

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 164**

51 Int. Cl.:

A61L 2/26 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 41/02 (2006.01)

A01N 41/04 (2006.01)

A01N 41/10 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

A61L 2/08 (2006.01)

A61L 2/16 (2006.01)

A61L 2/025 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02709900 .1**

96 Fecha de presentación: **31.01.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1370303**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2003**

54 Título: **DESINFECCIÓN DE PRIONES.**

30 Prioridad:
07.02.2001 AU PR293801

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73 Titular/es:
Novapharm Research (Australia) Pty Ltd
3-11 Primrose Avenue
Rosebery, NSW 2018, AU

72 Inventor/es:
KRITZLER, Steven;
SAVA, Alex y
ZALUNARDO, Michael

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

ES 2 370 164 T3

DESCRIPCION

Desinfección de priones

5

CAMPO TECNICO

La invención se refiere a composiciones y métodos para la inactivación de priones y a medios para desinfectar materiales contaminados por los priones o por proteínas similares conformacionalmente alteradas.

10 ANTECEDENTES

Históricamente, los agentes infecciosos como por ejemplo las bacterias, hongos, parásitos y viroides tienen métodos de control bien establecidos que implican varias formas de desinfección y esterilización (por ejemplo, esterilización por vapor, esterilización en seco, pasteurización, filtración estéril, tratamiento con óxido de etileno, glutaraldehído, fenoles, u otras substancias químicas desinfectantes, radiación, etc.). Con los virus se han establecido también métodos como por ejemplo, la disminución del pH a 4,0 ó inferior, calentando a 60 °C durante períodos prolongados, o el empleo de disolventes orgánicos en altas concentraciones. Además, han sido empleados el tratamiento con radiación UV, con formaldehído y con agentes específicos antiviricos.

Desde hace algunos años, han aparecido nuevas y anteriormente desconocidas especies de agentes patogénicos que han sido dados a conocer en publicaciones científicas. Estos han recibido el nombre de priones y hoy en día constituyen uno de los mayores desafíos de cara a la industria del cuidado de la salud. Los priones son partículas infecciosas diferentes de las bacterias y de otros agentes infecciosos anteriormente conocidos. Aunque no existe ninguna firme evidencia sobre la exacta estructura de los priones, un número de enfermedades han sido identificadas recientemente tanto en seres humanos como en animales, que parecen ser imputables a los priones. Como se detalla en la patente internacional PCT/US00/14353 (el contenido de la cual se incorpora a la presente como referencia) las enfermedades humanas atribuidas a los priones incluyen el Kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad de Gertsman-Straussler-Scheinker (GSS), y el llamado insomnio familiar fatal (FFI).

Además de las enfermedades de los priones en humanos, trastornos de los animales se incluyen en el grupo de enfermedades conocidas de los priones. La tembladera de las ovejas y cabras es la enfermedad animal causada por priones más estudiada. Varias líneas de investigación han sugerido una conexión entre la variante CJD y una epidemia anterior de encefalopatía espongiforme bovina (BSE). Ningún tratamiento terapéutico con éxito ha sido desarrollado y como resultado, estas enfermedades resultan siempre fatales. Adicionalmente al problema, existe el hecho de que el período de incubación puede ser de hasta 30 años en los humanos y este factor presenta implicado un mayor desafío a los científicos, con algunos que predicen una epidemia "in the pipeline" ("en la tubería").

Los grupos con posibilidad de riesgo de infección incluyen pacientes que pueden haber tenido contacto con instrumentos médicos infectados durante la cirugía, el equipo médico que disecciona material infectado, y trabajadores de la salud responsables de la limpieza e instrumentos de esterilización. Existe también la preocupación de que los grupos de riesgo se amplíen para incluir veterinarios, trabajadores de los mataderos, carniceros en contacto con vacas o bueyes, primordialmente en Europa y más recientemente aquellas personas que han recibido transfusiones sanguíneas u órganos de donadores que incubaban una enfermedad por priones.

La estructura de los priones ha sido el objeto de intensas investigaciones y se han dado a conocer diferentes puntos de vista. Algunos científicos creen que son virus extremadamente pequeños, mientras que la mayor parte de expertos creen que los priones son en realidad proteínas infecciosas sin un núcleo de ADN ó ARN. Más particularmente, el consenso ahora es que el gen PrP de los mamíferos expresa una proteína que puede ser la forma celular soluble PrP^c, no causante de la enfermedad, o puede ser una forma insoluble PrP^{sc} causante de la enfermedad. Muchas líneas de evidencia indican que las enfermedades por priones son el resultado de la transformación de la forma celular normal en la forma anormal PrP^{sc}. No existe ninguna diferencia detectable en la secuencia de aminoácidos de las dos formas. La forma PrP^c se compone de una proteína de 33-35 kDa altamente asociada a la membrana, la cual proteína se degrada durante la digestión mediante la proteasa K. Sin embargo, la forma PrP^{sc} tiene una forma conformacional alterada, en particular tiene un alto nivel de conformación de láminas de β. Las propiedades de la PrP^{sc} de utilidad en el diagnóstico de la forma infecciosa conformacionalmente alterada son un núcleo resistente a la proteasa de 27-30 kDa. Otra característica distintiva de la forma infecciosa conformacionalmente alterada es que la misma adquiere un núcleo hidrofóbico.

Los agentes convencionales de desinfección y esterilización no tienen ningún efecto significativo sobre los priones en un tiempo aceptable. Las tentativas para desactivar los priones y/o desinfectar las superficies sobre las cuales podrían ser transmitidos han demostrado una extraordinaria resistencia. Las condiciones requeridas son generalmente demasiado severas para ser prácticas para la desinfección rutinaria, no solamente en términos de tiempo y de coste sino también en términos de daños a los materiales y los riesgos ocupacionales de la salud implicados. Por ejemplo en un estudio, se han detectado partículas infecciosas de PrP^{sc} en una muestra después de 5-15 minutos/600 °C de calor seco aunque la total destrucción pudo lograrse a 1000 °C en 15 minutos y en 1-10 horas a > 200°C. Se ha propuesto un tratamiento con sosa cáustica 1M (pH 14) durante 2 horas pero dicho

tratamiento es extremadamente corrosivo, peligroso para el personal, y agresivo para los materiales. La patente US 5633349 describe un procedimiento para el tratamiento de un material biológico que comprende el tratamiento con urea 6-8 molar ó 1-2 molar de tiocianato de sodio durante un mínimo de 12 horas (de preferencia 18 horas) el cual tiene las mismas desventajas.

Debido a las dificultades de descontaminación, se ha propuesto como preferente para los instrumentos quirúrgicos empleados en la cirugía cerebral, que deben ser empleados solamente una vez, pero esto implica un riesgo de eliminación, además de que es caro e impracticable para algunos instrumentos. La patente internacional PCT/US00/14353 describe un método que convierte los priones en no infecciosos mediante el empleo de un dendrímero policationico, pero no está claro si dicho proceso es reversible o permanente o comercialmente viable para la desinfección de superficies.

Aunque la atención se ha enfocado sobre la forma PrP^c y la forma PrP^{Sc}, se ha sugerido también que la proteína puede existir en una forma intermedia la cual tiene un contenido en láminas β intermedio entre la estructura de hélice alfa predominante en la forma PrP^c y la conformación predominante de láminas β en la forma PrP^{Sc} la cual retiene la solubilidad en ausencia de un desnaturizante.

El montaje o mal montaje de las proteínas normalmente solubles, en proteínas insolubles conformacionalmente alteradas, se piensa que es causa de, o implica, una variedad de otras enfermedades. Aunque la invención se describirá en la presente en relación con los priones, se comprenderá que es aplicable a otras proteínas o enzimas resistentes insolubles conformacionalmente alteradas, implicadas en la enfermedad.

La descripción anterior de la técnica antigua no se ha efectuado como una admisión con respecto al conocimiento común general en Australia.

Un objetivo de la invención es el de proporcionar unos medios perfeccionados, o por lo menos alternativos, de desinfectar una superficie infectada con priones. En ciertas versiones preferidas la invención convierte a los priones en inactivos más eficazmente, es decir más efectivamente en un tiempo dado, o con eficacia en un tiempo más corto que los métodos de la técnica antigua. Ciertas versiones altamente preferidas de la invención consiguen una reducción en más de 4 log en menos de 60 minutos por debajo de 60 °C. En algunas versiones de la invención, es también aplicable a los priones en situaciones distintas a las de encima de las superficies por ejemplo en una suspensión en un medio sólido, líquido o gaseoso o sistemas biológicos y puede tener otros empleos in vitro o in vivo. Es un objetivo de algunas de las descripciones de la solicitud el proporcionar herramientas de diagnóstico perfeccionadas y otras versiones para proporcionar nuevos epímeros para la preparación de anticuerpos.

El término "proteína prión" como se emplea en la presente, incluye variantes, fragmentos, fusiones, y análogos que tienen otras interacciones o actividades que son substancialmente las mismas que los de una secuencia de proteína prión de longitud completa, pero que puede ser más conveniente para emplear e incluye todas las formas de una estructura secundaria. El término se emplea en la presente también para incluir substitutos de prión, es decir proteínas que no son ellas mismas priones sino que tienen una estructura similar o exhiben un comportamiento similar a los priones y pueden emplearse como modelos o para predecir cómo un prión actuará bajo unas condiciones específicas. El término "proteína prión PrP^{Sc}" se pretende que tenga un amplio significado similar, pero está limitado a las proteínas priones que por virtud de su estructura secundaria o terciaria son resistentes a las enzimas e incluyen conformaciones que son similarmente resistentes a las enzimas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto, la presente solicitud proporciona un método de desinfección que comprende los pasos de tratamiento de una superficie contaminada con una proteína prión PrP^{Sc} ó un substituto de la misma, simultáneamente con una combinación de (1) una o más enzimas efectivas para escindir una proteína prión en fragmentos que tienen un peso molecular no infeccioso, y (2) uno o más agentes seleccionados para favorecer el desplegado conformacional de la proteína prión PrP^{Sc} a la vez que no desnaturiza la (o las) enzima(s).

De acuerdo con un segundo aspecto, la solicitud proporciona un método de acuerdo con el primer aspecto, que incluye además (3) uno o más agentes seleccionados para promover o proteger el plegado de la o de las enzimas, sin impedir la escisión de la proteína prión. De preferencia, las condiciones se seleccionan para favorecer el desplegado más que el plegado.

Actualmente se acepta que las proteínas que tienen un peso molecular inferior a 27 kDa son no infecciosas y seguras, y en consecuencia el método de la solicitud prevé la digestión o escisión del prión en fragmentos de los cuales por lo menos un 90% y de preferencia por lo menos un 98% sean inferiores a 27 kDa, y de preferencia inferiores a 25kDa, ó con mayor preferencia inferiores a 23 kDa. Sin embargo, si en el futuro se encontrase una proteína inferior a 27 kDa que fuera infecciosa, podría utilizarse el método de la solicitud para fragmentar la proteína en fragmentos de cualquier tamaño que fuera seguro.

El término "substituto del prión" como se emplea en la presente, está de acuerdo con la definición de la FDA, es

decir, son aquellas proteínas que tienen una resistencia similar a las proteasas debido a la presencia del plegado β .

El término "agente" se emplea en la presente para incluir tanto los reactivos químicos, por ejemplo surfactantes aniónicos, los reactivos para modificar el pH, y también los agentes no químicos que afectan las condiciones físicas y/o termodinámicas como por ejemplo la presión, la temperatura, la irradiación y otras influencias energéticas que promueven el plegado o el desplegado según necesita el contexto. Los agentes de plegado algunas veces reciben el nombre de agentes de "replegado". Los agentes de desplegado algunas veces reciben el nombre de agentes de "desnaturalización".

De acuerdo con un tercer aspecto, la descripción proporciona un método de acuerdo con el primer o segundo aspecto en donde dicho o dichos agente(s) seleccionado(s) para favorecer el desplegado conformacional, incluye(n) uno o más agentes seleccionados del grupo formado por la irradiación, el campo eléctrico, el campo magnético, la vibración energética y las combinaciones de los mismos.

En otras descripciones, se emplea una combinación de agentes químicos y físicos como por ejemplo los agentes del paso (2) que incluyen un surfactante aniónico en combinación con la sonicación mediante ultrasonidos.

De preferencia, el prión es sometido a ondas sónicas en el margen ultrasónico durante el tratamiento. Sin embargo, el desplegado puede ser inducido o ayudado por otras formas de radiación como por ejemplo la radiación de microondas, la radiación de radiofrecuencia, el infrarrojo, el espectro visible ó de U.V., sonido de frecuencia audible o baja frecuencia, vibración energética por medios mecánicos como por ejemplo la agitación magnética o el vortex. Otras formas de aporte energético pueden incluir desde la irradiación por haces de electrones, la irradiación con láser, o la electrolisis.

De acuerdo con otros aspectos, las descripciones incluyen composiciones para emplear en la realización del método, nuevos fragmentos de prión producidos por el método y nuevos anticuerpos producidos por dichos fragmentos.

De acuerdo con la descripción, una superficie contaminada, por ejemplo un instrumento quirúrgico contaminado con una proteína PrP^{Sc}, se trata con una combinación de: (1) una o más enzimas efectivas para escindir la proteína prión en fragmentos de un peso molecular no infeccioso, (normalmente, menos de 27 kDa), y (2) uno o más agentes seleccionados para favorecer el desplegado conformacional de la proteína prión.

La proteína PrP^{Sc} es característicamente resistente al ataque por enzimas incluyendo las enzimas proteolíticas. Sin desear estar unidos a una teoría, los presentes inventores suponen que la resistencia de la proteína PrP^{Sc} a ser atacada por enzimas es una consecuencia de la conformación plegada (teniendo una estructura secundaria de alto ratio de lámina β , con relación a la estructura de hélice alfa). La descripción abarca la concepción de que es posible seleccionar uno o más agentes para promover, en condiciones seleccionadas, el desplegado de la proteína PrP^{Sc} de manera suficiente para que una enzima consiga acceder y escindir la proteína PrP^{Sc}.

Muchas proteínas tienden a perder su modelo de plegado natural en tres dimensiones ("estructura secundaria y terciaria") y convertirse en "desnaturalizadas". La desnaturalización incluye la ruptura de la interacción intermolecular, especialmente los enlaces de hidrógeno y de disulfuro, y de esta forma la pérdida de la estructura secundaria que virtualmente tienen todas las proteínas activas, por lo menos en partes de la molécula, la cual generalmente es de forma decisiva responsable de la actividad de la proteína.

Los expertos en la técnica apreciarán que las enzimas son en si mismas, proteínas, y tienden a ser fácilmente desnaturalizadas por agentes que promueven el desplegado de la proteína.

No está claro si esto es porque el agente del desplegado se une a la enzima, impidiendo que la enzima se una a un sustrato objetivo, o es probablemente porque el agente de desplegado promueve el desplegado de la estructura conformacional de las enzimas, convirtiéndolas en inactivas o "desnaturalizadas" o una combinación de estos efectos. La proteína PrP^{Sc} es por otro lado, altamente resistente al desplegado. Hasta ahora se ha considerado imposible formular un sistema en el cual una enzima retenga la actividad en presencia de un agente efectivo de desplegado para influenciar dicha proteína insoluble como la PrP^{Sc}. Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que o bien (i) ciertos agentes del desplegado despliegan selectivamente o relajan la proteína PrP^{Sc}, mientras que no despliegan (desnaturalizan) una enzima seleccionada, ó (ii) los agentes de plegado y desplegado pueden combinarse de tal forma que el agente de plegado promueva o retenga selectivamente la actividad de la enzima mientras que el agente del desplegado despliega selectivamente y suficientemente el prión para proporcionar un acceso a la enzima para la escisión del prión.

Estas aspiraciones intrínsecamente conflictivas se cumplen en la presente solicitud, clasificando los agentes como promotores del "plegado" o "desplegado" y a continuación determinando su efecto relativo sobre las enzimas y sobre la proteína PrP^{Sc} ó un sustituto de la misma.

La superficie puede ser tratada en primer lugar con uno o más agentes y subsiguientemente pueden añadirse una o

más enzimas, pero en versiones preferidas la superficie que recibe el tratamiento, es sometida simultáneamente a ambos tratamientos.

La enzima descrita puede ser una enzima proteolítica. Dichas enzimas son:

- proteinasas no específicas: por ejemplo, la serina, aspártico, metaloproteinasa,
- proteinasas más específicas, - por ejemplo, las queratinasas, las colagenasas, etc.
- y otra(s) enzima(s) que posee(n) actividad proteolítica

Se escogen uno o más agentes seleccionados para favorecer el desplegado conformacional de la proteína príon, para que sea efectiva para proporcionar un acceso mediante la enzima a la proteína príon.

En general, el plegado-desplegado de una cadena de polipéptido puede ser un proceso de equilibrio termodinámicamente reversible o puede ser irreversible.

Solamente a título de ejemplo, los agentes que promueven el desplegado (desnaturalización) incluyen:

(1) Calor - aumento de temperatura hasta aproximadamente 150 °C

(2) Valores de pH inferiores a 3 y superiores a 9 (efecto global resultante de la ionización de muchos residuos de cadenas laterales accesibles al disolvente), o en algunas moléculas puede ser atribuible a efectos locales debidos a la ionización de grupos específicos (por ejemplo, serino proteasas debido a la ionización del grupo N-amino terminal del carboxilato).

(3) Disolventes orgánicos seleccionados de una clase que tienda a desnaturalizar, disolver o hinchar, proteínas. Generalmente los productos no están completamente desplegados y poseen una conformación ordenada que difiere de la del estado nativo. Los disolventes que favorecen las conformaciones en forma de helice (por ejemplo, desplegado), están ejemplarizados por la N-dimetilformamida, la formamida, el m-cresol, el dioxano, el CHCl_3 , la piridina, el dicloroetileno, y el 2- cloroetanol. Este grupo incluye también disolventes que tienen una tendencia a formar enlaces de hidrógeno como por ejemplo, los alcoholes, el etanol, el n-propanol, el metanol (especialmente en mezclas con 0,01% de HCl). También disolventes que tienen tendencia a desorganizar la estructura por ejemplo el sulfóxido de dimetilo (DMSO) a altas concentraciones, ácido dicloroacético y ácido trifluoroacético, y otros disolventes electrofílicos.

(4) Ciertos solutos orgánicos y agentes caotrópicos. - Como por ejemplo la urea, el hidrocloreuro de guanidina (GuHCl). La transición a un polipéptido al azar en espiral es completa para el GuHCl 6-8M a la temperatura ambiente, excepto para algunas proteínas excepcionalmente estables. Estos agentes pueden ser marcadamente influenciados por la temperatura, por el pH, por otros reactivos y por las condiciones.

(5) Ciertos surfactantes. - Los surfactantes iónicos tienden a unirse a las proteínas e iniciar el desplegado de la estructura terciaria. Los detergentes aniónicos son muy fuertes desnaturalizantes. Por ejemplo el dodecilsulfato de sodio (SDS) es capaz de desplegar completamente muchas proteínas (pero no todas) a concentraciones próximas a la concentración crítica de las micelas. El dodecilsulfato de sodio es también un desnaturalizante. Los detergentes no dan necesariamente un completo desplegado ya que en algunos casos parece que la parte hidrofóbica del detergente podría interactuar con la estructura ordenada de la proteína para formar regiones micelares. Los surfactantes catiónicos son habitualmente agentes menos efectivos de desplegado que los surfactantes aniónicos. La tendencia de los dodecilsulfatos a desnaturalizar la albúmina del suero bovino (BSA) disminuye al aumentar los grupos etoxilo y desaparece cuando el número de etoxilos es superior a seis.

(6) Las sales inorgánicas pueden inducir transiciones conformacionales en las proteínas. Por ejemplo el LiBr , el CaCl_2 , el KSCN , el NaI , el NaBr , la azida de sodio, son fuertes desnaturalizantes. Aunque estas sales no conducen necesariamente al completo desplegado de la proteína, la estructura residual ordenada puede ser interrumpida mediante un aporte de energía, por ejemplo aumentando la temperatura. Los aniones como por ejemplo $\text{CNS}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{SO}_4^{2-}$, presentan un comportamiento similar al de las sales de guanidino y las sales de tetraalquilamonio. Sin embargo, el $(\text{GuH})_2\text{SO}_4$ se ha observado que protege a ciertas proteínas frente a la desnaturalización.

(7) Los agentes que ocasionan la escisión del enlace S - S como por ejemplo los tioglicoles.

(8) Otras sustancias con una fuerte afinidad tanto con los residuos hidrofílicos como con los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos.

(9) Adsorción sobre ciertas superficies e interfases, incluyendo las zeolitas, incluyendo las interfases aire/líquido.

(10) La energía ultrasónica, la radiación de infrarojos y microondas, la alta presión, y el sometimiento de los protones a la acción de campos eléctricos y/o magnéticos, pueden ser capaces de promover el desplegado (replegado), e incluso el sacudir o el agitar puede tener una influencia.

En ciertas formas de la solicitud, se emplea una combinación de agentes, por ejemplo un surfactante y/o un disolvente adecuado con ultrasonidos. No está claro si el aporte de energía, como por ejemplo de ultrasonidos, ayuda a conducir el equilibrio plegado/desplegado en favor del desplegado de la proteína PrP^{Sc} a una mayor velocidad de la que lo hace al desnaturalizar la enzima, o si meramente ayuda en proporcionar un acceso de los reactivos o de las enzimas al prión, o de si es activo en la activación de la enzima. Otros métodos de aplicación de energía incluyen la aplicación de ondas sónicas en el margen sub-sónico. Sin embargo, la vibración energética puede ser inducida por otras formas de radiación electromecánica o vibración energética de medios mecánicos como por ejemplo la agitación magnética o con vortex. Otras formas de aporte energético pueden incluir la irradiación con rayos de electrones, láser, o electrolisis.

Como se ha indicado más arriba, cabría esperar que la mayor parte de los agentes de desplegado descritos desnaturalizaran efectivamente la enzima. O bien el agente de desplegado y sus condiciones de empleo deben ser cuidadosamente seleccionados como para permitir la digestión de la proteína PrP^{Sc} ó de su sustituto sin desnaturalizar la enzima, o alternativamente el agente de desplegado desde ser combinado con un agente de plegado.

Los agentes de plegado como se han descrito, incluyen:

(1) Agentes nucleofílicos y disolventes orgánicos altamente unidos a hidrógeno. Existe una competición entre la energía de los enlaces de hidrógeno del péptido y la fuerza de los enlaces de hidrógeno entre las moléculas del disolvente. Cuando las moléculas del disolvente están unidas mediante fuertes enlaces de hidrógeno, el equilibrio se desplaza hacia la estabilización de los enlaces de hidrógeno del péptido. Los disolventes como por ejemplo el dioxano, el acetonitrilo, la dimetilformamida, la piridina, y a bajas concentraciones, el sulfóxido de dimetilo (DMSO), que son buenos receptores de protones pero débiles dadores de protones tienen una tendencia muy débil a romper los enlaces de hidrógeno del péptido y tienden a inducir una conformación ordenada, especialmente en las proteína globulares.

(2) Los disolventes estabilizadores como por ejemplo los alcoholes polihídricos (por ejemplo la glicerina, el etilenglicol, y el propilenglicol, la sucrosa y similares) los cuales son débilmente próticos y en presencia de los cuales las proteínas tienden a permanecer conformacionalmente estables y pueden utilizarse como agentes de estabilización.

(3) Los surfactantes no iónicos como por ejemplo los etoxilatos de alquilo, fenilo o etoxilatos de alquilo, propoxilatos o copolímeros de los mismos, alquilpoliglucósidos, etc., sarcosinatos (por ejemplo el sarcosinato de sodio – (N-lauroilo)), no alteran la estructura terciaria de la proteína y tiene lugar cualquier desplegado en la región de las isotermas en donde empieza un aumento significativo de la unión de surfactante mediante la interacción cooperativa no específica. El efecto del SDS puede reducirse mediante la adición de surfactantes no iónicos o anfóteros.

(4) Surfactantes bipolares y anfóteros,

(5) Altas concentraciones de tampones (por ejemplo, fosfatos, acetatos, citratos, boratos)

(6) Homopolímeros, copolímeros, o polímeros en bloques, surfactivos, los cuales contienen zonas débilmente hidrofobas y zonas débilmente hidrófilas, dispuestas alternadamente,

(7) Agentes protectores como por ejemplo compuestos sulfatados, desoxicolato, glicosaminoglicanos. Si un agente de plegado se combina con un agente de desplegado (desnaturalización), entonces los agentes y las condiciones deben ser seleccionados para proteger o replegar la enzima mientras tiene lugar el desplegado irreversible o por lo menos mientras el prión se abre lo suficiente para que la enzima pueda tener acceso. Por ejemplo, el pH y/o la temperatura pueden seleccionarse de forma que el agente de plegado actúe selectivamente sobre la enzima mientras que el agente de desplegado actúa selectivamente sobre la proteína PrP^{Sc}.

LAS MEJORES MODALIDADES DE EFECTUAR LA INVENCION

Se emplearon la albúmina bovina con un alto contenido de globulina (producto Sigma A7906), la beta-galactosidasa (G7279) y la miosina del músculo de conejo (M0163), como modelos de proteínas con baja solubilidad y alto contenido en láminas-beta. El peso molecular de las proteínas anteriores son significativamente más grandes que el de los priones. La identificación de la masa molecular de los fragmentos de péptidos después de la digestión enzimática es más fácil cuando la mayor parte de proteasas empleadas en el experimento tienen una masa molecular (20-35 KDa) similar a la de los priones.

- Se efectuó un SDS-PAGE empleando el método descrito por Laemmli, Reino Unido, Nature ("Naturaleza"), 227, paginas 680-685, (1970). La solución de proteína se hirvió durante 2 minutos en un tampón de muestra conteniendo el 2% de SDS. Se cargó 1,5 mm de gel de recubrimiento (8-12%) con 10 microlitros de proteína por calle y se sometió en condiciones no reductoras (es decir, ningún betamercaptoetanol en el tampón de muestra). Se efectuó la electroforesis durante 1 hora a 150 V, hasta que el frente de colorante fue al fondo del gel. A continuación se retiró el gel y las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción, bien con azul brillante Coomassie R-250 (Sigma) o con plata (Bio-Rad). El valor de la masa molecular para las proteínas se determinó empleando una curva de calibración obtenida con marcadores de peso molecular bajo pretintados (marcador Bio-Rad 161-0318).
- La escisión de las proteínas se consideró suficiente cuando ya no se detectó ningún fragmento con una masa molecular mayor de 14,4 KDa (peso molecular de la lisozima) después de la acción combinada de los agentes de desplegado y las enzimas. Esto indicó que el tratamiento fue efectivo sobre el sustituto.
- Cuando estuvieron presentes fragmentos del péptido con una masa molecular mayor de 14,4 KDa, los resultados se registraron como positivos.
- Para probar que el método de la invención puede ser empleado para desactivar priones, y no simplemente escindir el sustituto, se empleó el ensayo de detección del prión desarrollado por la firma Prionics AG. El "Prionics-Check" ("ensayo Prionics") es un ensayo inmunológico para la detección de priones en tejidos animales, que emplea un nuevo anticuerpo desarrollado por PRIONICS AG. La PrP^{Sc} que queda en la mezcla de reacción, es unida por el anticuerpo y se detecta empleando una enzima copulada con el anticuerpo.
- Alícuotas de 100 ml de las soluciones como se han descrito en la tabla 1 fueron tratadas con aproximadamente 1 microgramo de proteína prión recombinante y se efectuó el ensayo Prionics según el procedimiento que se describe en el apéndice 1.
- Cuando la PrP^{Sc} se detectó después de la digestión enzimática, los resultados se registraron como positivos. La tabla 1 muestra que en los experimentos de control, los fragmentos 1-1 a 6-1 que tenían una masa mayor de 14,4 KDa, se detectaron como PrP^{Sc}. Sin embargo en los experimentos 1-2 a 6-2 no se detectó ningún fragmento con una masa mayor de 14,4 KDa y no se detectó ninguna PrP^{Sc}.
- 1-1 difiere de 1-2 por la inclusión de un agente de desplegado (3% de DOBS) que muestra ser efectivo en 30 minutos a 70 °C.
- 2-2 y 3-2 difieren de 2-1 y 3-1 respectivamente por la inclusión de sonicación. En 2-2, fue efectivo un agente de desplegado 3% de DOBS en combinación con 25% de Terric a 164 (un agente de plegado) fue efectivo a 25 °C con sonicación a 40 kHz. En 3-2 se obtuvo un resultado similar con un 10% de SDS como agente de desplegado y un surfactante bipolar como agente de plegado a 2,6 mHz. 4-2 difiere de 4-1 por la combinación de bórax con SDS a temperatura más elevada. 5-2 difiere de 5-1 por la combinación de DOBS con Triton X-100 en ausencia de boro.
- 6-2 difiere de 6-1 por el aumento de la concentración de DMSO del desplegado reversible (0,05%) al desplegado irreversible (0,5%).

TABLA 1

Nº	Procedimiento de ensayo/soluciones	SDS-PAGE Albúmina	SDS-PAGE beta- galactosidasa	SDS-PAGE miosina	Ensayo Priónics
1-1	Agua destilada Calentar a 70 °C Mantener en baño María a 70 °C durante 30 minutos , 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 Enfriar a 25 °C	+	+	+	+
1-2	3 % de DOBS y agua destilada, <i>diluido 1:100</i> Calentar a 70 °C Mantener en baño María a 70 °C durante 30 minutos , 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 Enfriar a 25 °C	-	-	-	-
2-1	3 % de DOBS, 25% de Terric 164, <i>diluido 1:100</i> 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 °C durante 30 minutos	+	+	+	+
2-2	3 % de DOBS, 25% de Terric 164, <i>diluido 1:100</i> 15 unidades de actividad de proteasa por ml, sonicado con ultrasonidos a 40 kHz	-	-	-	-

	25 ° C durante 30 minutos				
3-1	10 % de SDS, 10% de Empigen BS/AU (surfactante bipolar), <i>diluido 1:100</i> , 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C durante 30 minutos	+	+	+	+
3-2	10 % de SDS, 10% de Empigen BS/AU (surfactante bipolar), <i>diluido 1:100</i> , 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C sonificado a 2,6 mHz, durante 30 minutos	-	-	-	-
4-1	10% de SDS, 4% de bórax, <i>diluido 1:100</i> 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C durante 30 minutos	+	+	+	+
4-2	10% de SDS, 4% de bórax, <i>diluido 1:100</i> 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 55 ° C durante 30 minutos	-	-	-	-
5-1	15% de DOBS, 5% de Triton X100, 4% de bórax, <i>diluido 1:100</i> 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C durante 30 minutos	+	+	+	+
5-2	15% de DOBS, 5% de Triton X100, <i>diluido 1:100</i> 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C durante 30 minutos	-	-	-	-
6-1	0,05% de DMSO 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C durante 30 minutos	+	+	+	+
6-2	0, 5% de DMSO 15 unidades de actividad de proteasa por ml, pH 9 25 ° C durante 30 minutos	-	-	-	-
DOBS = ácido dodecil benzeno sulfónico (Producto Sigma nº D2525) DMSO = sulfóxido de dimetilo (Producto Sigma nº D5879) Proteasa = Subtilisin Carlsberg (Producto Sigma nº P5380) Sonicación a 40 kHz efectuada empleando un baño de ultrasonidos suministrado por UNISONICS Pty Ltd. Sonicación a 2,6 mHz efectuada empleando un nebulizador de ultrasonidos de la firma Disonics Pty Ltd.					

APENDICE 1

MÉTODO DE ENSAYO DE COMPROBACION PRIONICS

El protocolo que sigue a continuación esboza el empleo del núcleo resistente de la proteasa de PrP^{Sc}, de una fuente de recombinante conocida por ser representativa del agente infeccioso que tiene lugar de manera natural. Ha sido probado experimentalmente que el núcleo resistente de la proteasa del prión no es infeccioso, pero indica la presencia de agentes infecciosos

1. Pesar 1 microgramo de PrP^{Sc} u homogeneizado de cerebro de animal infectado con BSE, el cual contiene 1 mcg ó PrP^{Sc} y reconstituirlo en 1 ml de agua desionizada.
2. Añadir a 10 ml de solución de ensayo y someter al protocolo de desactivación apropiado.
3. Tomar un alícuota del 10 microlitros de la solución de ensayo y añadirlo a 10 microlitros de tampón de muestra.
4. Efectuar el SDS-PAGE de:

- la solución de PrP^{Sc} sin tratar empleada para sembrar (control positivo)
- la solución en estudio

Todas las proteínas o fragmentos de proteínas se separan en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño. Las proteínas pequeñas migran más deprisa que las proteínas grandes. Después de un período de tiempo, los fragmentos más pequeños de las proteínas del prión descompuesto migran fuera del gel mientras que los fragmentos de la PrP^{Sc} resistente estarán presentes en la mitad inferior del gel. En la muestra de control en donde la proteína del prión permanece resistente a la proteasa las moléculas de PrP^{Sc} no escindidas permanecerán más arriba en el gel.

1. Transferir las proteínas desde el gel hasta la membrana de nitrocelulosa en el Western blotting (transferencia Western).
2. Añadir los anticuerpos monoclonales (producto Priónics nº 01-020).
3. Dejar que se unan a las proteínas y a continuación arrastrar lavando los anticuerpos no unidos

4. La peroxidasa de rábano silvestre conjugado con anticuerpos primarios, se deja que reaccione con un sustrato de quimioluminiscencia (producto ECL nº RPN 2209 suministrado por AMERSHAM Life Science).
5. Exponer la membrana a una película de rayos X, y revelar la película.
6. 10. Dictaminar si la proteína prión está presente . Los resultados se registran como positivos cuando los anticuerpos quedan retenidos en la posición correspondiente a la masa molecular de la proteína del prión.

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico de desinfección, que comprende los pasos de tratamiento de una superficie, de una suspensión o de una solución contaminada con una proteína prión PrP^{Sc} ó un sustituto de la misma simultáneamente con una combinación de
(1) subtilisin Carlsberg, y
(2) ó :
a) ácido dodecilbenzenosulfónico (DOBS) Teric 164 y sonicación;
b) dodecilsulfato de sodio (SDS), Empigen BS/AU y sonicación;
c) SDS, bórax y una temperatura aumentada hasta 150 °C;
d) DOBS y Triton X100; ó
e) sulfóxido de dimetilo (DMSO) a una concentración a la cual el desplegado es irreversible;
en donde el DOBS, SDS, DMSO, la temperatura y la sonicación favorecen el desplegado conformacional de la proteína prión PrP^{Sc}, mientras que no desnaturalizan el subtilisin Carlsberg, y el Teric 164, el Empigen BS/AU, el bórax y el Triton X 100 promueven o protegen el plegado del subtilisin Carlsberg, sin impedir la escisión de la proteína prión.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento se selecciona de forma que después de la escisión resulte un predeterminado porcentaje de fragmentos de proteína que tienen un peso molecular inferior a un peso molecular predeterminado.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde por lo menos un 90% de fragmentos de proteína después de la escisión tienen un peso molecular inferior a 27 kDa.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde por lo menos un 90% de fragmentos de proteína después de la escisión tienen un peso molecular inferior a 25 kDa.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde por lo menos un 90% de fragmentos de proteína después de la escisión tienen un peso molecular inferior a 23 kDa.
6. Un métodos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las condiciones se seleccionan para proteger o replegar la subtilisin Carlsberg, desplegando de manera irreversible o por lo menos abriendo el prión de manera suficiente para que sea accesible a la subtilisin Carlsberg.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye además la combinación de uno o más agentes seleccionados para favorecer el desplegado conformacional seleccionado entre el grupo formado por la irradiación, el campo eléctrico, el campo magnético, la vibración energética, y combinaciones de los mismos.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la vibración energética es uno o varios de los ultrasonidos, la vibración electromagnética o la vibración mecánica.
9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, que incluye además en la combinación uno o varios agentes seleccionados para promover el desplegado seleccionados del grupo formado por el calor, el pH, los disolventes orgánicos de la clase que tienen tendencia a desnaturalizar las proteínas, los agentes caotrópicos, los surfactantes con tendencia a unirse con las proteínas, las sales inorgánicas que son fuertes desnaturalizantes de las proteínas, agentes que provocan la escisión del enlace S – S , las sustancias que tienen una fuerte afinidad para los residuos hidrófilos de los aminoácidos, las sustancias que tienen una fuerte afinidad para los residuos hidrófobos de los aminoácidos, las sustancias que promueven la adsorción sobre las superficies y combinaciones de los citados.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye además en la combinación uno o varios agentes de plegado seleccionados entre el grupo formado por los disolventes nucleófilos, los disolventes estabilizadores débilmente próticos, los surfactantes no iónicos, los surfactantes iónicos, los surfactantes bipolares y anfóteros, los tampones, los surfactantes homopolímeros, copolímeros o copolímeros en bloques, compuestos sulfatados, desoxicolato, glicosaminoglicanos y combinaciones de los citados.
11. Una composición para el tratamiento de una superficie contaminada con una proteína prión PrP^{Sc} ó un sustituto de la misma, la cual comprende:
(1) subtilisin Carlsberg,
y
(2) ó

- 5 a) DOBS y Teric 164;
b) SDS y Empígen BS/AU;
c) SDS y bórax;
d) DOBS y Triton X100; ó
e) DMSO a una concentración a la cual el desplegado es irreversible,
en donde los DOBS, SDS y el DMSO, favorecen el desplegado conformacional de la proteína prión PrP^{Sc}
10 , sin desnaturalizar el subtilisin Carlsberg, y el Teric 164, el Empígen BS/AU, el bórax y el Triton X 100
promueven o protegen el plegado de la subtilisina Carlsberg, sin impedir la escisión de la proteína prión.
12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente se selecciona de manera que después
de la escisión resulte un predeterminado porcentaje de fragmentos de proteína que tengan un peso molecular
inferior a un peso molecular predeterminado.
- 15 13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente se selecciona de manera que después
de la escisión resulte por lo menos un 90% de los fragmentos de proteína con un peso molecular inferior a los
27 kDa.
- 20 14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente se selecciona de manera que después
de la escisión resulte por lo menos un 90% de los fragmentos de proteína con un peso molecular inferior a los
25 kDa.
- 25 15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente se selecciona de manera que después
de la escisión resulte por lo menos un 90% de los fragmentos de proteína con un peso molecular inferior a los
23 kDa.