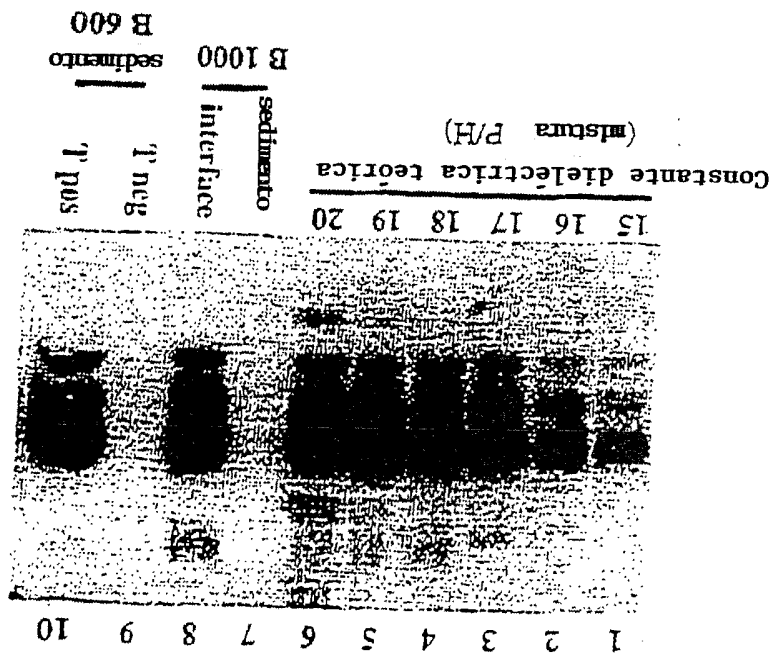


FIGURA 3B

Figura 4



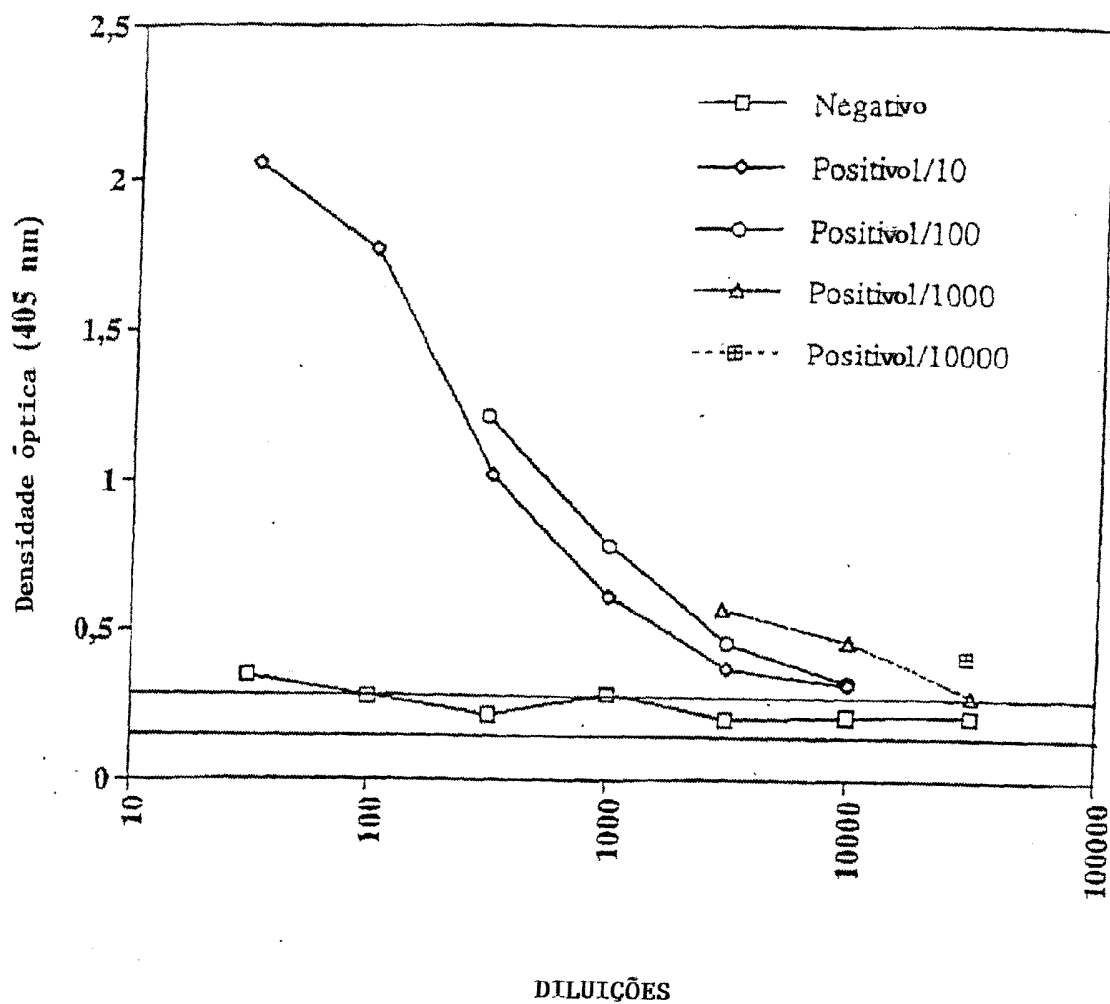


FIGURA 5

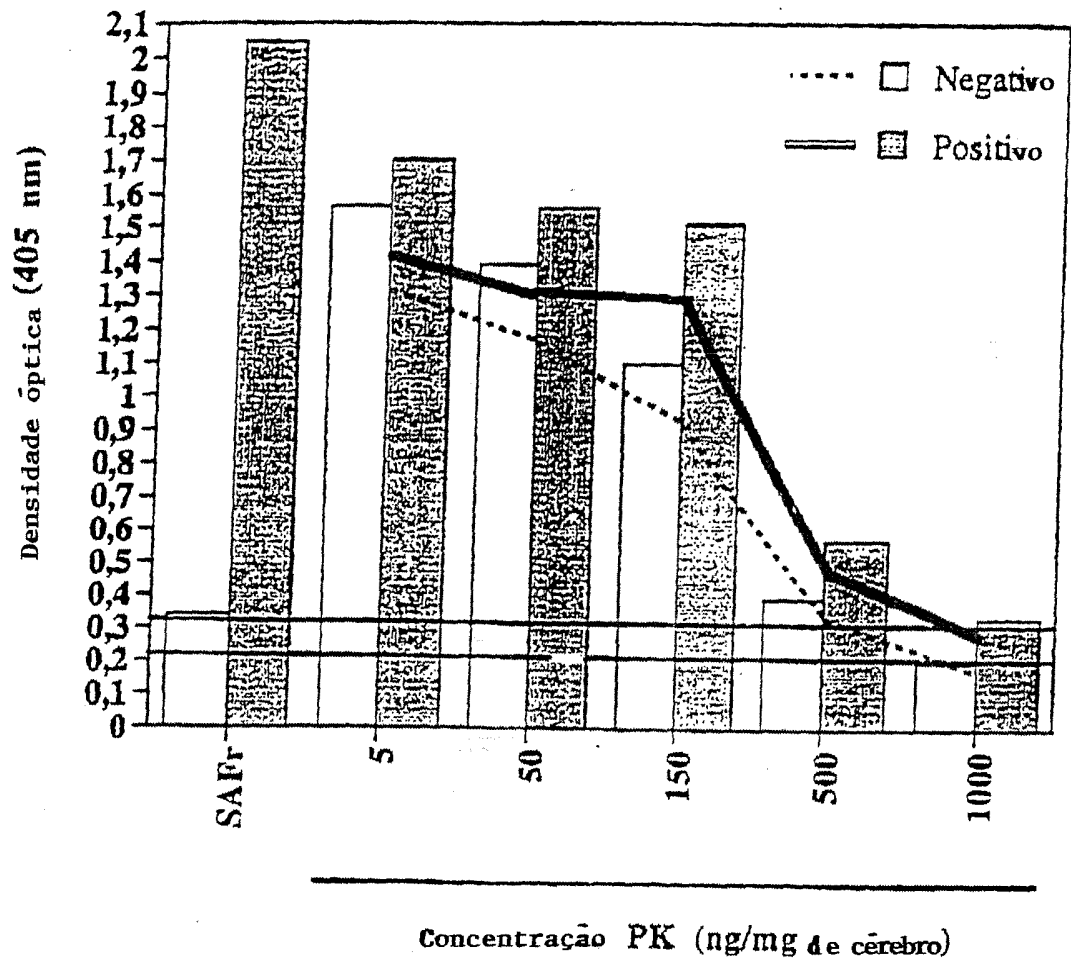


FIGURA 6

