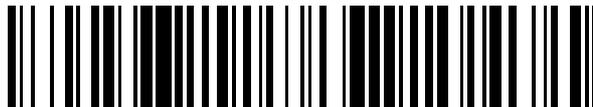


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 638**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2004 E 04758843 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1615992**

54 Título: **Materiales de unión de proteínas del prión y métodos de uso**

30 Prioridad:

04.04.2003 US 460474 P

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

03.01.2014

73 Titular/es:

**PATHOGEN REMOVAL AND DIAGNOSTIC
TECHNOLOGIES, INC. (50.0%)**

**1 Rodney Square
Wilmington, DE 19801, US y
NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BURTON, STEVEN J.;
HAMMOND, DAVID J.;
CARBONELL, RUBEN G.;
SHEN, HONGLUE;
GURGEL, PATRICK V. y
WILTSHIRE-LYERLY, VITEROSE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 436 638 T3

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

DESCRIPCIÓN

Materiales de unión de proteínas del prión y métodos de uso.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la unión de proteínas y más en particular se refiere a materiales que se unen a proteínas del prión y métodos para usar los materiales de unión de proteínas del prión para detectar o retirar priones de muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

10 La proteína del prión natural o celular "PrPc" está ampliamente distribuida por todos los mamíferos y tiene una secuencia de aminoácidos y estructura de proteínas particularmente bien conservada. Se cree que los priones infecciosos constan de una forma modificada de la proteína del prión celular normal (PrPc) y se denominan "PrPsc". Los priones presentan algunas propiedades en común con otros patógenos infecciosos, pero no parecen contener ácido nucleico. En su lugar, se propone que está implicado un cambio conformacional postraduccional en la conversión de PrPc no infecciosa en PrPsc infecciosa durante el que se transforman α -hélices en β -láminas. La PrPc contiene tres α -hélices y presenta estructura de pocas β -láminas; por el contrario, la PrPsc es rica en β -lámina. Se cree que la conversión de PrPc en PrPsc conduce al desarrollo de encefalopatías espongiiformes transmisibles (las TSE) durante el que se acumula PrPsc en el sistema nervioso central y va acompañado de cambios neuropatológicos y disfunción neurológica. La PrPsc, con frecuencia referida como la forma de "tembladera" de la proteína priónica, se considera necesariamente y posiblemente suficiente, para la transmisión y la patogenia de estas enfermedades neurodegenerativas transmisibles de animales y seres humanos.

20 Ejemplos específicos (por sus siglas en inglés) de las TSE incluyen tembladera, que afecta a ovejas y cabras; encefalopatía espongiiforme bovina (BSE); encefalopatía transmisible del visón, encefalopatía transmisible felina y enfermedad debilitante crónica (CWD). En seres humanos, las enfermedades TSE se pueden presentar como kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), insomnio fatal y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD). Recientemente surgió vCJD en seres humanos como resultado de la epidemia de BSE en Gran Bretaña y está causada lo más probablemente por el consumo de productos alimenticios procedentes de ganado infectado con BSE o "enfermedad de las vacas locas". Un número desconocido de personas en el Reino Unido ingirió alimentos potencialmente contaminados con tejido nervioso de ganado infectado por BSE durante mediados de los años 80 a principios de los años 90. Debido a que el periodo de incubación para la enfermedad contraída de manera oral puede ser mayor que 20 años en seres humanos, la verdadera frecuencia de vCJD puede no ser evidente durante muchos años. Hasta la fecha, se sabe que más de 150 personas han contraído la enfermedad, principalmente en el Reino Unido; sin embargo, se han indicado casos en Canadá, Francia, Hong Kong, Irlanda, Italia y los Estados Unidos. La exportación de productos alimenticios bovinos contaminados del Reino Unido en el mundo indica una posible presencia global de BSE y por lo tanto la probabilidad de vCJD. Concuerda con estas observaciones la detección de BSE en la mayoría de los países europeos, Japón, Canadá, Estados Unidos e Israel. Por consiguiente, la capacidad para detectar y retirar proteína del prión infecciosa de una variedad de materiales incluyendo productos alimenticios es de gran importancia.

35 Una característica de todas las TSE es la ausencia de una respuesta inmunitaria del huésped medible al agente. Por consiguiente, no se han identificado en la actualidad anticuerpos específicos para las TSE. Por otra parte, la ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos conocida excluye el uso de métodos de diagnóstico basados en la reacción en cadena de la polimerasa. Así, no se puede usar ningún ensayo serológico convencional para identificar animales infectados. Recientemente, se han usado técnicas con base inmunológica mejoradas para identificar PrPsc en cerebros de animales sacrificados.

40 Además de ingestión de productos infectados de origen bovino, la transfusión de sangre y el trasplante de órganos representan otro modo de transmisión de vCJD entre seres humanos. El riesgo de capacidad de transmitirse de vCJD en seres humanos por transfusión de sangre es desconocido en la actualidad, pero basándose en los datos de modelos animales experimentales que incluyen la transmisión de ovejas infectadas de manera experimental por vía oral con BSE y ovejas infectadas de manera natural con tembladera, parece ser una posibilidad muy probable y ya se ha justificado lo más probablemente para una transmisión de ser humano a ser humano de vCJD. A pesar de otras TSE humanas, la PrPsc está presente en el sistema linforreticular de pacientes de vCJD, aumentando de ese modo la probabilidad de que el agente infeccioso esté en la sangre y su transmisión por transfusión de sangre. Otros factores que elevan la preocupación por el riesgo de transmisión por transfusión incluyen los números desconocidos, pero presumiblemente altos, de personas expuestas a BSE y ausencia de un ensayo de diagnóstico preclínico para vCJD. Por otra parte, la virulencia de vCJD parece estar aumentada después de la adaptación de la especie en primates y ratones sugiriendo que la transmisión de ser humano a ser humano puede ser más eficaz que vaca a ser humano. Así, hay una urgente necesidad de métodos para evitar la transmisión de vCJD por transfusión de sangre. Dichas medidas pueden incluir la identificación temprana de donadores infectados y su suspensión, eliminación e inactivación de agentes de TSE en alimentos procedentes de animales y productos para la salud destinados a consumo de animales o seres humanos o aplicaciones, productos procedentes de sangre humana y bovina y trasplante de órganos. Desafortunadamente, la infecciosidad de TSE es notablemente resistente a métodos

químicos y físicos de inactivación y un método selectivo de inactivación es impreciso.

Se ha identificado una serie de materiales que se unen a proteína priónica. Se han investigado en bibliotecas de péptidos combinatorios ligandos que se unen a la secuencia de repetición de octapéptidos (PHGGGWGQ) (SEC ID N° 1) encontrados en todas las proteínas del prion de mamíferos conocidas y se descubrió una serie de ligandos, como se describe en la patente internacional WO 0177687. Otros materiales incluyen ligandos que interactúan con placa amiloide, por ej., Rojo Congo (Ingrosso, L., *et al.*, Congo Red Prolongs the Incubation Period in Scrapie-infected Hamsters. *J. Virology* 69: 506-508 (1.995)); 4-yodo, 4-desoxidoxorubicina (Tagliavini, F., *et al.*, Effectiveness of Anthracycline Against Experimental Prion Diseases in Syrian Hamsters. *Science* 276: 1.119-1.122 (1.997)); amfotericina B, porfirinas y ftalocianinas (Priola, S. A., *et al.*, Porphyrin and Phtalocyanine Antiscrapie Compounds, *Science* 287: 1.503-1.506 (2.000)); metales (Stockel *et al.*, *Biochemistry*, 37, 7.185-7.193 (1.998)); péptidos que interactúan con PrP para formar complejos (véase la Patente de EE.UU. 5.750.361 para Prusiner *et al.* y Soto, C. *et al.*, Reversion of Prion Protein Conformational Changes in Synthetic β -sheet Breaker Peptides, *Lancet*, 355: 192-197 (2.000)); heparina y otros polianiones polisulfatados (Caughey, B., *et al.*, Binding of the Protease-sensitive Form of Prion Protein PrP to Sulphated Glycosaminoglycan and Congo Red, *J. Virology* 68: 2.135-2.141 (1.994)); anticuerpos (Kacsak, R. J., *et al.*, Immunodiagnosis of Prion Disease, *Immunological Invest.* 26: 259-268 (1.997)) y otras proteínas, por ej., plasminógeno (Fischer, M. B. *et al.*, Binding of Disease-associated Prion Protein to Plasminogen., *Nature* 408: 479-483 (2.000)). Se ha usado cromatografía de intercambio iónico para purificar componentes sanguíneos, tales como hemoglobina, de contaminación priónica (Patente de EE.UU. N° 5.808.011 para Gawryl *et al.*). Sin embargo, el material cromatográfico explicado por Gawryl *et al.*, se une a la hemoglobina y la hemoglobina purificada se recoge con posterioridad por elución en gradiente. En la actualidad, no se ha caracterizado completamente o encontrado ningún material que pueda unirse a prion de una amplia variedad de medios.

Hasta la fecha, las enfermedades TSE humanas son fatales al 100%. Desafortunadamente, incluso aunque se ha indicado una serie de compuestos incluyendo amfotericinas, polianiones sulfatados, colorante Rojo Congo y antibióticos de antraciclina como agentes terapéuticos futuros, todos han demostrado sólo un modesto potencial para dificultar la propagación de priones y no se ha demostrado que ninguno tenga efecto sobre la eliminación de priones preexistentes de un huésped infectado en un estudio clínico controlado. Así, sigue existiendo una urgente necesidad de nuevos agentes terapéuticos.

El ensamblaje y desensamblaje de proteínas normalmente solubles en formas modificadas de manera conformacional e insolubles se cree que son un procedimiento causante de una variedad de diferentes enfermedades, muchas de las cuales son enfermedades neurológicas. La relación entre el comienzo de la enfermedad y la transición de la proteína normal a la modificada de manera conformacional se entiende de manera deficiente. Ejemplos de tales proteínas insolubles además de prion incluyen: péptido β -amiloide en placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer y angiopatía amiloide cerebral; depósitos de α -sinucleína en cuerpos de Lewy de la enfermedad de Parkinson, tau en ovillos neurofibrilares en demencia frontotemporal y enfermedad de Pick; superóxido dismutasa en esclerosis lateral amiotrófica y huntingtina en la Enfermedad de Huntington. Con frecuencia estas proteínas muy insolubles forman agregados que constan de fibrillas no ramificadas con la característica común de una conformación de lámina β -plegada.

Se requieren metodologías que puedan separar fácilmente o que puedan distinguir entre dos o más formas conformacionales diferentes de una proteína, por ej., PrPc y PrPsc, para comprender el procedimiento de conversión y encontrar estructuras que interactúen específicamente con la forma asociada a la enfermedad. Metodologías actuales para separar y distinguir entre isoformas de proteínas incluyen: movilidad diferencial en geles de poliacrilamida en presencia de un caotrópico tal como urea, es decir, geles con gradiente transversal de urea (TUG, por sus siglas en inglés); sensibilidad diferencial a tratamiento de proteasas, por ej., proteinasa K (PK) y la detección del producto digerido resistente a PK de PrPsc referido como PrPres; estabilidad a temperatura diferencial; solubilidad relativa en detergentes no iónicos y la capacidad de las estructuras fibrilares para unirse a ciertos productos químicos, por ej., Rojo Congo y isoflavona S. Sin embargo, queda una necesidad no cubierta de identificar materiales de unión a priones adicionales. También queda la necesidad de identificar materiales de unión de alta afinidad que sean específicos para la proteína modificada de manera conformacional y especialmente formas asociadas a la enfermedad. Dichos reactivos serían útiles para desarrollar posibles estuches de diagnóstico, separación y purificación de las diferentes formas de proteína para eliminación de formas infecciosas de la enfermedad de agentes terapéuticos, productos biológicos, vacunas y comestibles y para tratamiento.

La patente internacional WO 2001/077687 desvela ligandos peptídicos que se unen a una repetición de octapéptidos presente en la secuencia de aminoácidos de proteínas de prion y métodos para usar dichos ligandos.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona un método de detección y separación en proteína del prion infecciosa de una muestra usando materiales que se unen a proteínas del prion (de ahora en adelante "materiales de unión") según la reivindicación 1. En algunas realizaciones, los materiales de unión son partículas poliméricas, preferiblemente resinas cromatográficas, que se unen con selectividad y especificidad a analitos priónicos. En otras realizaciones, los materiales de unión son materiales inorgánicos que se unen con selectividad y especificidad a analitos priónicos. Los materiales de unión pueden unirse a proteína del prion infecciosa (PrPsc). Los priones de

diversas especies, incluyendo seres humanos y hámsters, son ligados por los materiales de unión. También se proporcionan composiciones que contienen los materiales de unión sobre un soporte tal como una columna cromatográfica.

5 Los materiales de unión son útiles para detectar, unirse a, aislar, retirar, eliminar, extraer o separar una proteína del prión en o de una muestra, tal como un fluido biológico o una muestra medioambiental. Los materiales de unión se usan para retirar una única forma de proteína del prión. Los materiales de unión se pueden usar, por lo tanto, para distinguir entre proteína del prión infecciosa y no infecciosa en una muestra de pacientes aquejados de TSE humanas y animales aquejados de tembladera, BSE y CWD. En una realización, se retira una o más proteínas del prión de un fluido biológico usando los materiales de unión descritos en la presente memoria y después se administra el fluido biológico purificado o descontaminado o se devuelve a un animal o ser humano. Se pueden emplear técnicas de hemodiálisis en esta realización. Los materiales de unión también son útiles para la detección de una o más proteínas del prión en una muestra.

15 También se desvela un método para identificar materiales de unión adicionales, en particular materiales de unión específicos para las formas modificadas de manera conformacional de proteínas, algunas de las cuales están implicadas en el desarrollo de enfermedades.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y realizaciones preferidas.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 es una fotografía de un ensayo Western que muestra la unión de PrP^c endógena de muestras de plasma humano a materiales de unión priónicos y controles apropiados.

La Figura 2 es una fotografía de un ensayo Western que muestra la unión de PrP^{sc} de homogenado de cerebro de tembladera a materiales de unión priónicos y controles apropiados.

La Figura 3 es una fotografía de un ensayo Western que demuestra la captura de PrP^c por materiales de unión priónicos en muestras que contienen albúmina de suero humano y controles apropiados.

25 La Figura 4 es una fotografía de un ensayo Western que demuestra la eliminación con una resina que comprende un grupo funcional amino de PrP^{sc} agregado a albúmina de suero humano.

Descripción detallada

30 Se describen materiales que se unen a proteínas del prión y métodos para usar los materiales de unión de proteínas del prión en la presente memoria. Los materiales de unión son materiales poliméricos, tales como resinas o perlas cromatográficas o materiales inorgánicos, tales como óxido de aluminio, que se unen con especificidad y afinidad a proteínas del prión. Los materiales poliméricos contienen uno o más de los siguientes grupos funcionales: un resto cargado de manera negativa; un resto cargado de manera positiva; un resto no cargado y un resto hidrófobo. Preferiblemente, los materiales poliméricos de unión presentan un grupo funcional ligado a una cadena principal de matriz de metacrilato o polimetacrilato.

35 Los materiales de unión forman un complejo con una proteína del prión en una muestra y son útiles en métodos para detectar, unirse a, aislar, retirar, eliminar, extraer o separar una proteína del prión en o de una muestra, tal como un tejido, órgano o fluido biológico procedente de ser humano o de animal o una muestra medioambiental. También se proporcionan métodos para diagnosticar o vigilar la enfermedad por priones en un ser humano o animal o tejido, órgano o fluido biológico del mismo. Por ejemplo, los materiales de unión descritos en la presente memoria pueden ser útiles en la detección o diagnóstico de patologías tales como CJD, vCJD, GSS, insomnio fatal, tembladera, BSE y CWD y otras TSE por ensayo de una muestra biológica, tal como sangre total, composiciones o componentes procedentes de la sangre, células, suero, plasma, derivados de plasma, fluido cerebroespinal, orina, lágrimas, amígdalas, cerebro, apéndice y otros. La importancia de detectar infección por priones en un animal o individuo previamente a donación de sangre, tejido u órgano se entiende fácilmente. Los materiales de unión son útiles en particular para la retirada de proteína del prión de una muestra o fluido biológico, tal como sangre total, componentes de la sangre, suero, plasma, derivados de plasma y similares. La retirada de priones es esencial cuando se transmite el fluido biológico a otro animal o ser humano, tal como en una transfusión sanguínea o la administración de un producto sanguíneo tal como un factor de la coagulación. Los materiales de unión se usan para retirar o detectar todas las diferentes formas de proteína del prión de la muestra o se pueden elegir de manera selectiva para retirar o detectar una sola forma de proteína del prión y se pueden usar, por lo tanto, para distinguir entre proteína del prión infecciosa y no infecciosa en la muestra.

Definiciones

Los términos "un," "una" y "el" como se usa en la presente memoria se define que significan "uno o más" e incluyen el plural a menos que el contexto sea inapropiado.

El término "anticuerpo 3F4" se refiere a un anticuerpo monoclonal específico para formas naturales de PrPc, pero PrPsc o PrPres no natural. El anticuerpo presenta especificidad para formas desnaturalizadas de PrPc, PrPsc y PrPres de hámster y ser humano.

5 Como se usa en la presente memoria, los términos "composiciones procedentes de la sangre", "componentes de la sangre" y "composiciones de sangre" se usan de manera indistinta y significa que incluyen sangre total, concentrado de glóbulos rojos, plasma, suero, fracciones ricas en plaquetas y deficientes en plaquetas, concentrados de plaquetas, glóbulos blancos, precipitados de plasma sanguíneo, precipitados y sobrenadantes de fraccionamiento de plasma sanguíneo, preparaciones de inmunoglobulina incluyendo IgA, IgE, IgG e IgM, concentrados de factores de coagulación purificados, concentrado de fibrinógeno, compuesto intermedio de fraccionamiento de plasma, preparación de albúmina u otras diversas sustancias que proceden de sangre de ser humano o animal. Los términos también incluyen proteínas procedentes de sangre purificada preparadas por cualquiera de diversos métodos comunes en la técnica incluyendo intercambio iónico, afinidad, permeación de gel y/o cromatografía hidrófoba o por precipitación diferencial con alcohol o polietilenglicol.

15 El término "PrPc" se refiere a la molécula de proteína del prión natural, que se expresa de manera natural y extensamente dentro del cuerpo del mamífero. Su estructura está muy conservada y no se asocia a una condición patológica.

20 El término "PrPsc" se refiere a la forma modificada de manera conformacional de la molécula PrPc que creen los expertos en la materia que está asociada a enfermedades tales como TSE/enfermedades por priones, incluyendo vCJD, CJD, kuru, insomnio fatal, GSS, tembladera, BSE, CWD y otras TSE, incluyendo TSE raras de animales cautivos y experimentales. La PrPsc presenta la misma secuencia de aminoácidos que la PrPc celular, normal, pero se ha convertido algo de la α -hélice en lámina β -plegada y está asociada a una condición patológica.

El término "PrPres" se refiere a los derivados resistentes a la proteinasa de la proteína PrPsc de peso molecular 27-30 kDa que quedan después de la digestión parcial de PrPsc con proteinasa K (PK).

El término "PrPr" se refiere a la proteína del prión expresada por tecnología recombinante.

25 El término "PrP" se refiere a proteína del prión en general.

El término "perla" se refiere a una partícula en fase sólida o gránulo a que se puede unir un grupo reactivo o componente de unión. Las perlas con una conformación irregular así como las perlas con formas esféricas ovoides, de varilla o incluso angulares están incluidas dentro del alcance de este término.

El término "resina" se refiere a un medio polimérico.

30 El término "polimérico" como se usa en la presente memoria describe un compuesto o molécula que consta de varias unidades químicas o estructurales repetidas, más pequeñas (monómeros).

Muestras

35 El término "muestra" se usa en la presente memoria para indicar cualquier disolución, suspensión, extracto, composición, preparación, producto, componente, tejido, órgano, célula u otra entidad que se pone en contacto con los materiales de unión a priones según los métodos según ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención. Las muestras según ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas, productos alimenticios, muestras medioambientales o muestras de agua. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a: muestras procedentes de sangre; muestras procedentes de cerebro; fluidos corporales, tales como, pero no limitados a, sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal, orina, saliva, leche, fluido ductal, lágrimas o semen; extractos biológicos, tales como extractos de colágeno, extractos de glándulas u homogenados o extractos de tejidos. Las muestras biológicas proceden de seres humanos o animales, incluyendo pero no limitado a, animales bovinos, ovinos, porcinos, equinos, murinos o cérvidos. Las muestras procedentes de sangre incluyen, pero no se limitan a, concentrados de plaquetas, preparaciones de proteínas del plasma, preparaciones de inmunoglobulinas, preparaciones de fibrinógeno, preparaciones de factor XIII, preparaciones de trombina, preparaciones de factor VIII, preparaciones de factor von Willebrand, preparaciones de proteína C o preparación de proteína C activada. Las muestras según ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención también incluyen, pero no se limitan a, composiciones farmacéuticas, composiciones terapéuticas, composiciones y productos cosméticos, alimentos o productos alimenticios o composiciones de suplemento nutricional. Los ejemplos de muestras de productos alimenticios incluyen, pero no se limitan a, gelatina, jalea, leche, productos lácteos, colágeno o una leche infantil.

55 Las muestras, según ciertos aspectos y realizaciones preferidas, incluyen disoluciones de proteínas que comprenden diversas proteínas, incluyendo, pero no limitado a, albúmina de suero humano o de animal. Por ejemplo, las muestras incluyen, pero no se limitan a, productos terapéuticos que contienen albúmina de suero humano; preparaciones de albúmina de suero humano o de animal o preparaciones que contienen albúmina de suero humano o de animal como estabilizante. Las muestras según ciertas realizaciones preferidas de la presente invención pueden contener una albúmina de suero humano o una de animal a concentraciones hasta

aproximadamente 50% (p/v) o de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% o de aproximadamente 5% a aproximadamente 25%. En un aspecto, la presente invención, en sus realizaciones preferidas, permite inesperadamente y de manera ventajosa una para retirar, separar o unir proteínas del príon de o en muestras con altas concentraciones de proteínas, en particular proteínas de la sangre, tal como albúmina de suero.

- 5 Las muestras medioambientales incluyen pero no se limitan a suelo, aguas residuales o agua, tal como agua de una fuente tal como una corriente, río, acuífero, pozo, instalación de tratamiento de agua o agua recreativa.

Las muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras líquidas, muestras sólidas o muestras coloidales. Se puede extraer una muestra sólida con un disolvente acuoso, un disolvente orgánico o un fluido crítico y se puede poner en contacto el sobrenadante resultante con los materiales de unión. Ejemplos de muestras sólidas incluyen, pero no se limitan a, productos de origen animal, en particular los que se han expuesto a agentes que transmiten priones, por ej., harina de huesos procedente de fuentes bovinas, tejido cerebral, tejido de la córnea, materia fecal, harina de huesos, subproductos de vacuno, ovejas, subproductos de las ovejas, ciervo y alce, subproductos de ciervo y alce y otros animales y productos de origen animal.

Materiales

15 Los materiales de unión proporcionados en la presente memoria se unen a péptidos o polipéptidos procedentes de la proteína del príon o la molécula priónica entera y se pueden usar en una variedad de procedimientos de separación, incluyendo pero no limitado a, cromatografía, tal como, pero no limitado a, cromatografía de capa fina, de columna y discontinua; separación en soporte sólido y de membrana; separación del reactor; separación magnética; inmunoseparación y separación coloidal. En una realización preferida, los materiales de unión están contenidos en una columna tal como una columna cromatográfica y se introduce una muestra y se deja pasar por la columna de manera que las proteínas del príon en la muestra se unan a los materiales de unión y se retengan en la columna. Los otros componentes de la muestra pasan por la columna y se pueden recoger. Se tiene que entender que el uso de los materiales de unión descritos en la presente memoria no está limitado a cromatografía discontinua o de columna. Se prevé una variedad de configuraciones, modificaciones y variaciones del uso de los materiales de unión para unir proteínas del príon y se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Dichas variaciones y modificaciones incluyen, pero no se limitan a: procedimientos discontinuos; procedimientos continuos; procedimientos de cromatografía de lecho móvil; procedimientos de presión baja, media o alta o procedimientos de escala pequeña, media o grande. En realizaciones alternativas, los materiales de unión están en una membrana, fibra, perla, impregnados en una malla de no tejido, recubriendo una fibra, contenidos dentro de una cubierta de filtro y similares.

Componentes inorgánicos

En una primera realización, los materiales de unión comprenden un compuesto o componente inorgánico, tal como, pero no limitado a, aluminio o sílice. Preferiblemente, el aluminio es óxido de aluminio y la sílice es sílice de combustión. Lo más preferiblemente, los compuestos inorgánicos son Al_2O_3 o SiO_2 . Estos materiales de unión se pueden proporcionar en una variedad de formas, incluyendo pero no limitado a, una perla o resina. Los materiales de unión se pueden usar en una variedad de procedimientos de separación y pueden estar contenidos en, o formados en, una columna cromatográfica, una membrana o cualquier dispositivo o instrumento de separación adecuado o se pueden usar en un procedimiento discontinuo o se pueden usar en cualquier procedimiento de separación que permita poner en contacto el material con una muestra en condiciones que permitan la formación del material de unión a priones y el príon. Los materiales de unión que contienen compuestos inorgánicos pueden comprender una variedad de grupos funcionales. Los grupos funcionales son hidrófilos, tal como cargados de manera positiva, cargados de manera negativa, no cargados o neutros, hidrófobos, anfífilos o combinaciones de los mismos. Se describen grupos funcionales específicos con más detalle a continuación. Se tiene que entender que los grupos funcionales pueden estar presentes de manera inherente en un compuesto inorgánico o el compuesto inorgánico se puede modificar además para incluir grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen grupos funcionales orgánicos e inorgánicos.

Componentes poliméricos

En una segunda realización, los materiales de unión comprenden materiales o componentes poliméricos y preferiblemente incluyen una matriz polimérica, también referida como una cadena principal de matriz polimérica. Opcionalmente, uno o más grupos funcionales están unidos a la matriz polimérica. En una realización preferida los materiales poliméricos son resinas, preferiblemente, resinas cromatográficas. La cadena principal de matriz de polímeros polimérica es preferiblemente una cadena principal de metacrilato, tal como se encuentra en, pero no limitado a, una resina TSK™ y TOYOPEARL™ o FRACTOGEL™ comercialmente disponible (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA). La s incluye, pero no se limita a, grupos funcionales cargados de manera positiva, cargados de manera negativa, no cargados, hidrófobos o combinaciones de los mismos. Los grupos funcionales preferidos específicamente se describen con más detalle a continuación.

Los materiales de unión toman cualquier forma o se fabrican, conforman, forman moldeados en o aplicados a cualquier soporte sólido incluyendo, pero no limitado a, una perla, membrana, cartucho, filtro, varilla de medición,

placa de microtítulo, tubo de ensayo, polvo sólido, módulo moldeado por fundición o extrusión, malla, material compuesto de partículas magnéticas o cualquier otro material sólido recubierto primero con una sustancia tal como polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, poli(acrilato de etileno), rayón, nailon, poli(butirato de vinilo), poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa y similares. Alternativamente, se usan sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ej., gelatinas), lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poli(acrilamidas). Los polímeros que forman diversas fases acuosas, tales como dextranos, polialquilenglicoles o tensioactivos, tales como fosfolípidos, sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares también son adecuados. Los materiales de unión se dispersan opcionalmente por todos estos componentes.

Los materiales de unión están preferiblemente en forma de material en forma de partículas, forma granular o de perla. Los materiales de unión en forma de partículas presentan preferiblemente un tamaño de partícula, o perla, que oscila de aproximadamente 1 μm a 500 μm y más preferiblemente de aproximadamente 20 μm a 150 μm .

Grupos funcionales

Los materiales de unión a priones según ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención comprenden grupos funcionales. El término "grupo funcional" se usa en la presente memoria para indicar grupos químicos, subgrupos o subestructuras que imparten comportamientos químicos, físicos o fisicoquímicos característicos a una molécula o un material. Los grupos funcionales descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, hidrófilos, tales como de manera positiva, de manera negativa o no cargados o neutros o hidrófobos. Los grupos funcionales anfílicos o multifuncionales también se prevén y están dentro del alcance de la presente invención. Los grupos funcionales incluyen grupos funcionales orgánicos e inorgánicos. Los grupos funcionales preferidos contienen grupos amino, fenilo o sulfito. Un grupo amino preferido es un ión amonio primario, secundario, terciario o cuaternario tal como dimetilaminoetilo (DMAE) o trimetilaminoetilo (TMAE). Otros grupos funcionales ejemplares incluyen, pero no se limitan a: $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{NH}_2$; $-\text{C}_6\text{H}_5$; $-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$; $-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{CF}_3$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$; $-\text{SO}_3^{2-}$. Los grupos funcionales útiles adicionalmente incluyen grupos sulfonilo y grupos tresilo.

Aunque no se desea estar ligados por la presente afirmación, se cree que las proteínas del prión presentan tres diferentes regiones de unión que se unen a grupos funcionales cargados de manera positiva, grupos funcionales cargados de manera negativa y grupos funcionales hidrófobos, respectivamente. De acuerdo con esto, el uso de uno o varios materiales de unión, incluyendo cada uno uno o más tipos de grupos funcionales, proporciona identificación o eliminación aumentada y/o más específica de prión de una muestra. Cuando se usan dos o más materiales de unión, se pone en contacto una muestra con los dos o más materiales de unión de manera simultánea o en sucesión en cualquier orden. Los materiales de unión, por lo tanto, constan preferiblemente de dos o más materiales de unión que contienen cada uno un grupo funcional cargado de manera positiva, un grupo funcional cargado de manera negativa, un grupo funcional no cargado o un grupo funcional hidrófobo. Cuando los materiales de unión son materiales en forma de partículas y se usa cromatografía de columna, cada tipo diferente de material de unión puede estar en la misma columna o en columnas diferentes. En una realización más preferida, se usan tres materiales de unión, uno con un grupo funcional cargado de manera positiva, uno con un grupo funcional cargado de manera negativa y uno con un grupo funcional hidrófobo.

Como se usa en la presente memoria, el término "grupo funcional cargado de manera positiva" se refiere a cualquier resto químico que soporte una carga positiva neta. Ejemplos no limitantes de grupos funcionales cargados de manera positiva incluyen grupos que contienen amino tales como aminas primarias, dietilaminoetilo, dimetilaminoetilo, trimetilaminoetilo y grupos amino cuaternario. El término "grupo funcional cargado de manera negativa" se refiere en la presente memoria a cualquier resto químico que soporte una carga negativa neta. El término "grupo funcional no cargado" se refiere en la presente memoria a cualquier resto químico que sea neutro o no soporte carga. Ejemplos no limitantes de grupos funcionales cargados de manera negativa incluyen grupos que contienen sulfito. Además, el término "grupo funcional hidrófobo" se refiere a cualquier grupo que se resista a ser humedecido por agua, incluyendo funciones alquilo, aromáticas, siloxano y fluoradas. Ejemplos no limitantes de grupos funcionales hidrófobos son grupos que contienen fenilo y butilo. El término "grupo funcional anfílico" se refiere a un grupo que es tanto hidrófobo como hidrófilo.

En ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, el material de unión a priones contiene un grupo funcional cargado de manera positiva, un grupo funcional cargado de manera negativa, un grupo funcional no cargado o neutro, un grupo funcional hidrófobo, uno o ambos. Un ejemplo de un grupo funcional cargado de manera negativa es un grupo que contiene sulfito. Un ejemplo de un grupo funcional cargado de manera positiva es un grupo amino. Un ejemplo de un grupo funcional no cargado es un grupo fenilo o butilo. Ejemplos de un grupo funcional hidrófobo son un grupo fenilo o un grupo butilo. Según ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, el uso de grupos amino, incluyendo grupos amino primario, secundario, terciario o cuaternario en los materiales de unión son ventajosos en particular para unión de priones. Sin embargo, se prevé el uso de diversos grupos, dependiendo de una proteína del prión particular, una muestra y las condiciones bajo las cuales se pone en contacto una muestra y un material de unión y se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

Una pluralidad de diferentes materiales se emplea opcionalmente en los materiales de unión, tales como materiales

laminados, por ejemplo, para impartir diversas propiedades deseables a los materiales de unión. Por ejemplo, se usan recubrimientos de proteínas, tales como gelatina para evitar la unión no específica y mejorar la detección de señales o similares.

Funcionalización superficial y espaciadores

5 En una realización preferida, los materiales de unión poseen una variedad de grupos funcionales en su superficie. Se tiene que entender que los grupos funcionales pueden estar presentes de manera inherente en la superficie de un material de unión o se pueden añadir a la superficie del material de unión por procedimientos conocidos para un experto en la materia. La manera de unir una amplia variedad de grupos o compuestos a diversas superficies es conocida y se ilustra extensamente en la bibliografía.

10 Son grupos funcionales para la unión de priones, según los métodos descritos en la presente memoria, para unir grupos funcionales adicionales o para cualquier modificación de cualquier propiedad física, química o fisicoquímica de un material, tal como, pero no limitado a, sus propiedades iónicas o hidrófobas. Los grupos funcionales que pueden estar presentes en la superficie de materiales de unión preferidos incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto, epoxi y similares.

15 En una realización preferida, los grupos funcionales pueden incluir grupos espaciadores. Los espaciadores son grupos para proporcionar un espacio o una distancia entre la superficie de un material, también referida como una matriz o un soporte y un grupo funcional. Los espaciadores constan preferiblemente de átomos de carbono, nitrógeno u oxígeno. En un aspecto, se utiliza un espaciador para modificar de manera ventajosa las propiedades de unión a priones de un material de unión a priones. Según ciertas realizaciones, los espaciadores son hasta 20 átomos de longitud o hasta 15 átomos de longitud o 5 a 10 átomos de longitud. Los espaciadores constan preferiblemente de, pero no limitado a, grupos alquilo, polietilenglicol (PEG), grupos carbohidrato, aminoácidos, péptidos hasta 20 aminoácidos de longitud o péptidos de 1 a 10 aminoácidos de longitud o mezclas de los mismos. Lo más preferiblemente, los espaciadores contienen combinaciones de grupos alquilo y PEG.

25 Resinas cromatográficas comercialmente disponibles

Preferiblemente, los materiales de unión son uno o más de las siguientes resinas cromatográficas comercialmente disponibles: resinas FRACTOGEL™ EMD; TOYOPEARL™ Amino, Butilo, Fenilo o AF-Tresilo o TSK-GEL™ Amino, Fenilo o DEAE. Más preferiblemente, los materiales de unión incluyen, pero no se limitan a resinas FRACTOGEL™ EMD TMAE, FRACTOGEL™ EMD SO₃²⁻, FRACTOGEL™ EMD DMAE, Toyopearl™ Amino, TSK-GEL™ Amino, TSK-GEL™ Fenilo, TSK-GEL™ DEAE, TOYOPEARL™ Butilo, TOYOPEARL™ Fenilo, Óxido de aluminio, TOYOPEARL™ AF-Tresilo y de sílice. En una realización lo más preferida, el material de unión es TOYOPEARL™ Amino, TSK-GEL™ Amino, TSK-GEL™ Fenilo o FRACTOGEL™ EMD SO₃²⁻. Se prevé el uso de otras resinas y soportes cromatográficos comercialmente disponibles, incluyendo soportes inorgánicos y se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

30 En una realización preferida de la presente invención, el material de unión incluye un polimetacrilato, un hidroxilpolimetacrilato o una resina AMINO 650™ (Tosoh Biosciences) y un grupo amino, tal como una amina primaria, una secundaria o una terciaria. El material de unión según una realización preferida puede incluir además un espaciador de una fórmula O-R-O-CH₂-CHOH-CH₂, en la que R tiene 1-10 carbonos de longitud. El material de unión se aplica opcionalmente a o se forma en un soporte sólido, tal como una perla, una membrana o una resina cromatográfica.

Identificación de materiales de unión

Además de los materiales de unión explicados anteriormente, se pueden identificar materiales de unión adicionales como sigue. Se investiga la capacidad de unión a analitos priónicos de los materiales de unión. Los términos "analito" o "analitos" como se usan en la presente memoria se refieren a una multitud de moléculas, incluyendo, pero no limitado a, una proteína, un polisacárido y cualquier agregado o combinación de los mismos. Los materiales de unión se incuban con una muestra que se sabe que contiene una proteína priónica, se retira proteína no ligada y se detecta proteína ligada usando métodos convencionales tales como por un anticuerpo marcado específico para la proteína del prión. Los materiales de unión a los que se ha ligado el analito se identifican que son materiales de unión adecuados. También se usan controles sin anticuerpo primario o anticuerpo secundario para eliminar materiales de unión no específicos.

50 En una realización preferida, el analito priónico al que se unen los materiales de unión identificados, es una proteína del prión encontrada en muestras de sangre o de cerebro procedentes de un ser humano o un animal. Más preferiblemente, el analito se encuentra en sangre o productos procedentes de sangre. Se prefiere además que el analito esté asociado con, o un factor causante de, un TSE en el ser humano o animal.

55 Uso de materiales de unión para retirar priones

Los materiales de unión que se unen a proteínas del prión o fragmentos de proteínas del prión son útiles para una

variedad de aplicaciones analíticas, preparativas y de diagnóstico. En algunas realizaciones, los materiales de unión contienen una fase sólida o superficie sólida, en la forma de una perla o membrana que se puede usar para unir y retirar proteínas del prión o péptidos de una muestra. Se deja que el material de unión se ponga en contacto con una muestra, tal como un fluido biológico, en condiciones suficientes para causar la formación de un complejo de material de unión a priones y se une una proteína del prión en la muestra al material de unión. El material de unión se separa después de la muestra, retirando de ese modo la proteína del prión ligada al ligando de la muestra. Los métodos para usar perlas y membranas para unir proteínas son conocidos en la técnica tal como se describe en la Patente de EE.UU. N° 5.834.318 a Baumbach *et al.* y la patente PCT/US01/11150.

En algunas realizaciones de la presente invención, se retiran sustancialmente todas las proteínas del prión de una muestra. Por "sustancialmente todas" se quiere decir que la concentración de proteína del prión se reduce significativamente. En otras palabras, la transferencia de todo o una porción de la muestra a un paciente sano de otro modo soporta un riesgo bajo de infección por priones aceptable dentro de las directrices de la salud pública. Sustancialmente todas las proteínas del prión se pueden retirar de una muestra usando un único material de unión o múltiples materiales de unión, simultáneamente o secuencialmente. Cuando se usan múltiples materiales de unión, es preferible, como se describió anteriormente, usar dos o más materiales de unión, conteniendo cada uno un grupo funcional cargado de manera positiva, un grupo funcional cargado de manera negativa o un grupo funcional hidrófobo. En una realización más preferida, se usan dos o más materiales de unión, conteniendo cada uno un grupo funcional cargado de manera negativa o un grupo funcional hidrófobo. Se pone en contacto una muestra con los dos o más materiales de unión seguidos en cualquier orden. En una realización preferida, se usan tres materiales de unión en los que cada uno contiene uno de, un grupo funcional cargado de manera positiva, un grupo funcional cargado de manera negativa y un grupo funcional hidrófobo.

En otras realizaciones, sólo se retiran materiales priónicos particulares de una muestra. Por ejemplo, se pueden retirar sólo priones infecciosos (PrPsc) de una muestra o se pueden retirar sólo priones no infecciosos (PrPc) de una muestra. Un descubrimiento importante descrito en la presente memoria es la identificación de una multitud de materiales de unión con diferentes especificidades de priones. La Tabla 4 muestra diversos materiales de unión y sus especificidades para priones de hámster y ser humano, no infecciosos e infecciosos. Los materiales de unión preferidos para la eliminación selectiva de PrPsc humano contienen un grupo amino de manera que el contenido en la resina cromatográfica Toyopearl™ Amino-650M o TSK-GEL™-Amino 750C o equivalentes funcionales de los mismos o contienen un grupo fenilo tal como el contenido en TSK-GEL™ Fenyl-5PW o equivalentes funcionales.

Preferiblemente, los materiales de unión son perlas empaquetadas en una columna, tal como una columna cromatográfica. Se hace pasar después una disolución, homogenado o suspensión de la muestra por la columna debido a la fuerza de la gravedad o a presión, tal como en una columna de cromatografía líquida de alta resolución. La proteína del prión en la muestra unirá los materiales de unión descritos en la presente memoria en la columna. Se recoge la muestra que se hace pasar por la columna y está exenta de contaminación por priones o al menos tiene un nivel reducido de material priónico.

Una vez que la muestra pasa por la columna, la proteína del prión ligada puede eluir y recogerse para análisis o si se desea, para fines de diagnóstico o pronóstico. Si se desea para retirar la proteína del prión del material de unión, la fase móvil de la columna se puede cambiar primero a un tampón que retire los contaminantes ligados de manera deficiente para enjuagar la columna. La proteína del prión se retira después de la columna hirviendo o añadiendo una disolución que contiene detergentes fuertes tales como detergente Sarkosyl (laurilsarcosinato de sodio, Shelton Scientific-IBI, Shelton, CT) o dodecilsulfato de sodio (SDS), agentes caotrópicos, tales como hidrocloreuro de guanidinio o agentes con un bajo pH, tal como ácido acético o por modificación química del ligando de unión, tal como por ejemplo, acetilación de un grupo amino.

Ejemplos de muestras biológicas de las que se pueden retirar priones incluyen, pero no se limitan a, sangre total, composiciones procedentes de la sangre o componentes, suero, fluido cerebroespinal, orina, saliva, leche, fluido ductal, lágrimas, semen o composiciones procedentes de cerebro de seres humanos o animales. Otras muestras biológicas incluyen las que contienen colágeno o extractos de glándulas. En una realización, se retiran priones de la sangre de un ser humano o animal usando un circuito de hemodiálisis que contiene uno o más materiales de unión descritos en la presente memoria. En esta realización, se retira sangre del ser humano o animal, se dirige a un dispositivo que contiene uno o más de los materiales de unión descritos en la presente memoria, en la que las proteínas del prión se retiran de la sangre a medida que se unen a los materiales de unión y la sangre sin priones o reducida en priones se devuelve después al ser humano o animal.

Las proteínas del prión también se pueden eliminar de una muestra biológica tal como un producto alimenticio (para consumo animal o de los seres humanos) usando los materiales de unión descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la muestra puede contener un material del animal procedente u obtenido de cualquier animal, incluyendo, pero no limitado a, una vaca, una oveja, un animal de la especie porcina, un caballo, un ratón, un hámster o un animal cérvido. Alternativamente, el material de muestra se puede referir como humano; bovino; ovino; porcino; equino; murino, tal como procedente de ratón y hámster y material procedente de los cérvidos, tales como ciervo y alce. Los materiales procedentes de animales de los que se pueden eliminar proteínas del prión según métodos según ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, gelatina, jalea, leche, colágeno y leche infantil. La muestra de la que se pueden eliminar proteínas del prión según métodos según ciertos

aspectos y realizaciones de la presente invención también puede incluir, pero no se limitan a, composiciones farmacéuticas, composiciones terapéuticas, composiciones de suplementos nutricionales, alimentos o composiciones cosméticas.

5 Las muestras, según realizaciones preferidas, son disoluciones de proteínas y contienen diversas proteínas, incluyendo, pero no limitado a, albúmina de suero humano o de animal. Por ejemplo, las muestras pueden ser, pero no se limitan a, preparaciones de proteínas del plasma que contienen albúmina de suero humano como estabilizante, preparaciones de inmunoglobulina, preparaciones de fibrinógeno, preparaciones de factor XIII, preparaciones de trombina, preparaciones de factor VIII, preparaciones de factor von Willebrand, preparaciones de proteína C, preparaciones de proteína C activada o preparaciones de cualquier combinación o variación de lo anterior; productos terapéuticos que contienen albúmina de suero humano; preparaciones de albúmina de suero humano o de animal y preparaciones de proteínas diluidas que contienen albúmina de suero humano o de animal como estabilizante. Las muestras, según realizaciones preferidas, contienen una albúmina de suero humano o una de animal a concentraciones hasta aproximadamente 50% (p/v) o de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% o de aproximadamente 5% a aproximadamente 25%. En un aspecto, la presente invención, en sus realizaciones preferidas, permite inesperadamente y ventajosamente una para retirar, separar o unir proteínas del príon de o en muestras con altas concentraciones de proteínas, en particular proteínas de la sangre, tales como albúmina de suero.

20 Los materiales de unión descritos en la presente memoria también son útiles para retirar proteínas del príon de muestras medioambientales tales como agua de una fuente tal como una corriente, río, acuífero, pozo, instalación de tratamiento de agua o agua recreativa.

Uso de materiales de unión para detectar priones

25 Los materiales de unión descritos en la presente memoria también son útiles en un método para detectar la presencia de o cuantificar una proteína o péptido del príon en una muestra biológica o medioambiental. Las muestras biológicas en que se detectan proteínas del príon incluyen, pero no se limitan a, sangre total, composiciones procedentes de la sangre o componentes, suero, fluido cerebroespinal, orina, saliva, leche, fluido ductal, lágrimas, semen, composiciones procedentes del cerebro, heces o los extractos u homogenatos de colágenos, glándulas, tejidos (tales como una amígdala o apéndice) u órganos. Se prevén métodos de detección tanto cualitativos como cuantitativos y se encuentran dentro del alcance de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención.

30 Como se describió anteriormente con respecto a eliminación de proteínas del príon, los materiales de unión también son útiles para la detección de proteínas del príon en materiales procedentes de animales usados como productos alimenticios. Para fines de detección, el término "materiales de origen animal" se refiere a los materiales descritos anteriormente así como materiales que contienen partes del animal tales como músculo, tejido conjuntivo u tejido de órganos. Los materiales procedentes de animales además incluyen, pero no se limitan a, harina de huesos, vacuno, subproductos de vacuno, ovejas, subproductos de oveja, alce, subproductos de alce, cerdo, subproductos de cerdo, salchicha, hamburguesa y alimentos infantiles.

Los materiales de unión descritos en la presente memoria también son útiles para detectar proteínas del príon en muestras medioambientales tales como las descritas anteriormente y extractos de suelo.

40 Debido al descubrimiento de una multitud de materiales de unión con diferentes características de unión de priones, los materiales de unión son útiles en métodos para distinguir entre priones infecciosos y no infecciosos en una sola muestra o entre muestras. De acuerdo con esto, los métodos se proporcionan para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades por priones en un ser humano o animal. Enfermedades por priones incluyen, pero no se limitan a, encefalopatías espongiformes transmisibles (las TSE) tales como tembladera, que afecta a ovejas y cabras; encefalopatía espongiforme bovina (BSE), que afecta a ganado; encefalopatía transmisible del visón, encefalopatía espongiforme felina y enfermedad debilitante crónica (CWD) de ciervo mulo, ciervo de cola blanca, ciervo de cola negra y alce; kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), insomnio fatal y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD), que afecta a los seres humanos.

45 En una realización, se pasa una muestra por un material de unión con una mayor especificidad por un PrPsc que un PrPc y el príon PrPsc ligado se detecta usando los métodos descritos a continuación. Se puede hacer pasar después la misma muestra por un material de unión con una mayor especificidad por PrPc que PrPsc y se detecta la PrPc ligada usando los métodos descritos a continuación. Las especificidades de diversos materiales de unión para PrPc y PrPsc se proporcionan en la Tabla 4. Los materiales de unión preferidos para la detección selectiva de PrPsc humano contienen un grupo amino similar al contenido en el compuesto de TOYOPEARL™ TSK-GEL™-Amino 750C Amino-650M o el TSK-GEL™-Amino 750C o contienen un grupo fenilo similar al contenido en TSK-GEL™ Fenyl-5PW (todas las resinas de Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA).

50 Cuando se usa el método proporcionado en la presente memoria para detectar un príon en una muestra, la muestra se pone en contacto con un material de unión en condiciones suficientes para causar la formación de un complejo entre la proteína del príon y el material de unión. El complejo se detecta después por métodos convencionales,

detectándose de ese modo la presencia del príon en la muestra. Por ejemplo, el material de unión (un primer ligando) puede ser marcado con una etiqueta detectable. Como ejemplo alternativo, el complejo se detecta marcando un ligando secundario tal como un anticuerpo u otra proteína, combinando el ligando secundario marcado con la muestra en presencia del material de unión y detectando complejo de material de unión a ligando secundario-
 5 príon marcado. El ligando secundario puede estar ligado al príon mediante enlaces covalentes o no mediante enlaces covalentes. Se conoce una amplia variedad de etiquetas y técnicas de conjugación y se indican extensamente en la bibliografía tanto científica como de patentes. En una realización, el ligando secundario es marcado durante su producción. Las etiquetas adecuadas incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares.

10 Se incluyen dentro del alcance de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención métodos de detección, de manera cualitativa y de manera cuantitativa, de una proteína del príon ligada a un material de unión de proteína del príon o un complejo de material de unión de proteína del príon y príon. El material de unión a príon que forma un complejo se puede empaquetar o formar en una columna, una membrana o un filtro o unirse o formarse en, o inmovilizarse sobre un soporte sólido. También se incluyen dentro del alcance de ciertos aspectos y realizaciones de
 15 la presente invención métodos de detección, de manera cualitativa y de manera cuantitativa, una proteína del príon ligada y con posterioridad liberada de un material de unión a príon.

La detección puede transcurrir por cualquier método incluyendo inmunotransferencia, análisis Western, ensayos de desplazamiento gel-movilidad, seguimiento de marcadores radioactivos o bioluminiscentes, resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética electrónica, espectroscopía de flujo detenido, cromatografía de columna,
 20 electroforesis capilar u otros métodos que siguen una molécula basándose en una modificación de tamaño o carga o ambos. El complejo ligando secundario-príon se puede separar o no del material de unión previamente a detección. Otros formatos de ensayo incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos de liposomas (los LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ej., ligandos secundarios) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los compuestos químicos liberados se detectan después según técnicas clásicas.

25 Con frecuencia se unen etiquetas no radiactivas por medios indirectos. En general, una molécula de ligando secundario (por ej., biotina) está ligada mediante enlaces covalentes al material de unión (primer ligando). El ligando secundario se une después a una molécula de ligando terciario (por ej., estreptavidina) que es detectable de manera inherente o está ligado mediante enlaces covalentes a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Se puede usar una serie de ligandos secundarios y terciarios. Cuando un ligando secundario tiene un ligando terciario natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, se
 30 puede usar junto con los ligandos terciarios que se encuentran en la naturaleza, marcados. Alternativamente, cualquier compuesto hapténico o antigénico se puede usar junto con un anticuerpo.

La etiqueta o el grupo detectable particular usado para detectar el complejo de materiales de unión-príon no es crítico. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichas
 35 etiquetas detectables se han desarrollado mucho y, en general, cualquier etiqueta útil en dichos métodos puede ser aplicada al presente método. Así, una etiqueta es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Etiquetas útiles incluyen colorantes fluorescentes (por ej., isotiocianato de fluoresceína, Rojo de Texas, rodamina y similares), radioetiquetas (por ej., ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ej., LacZ (beta galactosidasa), CAT (cloramfenicol acetiltransferasa), peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y otros, usados comúnmente como enzimas detectables, en un EIA (inmunoensayo enzimático) o en un ELISA (inmunoanálisis ligado a enzimas)) y etiquetas colorimétricas tales como perlas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). La etiqueta se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos conocidos en la técnica. Como se
 40 indicó anteriormente, se puede usar una amplia variedad de etiquetas, dependiendo la elección de etiquetas de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación del compuesto, requerimientos de estabilidad, instrumentación disponible y disposiciones de eliminación.

También se pueden conjugar los ligandos secundarios directamente a compuestos generadores de señales, por ej., por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como etiquetas serán principalmente
 45 hidrolasas, en particular fosfatasas, esterases y glicosidasas u oxidorreductasas, en particular peroxidases. Los compuestos fluorescentes incluyen pero no se limitan a, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazinodionas, por ej., luminol.

Los medios de detección de etiquetas son conocidos para los expertos en la materia. Así, por ejemplo, cuando la
 50 etiqueta es una etiqueta radioactiva, los medios de detección incluyen, pero no se limitan a, un contador de centelleo o película fotográfica como en autoradiografía. Cuando la etiqueta es una etiqueta fluorescente, se puede detectar por excitación del fluorocromo con una longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia resultante, por ej., por microscopía, inspección visual, vía película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos, tales como dispositivos acoplados por carga (los CCD, por sus siglas en inglés) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, se detectan etiquetas enzimáticas proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el
 60 producto de reacción resultante. Finalmente, se pueden detectar etiquetas colorimétricas simples simplemente por observación del color asociado a la etiqueta. Así, en diversos ensayos de varilla de medición, el oro conjugado con

frecuencia parece rosa, mientras que diversas perlas conjugadas parecen del color de la perla.

Los materiales de unión de la invención también se pueden usar para retirar o detectar proteínas o péptidos del prión extraídos en disolución de un material de muestra sólida. Por ejemplo, se puede extraer una muestra sólida con un disolvente acuoso, un disolvente orgánico o un fluido crítico y se puede poner en contacto el sobrenadante resultante con los materiales de unión. Ejemplos de muestras sólidas incluyen, pero no se limitan a, productos de origen animal, en particular los que se han expuesto a agentes que transmiten priones, por ej., harina de huesos procedente de fuentes bovinas. Se pueden usar materiales de unión en algunas realizaciones para detectar la presencia de proteína del prión en suelo. Otras muestras sólidas incluyen, pero no se limitan a, tejido cerebral, tejido de la córnea, materia fecal, harina de huesos, subproductos de vacuno, ovejas, subproductos de oveja, ciervo y alce, subproductos de ciervo y alce y otros animales y productos procedentes de animales.

Alternativamente, se pueden tratar priones y complejos prión-material de unión con proteinasa K (PK). PrPc es muy sensible a PK, mientras que PrPsc se digiere parcialmente para formar PrPres. La propia molécula de PrPres es muy resistente a la proteólisis. Así, el tratamiento de PK digerirá PrPc y transformará PrPsc sensible a PK en PrPres. Después de la retirada de PK, se puede desnaturalizar la PrPres y detectar por anticuerpos tales como 3F4.

En otra realización, se pueden usar materiales de unión según la invención para la concentración selectiva de PrPsc sobre PrPc.

Uso de materiales de unión para cuantificar priones

Un complejo material de unión-prión o alternativamente, un anticuerpo para el prión o complejo material de unión-prión, se puede detectar y cuantificar por cualquiera de una serie de medios conocidos para los expertos en la materia. Estos incluyen, pero no se limitan a, métodos bioquímicos analíticos tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y similares y diversos métodos inmunológicos, tales como, pero no limitado a, tales como reacciones de precipitación de fluido o gel, inmunodifusión (única o doble), inmunolectroforesis, radioinmunoensayos (los RIA, por sus siglas en inglés), inmunoanálisis ligado a enzimas (los ELISA), ensayos inmunofluorescentes y similares.

Reducción de unión no específica

Cuando se usa un soporte sólido como componente de un ensayo para la detección de una proteína del prión de una muestra, un experto en la materia apreciará que con frecuencia es deseable reducir unión no específica al soporte sólido. Los medios de reducción de dicha unión no específica son conocidos para los expertos en la materia.

Típicamente, esto implica recubrir el soporte sólido con una composición proteinácea. En particular, se usan extensamente composiciones de proteínas, tales como albúmina de suero bovino y humano (BSA) y gelatina.

La invención se describirá con más detalle mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos y se desea que ni limiten ni definan la invención de ningún modo.

Ejemplo 1

Identificación de Materiales de unión a Priones

Se ensayaron ochenta partículas poliméricas o inorgánicas por uso de un ensayo sobre perlas de unión a priones mediante un cromógeno NBT/BCIP (nitroazul tetrazolio/sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato-p-toluidina), como se describió anteriormente, usando homogenado de cerebro de hámster normal. Los resultados de unión se proporcionan en la Tabla 1 en la que "-" significa no unión y "+" significa unión positiva. Cuanto más "+" en un índice de partículas, más fuerte la unión observada. Se evaluaron doce partículas que tuvieron al menos "++" además. La Tabla 2 resume la capacidad de las doce partículas para unirse a prión de hámster normal. Una puntuación mayor indica una cantidad aumentada de unión a priones.

Tabla 1.

Material polimérico de investigación o partículas inorgánicas para unión de proteína del prión.

Nº de Referencia	Nombre	Fabricante	Resultados de Unión
1	Toyopearl™ Amino-650M	Tosoh Bioscience (Montgomeryville, PA)	+++

(continuación)

1'	Amino-650M Acetilado	Acetilación hecha por la Universidad del Estado de Carolina del Norte (NCSU) usando Toyopearl™ Amino 650M	-
2	TSK-GEL™ Amino 750C	Tosoh Bioscience	+++
3	Toyopearl™ Epoxi 700EC	Tosoh Bioscience	+
4	Toyopearl™ AF-Carboxi-650M	Tosoh Bioscience	-
5	Toyopearl™ AF-Heparin-650M	Tosoh Bioscience	+
6	Amberchrom™ CG-71m	Tosoh Bioscience	-
7	Amberchrom™ CG-300m	Tosoh Bioscience	-
8	Toyopearl™ HW-40C	Tosoh Bioscience	-
9	Toyopearl™ HW-50F	Tosoh Bioscience	-
10	Toyopearl™ AF-Chelate-650M	Tosoh Bioscience	-
11	Toyopearl™ DEAE-650M	Tosoh Bioscience	+
12	Toyopearl™ DEAE-650C	Tosoh Bioscience	-
13	Toyopearl™ Super Q-650M	Tosoh Bioscience	+
14	Toyopearl™ Super Q-650C	Tosoh Bioscience	+
15	Toyopearl™ QAE-550C	Tosoh Bioscience	-
16	Toyopearl™ CM-650M	Tosoh Bioscience	-
16'	Toyopearl™ CM-650C	Tosoh Bioscience	-
17	Toyopearl™ SP-650M	Tosoh Bioscience	-
18	Toyopearl™ SP-550C	Tosoh Bioscience	-
19	TSK-GEL™ Ether-5PW	Tosoh Bioscience	-
20	TSK-GEL™ Fenil-5PW	Tosoh Bioscience	+++
21	Toyopearl™ Butil-650C	Tosoh Bioscience	++
22	Toyopearl™ Fenil-650C	Tosoh Bioscience	++
23	Toyopearl™ Hexil-650C	Tosoh Bioscience	-
24	TSK-GEL™ DEAE - 5PW	Tosoh Bioscience	+++

ES 2 436 638 T3

(continuación)

25	TSK-GEL™ Q - 5PW	Tosoh Bioscience	+
26	Toyopearl™ AF-Tresil 650M	Tosoh Bioscience	++
27	Amberlite™ XAD-7 HP	Supelco (Bellefonte, PA)	-
28	Amberlite™ XAD-1180	Supelco	-
29	Diaion/sepabeads™ HP 20SS	Supelco	-
30	Diaion/sepabeads™ SP 207	Supelco	+
31	MCI Gel CHP 20P	Supelco	-
32	Gel de sílice grado 7754	Supelco	-
33	Gel de sílice grado 634 Davisil™	Supelco	-
34	Gel de sílice grado 643 Davisil™	Supelco	-
35	Rayón azul trisulfonado (syn: Ftalocianina de Cobre)	Supelco	No ensayado. Es fibra de rayón azul.
36	Amberlite™ IRC-718	Supelco	-
37	Diaion™ CR 20	Supelco	-
38	Amberlite™ IRA-958	Supelco	-
39	Dowex™ MSA-1	Supelco	-
40	Amberlite™ IRA-910	Supelco	+
41	Diaion™ PA 418	Supelco	-
42	Fractogel™ EMD DMAE 650 (S)	E. Merck (Gibbstown, NJ)	++++
43	Fractogel™ EMD Fenilo 1 650 (S)	E. Merck	-
44	Fractogel™ EMD TMAE 650 (S)	E. Merck	+++++
45	Fractogel™ EMD Propilo 650 (S)	E. Merck	-
46	Fractogel™ EMD Amino (M)	E. Merck	-
47	Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650 (S)	E. Merck	++
48	Fractogel™ EMD COO ⁻ 650 (S)	E. Merck	+

ES 2 436 638 T3

(continuación)

49	PMMA Poli(metacrilato de metilo)	Bangs Laboratories (Fishers, IN)	-
50	Óxido de aluminio -100+325	Aldrich (Milwaukee, WI)	++
51	Polietileno	Aldrich	-
52	Óxido de aluminio -100+400	Aldrich	+
53	Poli(estireno/anhídrido maleico)	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)	-
54	Resina de aminometilpoliestireno	Aldrich	-
55	Óxido de aluminio, activado	Aldrich	-
56	Sílice, de combustión	Aldrich	++
57	PVDF SOLVAY 1008/1001	Solvay (Auburn Hills, MI)	++++ (no específico)*
58	PVDF SOLVAY 1015/1001	Solvay	+++ (no específico)*
59	Gel de sílice para columna, 35-70 um	Acros (Pittsburgh, PA)	-
60	Gel de sílice malla 60-200	Acros	-
61	PoliEstireno, 0,93 um	Bangs	No ensayado, emulsión
62	Sílice Bangs Lab, 0,20 um	Bangs	No ensayado, emulsión
63	Sílice Bangs Lab, 0,97 um	Bangs	No ensayado, emulsión
64	1,2 DAP ¹ -Epoxi 700EC	Aldrich	-
65	1,3 DAP-Epoxi 700EC	Aldrich	-
66	1,4 DAB ² -Epoxi 700EC	Aldrich	-
67	L-Lisina - Epoxi 700EC	Aldrich	+
68	TETA ³ -Epoxi 700EC	Aldrich	+
69	Prometic CG-1083	Prometic BioSciences (Cambridge, RU)	++++ (no específico)*
70	Prometic CG-1085	Prometic BioSciences	+ (no específico)*
71	Prometic CG-1086	Prometic BioSciences	+ (no específico)*

(continuación)

72	Prometic CG-1082 (púrpura)	Prometic BioSciences	+ (no específico)*
73	Prometic CG-1084 (púrpura)	Prometic BioSciences	++ (no específico)*
74	Prometic CG-1087 (púrpura)	Prometic BioSciences	+ (no específico)*
75	Prometic CG-1014 (púrpura)	Prometic BioSciences	++ (no específico)*
78	Prometic CG-1107 (púrpura)	Prometic Biosciences	++++ (no específico)*
79	Prometic CG-1108 (púrpura)	Prometic Biosciences	++++ (no específico)*
76	Etilenodiamina, ligada a polímero	Aldrich	-
77	Pharmacia Source 30Q	Pharmacia (Piscataway, NJ)	+
80	Resina Base Clara (HCl)	Peptide International (Louisville, KY)	-

¹ DAP: diaminopropano² DAB: diaminobutano³ TETA: trietilentetramina⁴ Amberchom™ es una marca registrada de Rohm and Haas Company (Philadelphia, PA)

5 *No específico: significa que el control negativo sin anticuerpo 3F4 tiene la misma señal que los ensayados con anticuerpo 3F4.

Tabla 2.

Capacidad de los materiales de unión poliméricos para unirse a príon de hámster normal (HaPrPc)

Compuestos poliméricos	Resina Base	Fabricante	HaPrPc
Fractogel™ EMD TMAE 650(S)	PMMA**	E. Merck	5
Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S)	PMMA	E. Merck	2
Fractogel™ EMD DMAE 650(S)	PMMA	E. Merck	4
Toyopearl™ Amino-650M	PMMA	Tosoh Bioscience	3
TSK-GEL™ Amino 750C	PMMA	Tosoh Bioscience	3
TSK-GEL™ Fenyl-5PW	PMMA	Tosoh Bioscience	3
TSK-GEL™ DEAE-5PW	PMMA	Tosoh Bioscience	3

(continuación)

Toyopearl™ Butil-650C	PMMA	Tosoh Bioscience	2
Toyopearl™ Fenil-650C	PMMA	Tosoh Bioscience	2
Óxido de aluminio -100+325	Al ₂ O ₃	Aldrich	2
Sílice Aldrich, de combustión	SiO ₂	Aldrich	2
Toyopearl™ AF-Tresil 650M	PMMA	Tosoh Bioscience	2

** PMMA: Metacrilato polimérico.

Se realizó el ensayo sobre perlas de unión a priones por NBT/BCIP como sigue. Cuando se empezó con PrP normal de un homogenado de cerebro de hámster al 10%, se solubilizó la muestra con Sarkosyl al 0,5% (200 µl de 10% a 4 ml de cerebro) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador.

- 5 Se centrifugó la muestra a 1.466 rad/s (14.000 rpm) durante cinco minutos. Se retiró el sobrenadante y se hizo una dilución del sobrenadante en un medio deseado. Se bloquearon primero placas de microtítulo de noventa y seis pozos (Nº Cat. 3.075, Becton Dickinson, Franklin Líneas, NJ) y placas Millipore MultiScreen-DV (Nº Cat. MADV N65 10, Millipore Corporation, Bedford, MA) con 200 µl/pozo de 1% (P/V) de caseína de Pierce (Rockford, IL) a 65°C durante una hora. Se hincharon diez miligramos (10 mg) de perlas secas en 1 ml de PBS 10 mM pH 7,4 y se lavaron dos veces. Se vaciaron las placas de microtítulo y se añadieron 20-30 µl de una suspensión de perlas hinchadas a cada pozo. Se dejó sedimentar la suspensión y se retiró el agua excedente.

- 15 Se diluyó homogenado de cerebro de hámster normal 1:10 en albúmina de suero humano al 5% (Alpha Therapeutic Corp. Los Angeles, CA) que ya se había tratado por calor a 60°C durante diez horas. Se añadió la suspensión a un volumen de 150 µl por pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 1,5 horas con las perlas. Se retiró la disolución de proteína no ligada y se añadieron 100 µl de anticuerpo monoclonal 3F4 (Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA), diluido 1: 4.000 en caseína al 1% a los pozos experimentales. Los pozos de control contenían 100 µl de caseína al 1%. Se incubaron las perlas con 3F4 durante la noche a 4°C con agitación suave.

- 20 Se lavaron después las perlas dos veces con PBS 10 mM + CuCl₂ 10 µM a pH 7,4. El anticuerpo secundario, conjugado de fosfatasa alcalina IgG anti-ratón (#A3688, Sigma, St. Louis, MO), que se diluyó 1:1.000 en caseína al 1%, se añadió a un volumen de 100 µl/pozo. Se incubaron las muestras durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Se transfirieron todas las perlas a placas Millipore (Bedford, MA) MultiScreen-DV para realizar los lavados. Se lavaron las muestras tres veces con PBS+Cu²⁺+Tween 20 (0,05%) a pH 7,4, 3X con PBS+Cu²⁺, dos veces con NaCl 1 M y dos veces con Tris.HCl 50 mM + MgCl₂ 5 mM a pH 9,5.

- 25 Se mezcló el sustrato NBT/BCIP de la Etapa-1 y se añadieron 100 µl directamente a cada pozo hasta desarrollo del color deseado (púrpura claro). Las incubaciones típicas fueron de cinco o quince minutos. Se recortó un papel de filtro (#1703932, BioRad, Hercules, CA) y se humedeció con agua destilada. Se añadió suspensión de perlas a los pozos de transferencia de Sistema Dot-Blot S&S Minifold I (Schleicher-Schuell Bioscience, Keene, NH) a vacío. Se añadió agua a los pozos y los resultados se escanearon a un ordenador.

Ejemplo 2

- 30 Identificación de Materiales de unión a Priones

- La identificación de materiales de unión a priones se realizó usando homogenado de cerebro de hámster en formato discontinuo, usando dos diferentes sistemas de detección. En el primero, se detectó la cantidad de prión ligada a un material manchando las perlas después de incubación con el material fijado como objetivo. El segundo método detectó la cantidad de prión presente en la fracción no ligada contenida en muestras de flujo pasante y de lavado usando SDS-PAGE y métodos western. Una descripción detallada de cada metodología se describe a continuación.

Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, las Toyopearl™ Amino-650M, TSK-GEL™ Amino 750C y TSK-GEL™ Fenyl-5PW proporcionaron la unión más específica de PrPc de cerebro de hámster.

Tabla 3.
Resultados de Investigación Secundaria

Partículas Poliméricas	Unión evaluada por ensayos sobre las perlas con NBT/BCIP	Unión evaluada por ensayo western con ECL-además
Toyopearl™ Amino-650M	+++	+++
TSK-GEL™ Amino 750C	+++	+++
TSK-GEL™ Fenyl-5PW	+++	++++
Toyopearl™ Butil-650C	++	+
Toyopearl™ Fenil-650C	++	+
TSK-GEL™ DEAE-5PW	+++	5+ (no específico)
Toyopearl™ AF-Tresil 650M	++	-
Fractogel™ EMD DMAE 650(S)	++++	5+ (no específico)
Fractogel™ EMD TMAE 650(S)	+++++	5+ (no específico)
Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S)	++	+++
Óxido de aluminio -100+325	++	+
Sílice Aldrich, de combustión	++	5+ (no específico)

- 5 Para el método de detección sobre la perla, se bloquearon placas de microtítulo de 96 pozos (Nº Cat. 3075, Falcon, Becton Dickinson, Franklin Líneas, NJ) y placas Millipore Multiscreen-DV (nº Cat. MADV N65 10, Millipore, Bedford, MA) con 200 µl/pozo de caseína al 1% (p/v) a 65°C durante 1 hora. Se remojaron alícuotas de 10 mg de cada polímero en 1 ml de PBS 10 mM pH 7,4 y se lavaron dos veces. Se drenaron las placas de microtítulo y se añadieron 20-30 µl de una suspensión de resina a cada pozo. Se dejó que sedimentara la resina y se retiró la disolución en exceso. Se añadieron a las resinas 150 µl de una disolución 1:10 de homogenado de cerebro de hámster normal en albúmina de suero humano al 5%. Se incubó la mezcla durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se drenaron los pozos y se añadieron 100 µl de anticuerpo 3F4 (1:4.000) en caseína al 1% a cada pozo y se incubó durante la noche con refrigeración y agitación suave. Después se lavaron las perlas dos veces con PBS 10 mM + CuCl₂ 10 µM, pH 7,4, seguido por adición de 100 µl/pozo de conjugado de fosfatasa alcalina y anticuerpo secundario (nº Cat. A3688, Sigma, St. Louis, MO) e incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave.

Se drenaron todos los pozos y se transfirieron las perlas a las placas Multi-Screen, donde se lavaron tres veces con PBS 10 mM + CuCl₂ 10 µM + Tween 20 al 0,05% a pH 7,4, seguido por PBS 10 mM + CuCl₂ 10 µM, dos veces con NaCl 1 M, dos veces con Tris-HCl 50 mM + MgCl₂ 5 mM a pH 9,5.

- 20 Se hicieron reaccionar después las perlas lavadas con 100 µl de sustrato NBT/BCIP durante 5-15 minutos para desarrollo del color. Se transfirieron las perlas a papel de filtro usando un Sistema Dot-Blot S&S Minifold I y se evaluó el color resultante.

- 25 Para la detección de la fracción no ligada, se pusieron 100 µl de cada muestra de perlas previamente humedecidas con PBS 10 mM pH 7,4 a 4°C durante la noche en tubos de microfuga. Después de lavar con PBS al menos cuatro veces, se transfirieron las perlas a unidades de filtro Ultrafree-MC de 0,45 µm (UFC30HVNB, Millipore, Bedford, MA) y se enjuagaron de nuevo con PBS. Se trató homogenado de cerebro de hámster al diez por ciento (HBH, por sus siglas en inglés) con Sarkosyl al 0,5% y se diluyó 1:10 y 1:20 en PBS. Se añadió una alícuota de 200 µl de ello a cada muestra de perlas y se incubó durante ocho minutos con agitación seguido por una centrifugación de dos minutos a 1.047 rad/s (10.000 rpm) para recuperar la fracción no ligada. Se pusieron alícuotas de 26 µl de flujo pasante en tubos de microcentrífuga de 0,7 ml y se almacenaron a -20°C para análisis por método Western.

30

- Se descongelaron las muestras antes del método Western y se añadieron 10 µl de tampón de muestra (tampón de muestra NuPAGE DS, NP0007, Invitrogen, Carlsbad, CA) y se añadieron 4 µl de agente reductor Agente Reductor de Muestra NuPAGE, NP0004, Invitrogen) (DTT, 1 M en H₂O). Se incubó la disolución a 90-100°C durante diez minutos. Las muestras se aplicaron a Gel Bis-Tris al 4-12% NuPAGE de 15 pozos (NP0323, Invitrogen). A cada pozo de un gel, se aplicaron 17 µl para un análisis de método Western y 14 µl para un gel de marcado de proteínas. El volumen de marcador de peso molecular (MultiMark Multi-Colored Standard, LC5725, Invitrogen) fue 5 µl. Los métodos Western usaron membranas PVDF, caseína al 1% como bloqueante, 1:10.000 de 3F4 como anticuerpo primario, 1:3.000 de conjugado de peroxidasa de rábano de cabra anti-ratón (HRP, por sus siglas en inglés) como anticuerpo secundario y ECL además como sustrato. Se expusieron las películas durante seis minutos.
- Las muestras con alta unión de PrP a los materiales de unión no produce señal en el flujo pasante y se puntúan "5+". Los que no tenían unión se puntúan "-". Las otras muestras se gradúan entre estos valores.

Ejemplo 3

Determinación de Especificidad de unión a Priones

- En general, se pusieron de manera cuantitativa perlas humedecidas constituidas por diferentes materiales de unión en columnas de un solo uso individuales. Las columnas contenían fritas suficientemente pequeñas para retener las perlas pero suficientemente grandes para permitir el flujo pasante de las disoluciones expuestas. Las disoluciones expuestas fueron homogenados de cerebro que contenían priones en Sarkosyl (Sigma) agregados a mezclas conjuntas de concentrado de glóbulos rojos. Más específicamente, las disoluciones expuestas contenían homogenados de cerebro humano infeccioso y TSE, homogenados de cerebro de hámster infeccioso, homogenados de cerebro humano no infecciosos u homogenados de cerebro de hámster no infecciosos. Se dejó que las disoluciones expuestas pasaran por el material de unión fijado como objetivo durante un periodo de tiempo definido, mientras el flujo pasante estaba siendo recogido. Después se enjuagaron las perlas y se transfirieron de manera cuantitativa desde sus columnas a viales de recogida de los que se retiraron cantidades conocidas para tratamiento posterior para determinar unión a priones específica y unión a proteínas no específica. La disolución de flujo pasante y el resto de las perlas reaccionadas también se almacenaron para análisis futuro potencial.

- Usando los métodos que se describen con más detalle a continuación, se determinó la actividad de unión de once materiales de unión para proteínas del príon como se describe en la Tabla 4. Los materiales de unión se ordenaron (siendo un orden de 1 el material de unión que presenta la cantidad más grande de unión a proteínas priónicas) por la capacidad para unirse a proteína del príon humana o de hámster normal o infecciosa. Por ejemplo, el material de unión Fractogel™ EMD TMAE 650(S) (con una cadena principal de metacrilato y el grupo funcional -CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃) ligó las cantidades más grandes de proteína del príon infecciosa tanto de hámster como humana (PrPsc) y el material de unión Fractogel™ EMD SO₃²⁻ 650(S) (con una cadena principal de metacrilato y el grupo funcional -SO₃²⁻) ligó las cantidades más grandes de proteína del príon normal tanto de hámster como humana. Estas cantidades se midieron por liberación de proteína ligada del material de unión a priones, separando las proteínas liberadas por electroforesis y usando método Western para analizar la inmunoreactividad de proteína liberada del material de unión con un anticuerpo monoclonal específico del príon. La unión del anticuerpo a proteínas del príon se detectó por quimioluminiscencia. Se consiguió cuantificación por comparación de la oscuridad de las bandas electroforéticas sobre la película (indicado anticuerpo ligado a proteína del príon que se había ligado al material de unión) con bandas de control de 2 ng, 10 ng y 50 ng de IgG de ratón y asignando un valor de puntuación a los materiales de unión. Las clasificaciones para materiales de unión con la misma puntuación se establecieron por comparación de las bandas de muestra entre sí directamente.

Tabla 4.

Clasificación de 11 compuestos poliméricos basada en su capacidad para unirse a príon de hámster normal (HaPrPc), príon humano normal (HuPrPc), príon de hámster infeccioso (HaPrPsc) y príon humano infeccioso (HuPrPsc) después de investigación secundaria.

45

Compuestos Poliméricos y grupo funcional	Resina Base	Fabricante	HaPrPc	HuPrPc	HaPrPsc	HuPrPsc
Fractogel™ EMD TMAE 650(S) -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃	PMMA	E. Merck	2	2	1	1
Fractogel™ EMD SO ₃ ²⁻ 650(S) SO ₃ ²⁻	PMMA	E. Merck	1	1	10	9
Fractogel™ EMD DMAE 650(S) -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ H(CH ₃) ₂	PMMA	E. Merck	3	3	2	7

Toyopearl™ Amino-650M -CH ₂ -CHOH-CH ₂ NH ₂	PMMA	Tosoh Bioscience	6	10	4	4
TSK-GEL™ Amino 750C -CH ₂ -CHOH-CH ₂ NH ₂	PMMA	Tosoh Bioscience	5	9	3	3
TSK-GEL™ Fenil-5PW -C ₆ H ₅	PMMA	Tosoh Bioscience	7	5	5	2
TSK-GEL™ DEAE-5PW -CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ H(C ₂ H ₅) ₂	PMMA	Tosoh Bioscience	4	7	6	8
Toyopearl™ Butil-650C -(CH ₂) ₃ -CH ₃	PMMA	Tosoh Bioscience	8	4	8	5
Toyopearl™ Fenil-650C C ₆ H ₅	PMMA	Tosoh Bioscience	9	6	9	6
Óxido de aluminio -100+325	Al ₂ O ₃	Aldrich	10	8	7	10
Toyopearl™ AF-Tresil 650M SO ₂ -CH ₂ -CF ₃	PMMA	Tosoh Bioscience	11	11	11	11

Preparación de perlas secas

- 5 Se prepararon perlas secas a granel humedeciendo las perlas con una disolución de metanol al 20% en agua. Se dejaron las perlas durante al menos 24 horas antes de uso. Cuando la cantidad original de perlas secas estuvo entre 0,5 g y 2,5 g, se transfirió la suspensión de perlas prehumedecidas a un tubo cónico de plástico de 50 ml. Se extrajo el líquido en exceso y se añadieron 25 ml de metanol al 20%. Se agitó cuidadosamente después la muestra o se volteó durante 30 segundos. Cuando el peso de perlas original estuvo fuera de estos límites mencionados, se ajustó el volumen de metanol usando 10 ml para menos de 0,5 g de resina y 40 ml para 2,5 a 4,0 g. Se dejó que las perlas sedimentan por gravedad durante aproximadamente 12-15 minutos o hasta que la mayoría de las perlas completas estuvieron en el fondo del tubo. Se drenó cuidadosamente la disolución de sobrenadante (incluyendo los finos) y se desechó. Se repitió el enjuague de metanol una vez más y después se añadió metanol al 20% para preparar una suspensión de perlas 1:1 (v/v). Se almacenaron las perlas a 4°C.

Preparación de suspensión de perlas

- 15 Se transfirieron cuatrocientos cuarenta microlitros (440 µl) de suspensión de perlas a un tubo cónico de plástico de 15 ml (220 µl de perlas húmedas por columna usada) y se añadieron 10 ml del tampón de trabajo (tampón de Citrato 20 mM/NaCl 140 mM, pH 7,0). Se agitó cuidadosamente la muestra o se volteó durante 30 segundos. Se dejó sedimentar las perlas por gravedad durante aproximadamente 12-15 minutos o hasta que la mayoría de las perlas completas estuvieron en el fondo del tubo. Se drenó cuidadosamente la disolución de sobrenadante (incluyendo los finos) y se desechó. Se repitió el enjuague de tampón de trabajo dos veces más y se añadió un volumen suficiente de tampón de trabajo para proporcionar una relación en volumen 1:1. Se agitó cuidadosamente de nuevo la muestra o se volteó durante 30 segundos, se dejó sedimentar y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. El volumen de tampón de trabajo se mantuvo a 1:1 mediante cualquier adición necesaria de tampón de trabajo y se mantuvieron las perlas hidratadas en tampón a 4°C hasta su uso.

Preparación de perlas prehidratadas

- 25 Se obtuvieron Amino Toyopearl™ y otras perlas como suspensiones húmedas en etanol al 20% y no se requirieron etapas de hidratación adicionales. Sin embargo, se realizó equilibrio a tampón de trabajo como sigue. Los fabricantes estiman que las suspensiones comerciales contienen aproximadamente 72% de resina en volumen y se usaron 300 µl de suspensión por columna. Se transfirieron las perlas a un tubo de plástico de 15 ml (por ej., Falcon) y se añadieron 10 ml del tampón de trabajo. Se agitó cuidadosamente la muestra o se volteó durante 30 segundos.
- 30 Se dejó que las perlas sedimentan por gravedad durante aproximadamente 12-15 minutos o hasta que la mayoría de las perlas completas estuvo en el fondo del tubo. Se drenó cuidadosamente la disolución de sobrenadante (incluyendo los finos) y se desechó. Se repitió el enjuague de tampón de trabajo dos veces más y se añadió un volumen suficiente de tampón de trabajo para proporcionar una relación en volumen 1:1. Se agitó cuidadosamente

de nuevo la muestra o se volteó durante 30 segundos, se dejó sedimentar y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. Se mantuvo el volumen de tampón de trabajo a 1:1 mediante cualquier adición necesaria de tampón de trabajo y se mantuvo la resina hidratada en tampón a 4°C hasta uso.

Preparación y manipulación de glóbulos rojos.

- 5 Se añadió una bolsa de 110 ml de Adsol™ (Baxter, Bloomington, IN) a una bolsa de aproximadamente 250 ml de concentrados de glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés) que contenían aproximadamente 250-300 ml de RBC y glóbulos blancos y plaquetas residuales. El hematocrito resultante (volumen de glóbulos rojos (RBC)/volumen total) fue aproximadamente 50-55%. Se mezclaron por inversión Adsol™:CPD (citrato fosfato dextrosa) y los RBC. Se hizo pasar después la mezcla por un filtro de leucorreducción Pall (Pall Corporation, East Hills, NY) a temperatura ambiente en ocho horas de recogida y se puso en una nueva bolsa. Este procedimiento disminuyó la cantidad de leucocitos en la mezcla de RBC. Se mantuvo el RBC leucofiltrado en la nueva bolsa a 4°C durante hasta 42 días. La composición final de la mezcla tampón en esta preparación fue 30,6% de Adsol/8,5% de CPD v:v. Previamente a uso, se comprobó el porcentaje de hemólisis de la preparación de RBC midiendo la absorbancia a 415 nm del sobrenadante después de centrifugación. No se usaron las preparaciones de RBC que tenían más de un 2% de aumento de hemólisis sobre el valor de hemólisis obtenido inmediatamente después de la preparación.

Preparación y manipulación de homogenado de cerebro.

- 20 Se preparó homogenado de cerebro de hámster normal (10% p/v) por Dr. Robert Rohwer y colaboradores en la Universidad de Maryland según sus métodos establecidos. Se prepararon alícuotas en volúmenes de 1,8 ml y se mantuvieron congeladas a -80°C o en nitrógeno líquido hasta su uso. Alternativamente, se descongelaron una vez para tomar alícuotas. Se usaron sesenta microlitros de homogenado de cerebro por columna en cada experimento.

- 25 Después de descongelar una muestra de homogenado de cerebro, se puso la muestra sobre hielo húmedo. Después se añadieron 6,6 µl de reactivo Sarkosyl al 5% (0,5 g de Sarkosyl disueltos en 9,5 ml de tampón CPD:Adsol (CPD al 8,5%, Adsol al 30,6% y PBS al 60,9% v:v:v)) a cada alícuota de 60 µl de homogenado de cerebro descongelado. Se sometió a agitador vorticial la muestra y se balanceó cuidadosamente sobre hielo húmedo durante 30 minutos para permitir su desnaturalización. Después se centrifugó la muestra a 1.466 rad/s (14.000 rpm) en una microcentrífuga durante cinco minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se desechó el botón. Se mantuvo el sobrenadante sobre hielo húmedo durante un máximo de una hora. El sobrenadante resultante fue un homogenado de cerebro al 10% que contenía reactivo Sarkosyl al 0,5%. Se aplicaron las alícuotas tratadas a las columnas no más tarde de una hora después de la preparación y se mantuvo sobre hielo húmedo durante la manipulación.

Transferencia cuantitativa de perlas hidratadas a las columnas.

- 35 Para cada columna vacía, se añadieron 750 µl de disolución de Tween™ 20 al 0,1%. Se añadió después un mililitro de Etanol al 20% (v:v) a cada columna y se dejó fluir por la gravedad. Se añadió 2 x 1 ml de agua desionizada, degaseada, adicional, a cada columna para separar por lavado la disolución de etanol y retirar cualquier aire restante atrapado en las fritas. Usando una pipeta cuantitativa, se transfirieron 400 µl de una suspensión de perlas hidratadas a una columna. Se dejó que el tampón de trabajo en exceso fluyera por gravedad por las perlas húmedas transferidas y después se lavó la columna tres veces con 1 ml de tampón de trabajo antes de introducir las muestras.

Preparación de co-mezcla de RBC (Disoluciones expuestas)

- 40 Usando una jeringa y una aguja de calibre 18 (o mayor), se pusieron 540 µl de RBC/columna en un tubo cónico de polipropileno. Se centrifugó el tubo a 314 rad/s (3.000 rpm) durante diez minutos para separar una capa de Adsol™ en la parte de arriba. Después se añadieron 60 µl de homogenado de cerebro tratado al 10% sobre la parte de arriba de la capa de Adsol™, reduciéndose de ese modo el contacto directo entre la preparación de RBC y material agregado muy concentrado, es decir, homogenado de cerebro y detergente Sarkosyl. Se mezcló por inversión la mezcla conjunta, se mantuvo sobre hielo húmedo y se usó a las cuatro horas de la preparación. Previamente al uso en el ensayo de columna, se llevó la mezcla a temperatura ambiente durante diez minutos.

Adición de disoluciones expuestas a las columnas

- 50 Una vez llenadas todas las columnas con perlas hidratadas, se mezclaron las disoluciones expuestas y se estratificaron muy cuidadosamente sobre las perlas a un volumen de 0,5 ml/columna. Se dejó que las disoluciones fluyeran por las columnas por gravedad. El tiempo de flujo total fue entre aproximadamente cinco y veinte minutos.

- 55 Los primeros 0,5 ml de flujo pasante de disolución expuesta se recogieron en un criovial de 2 ml. Se añadieron unos 0,5 ml adicionales de tampón de trabajo a cada columna y el flujo pasante se recogió en el mismo criovial. Después se enjuagaron las columnas de perlas cinco veces con 1 ml de tampón de trabajo durante lo cual se volvieron a suspender de manera continua las perlas pipeteando para asegurar un lavado meticuloso y uniforme. Después se recuperaron las perlas de las columnas como se describe a continuación.

Recuperación cuantitativa de las perlas ligadas.

5 A cada columna, se añadieron 0,75 ml de tampón de trabajo. Se descargó la columna usando pipeta para suspender las perlas y se transfirió rápidamente la suspensión a un tubo graduado. Se dejó sedimentar la suspensión de perlas dentro del tubo y se retiró tanto sobrenadante como fue posible sin alterar la capa de perlas. Después se añadió este sobrenadante de nuevo a la misma columna y se repitieron las etapas anteriores dos veces para transferir las perlas restantes desde la columna al tubo. Después se dejó que sedimentaran las perlas por gravedad durante diez minutos y se registró el volumen de la capa de perlas dentro del tubo graduado.

Preparación de perlas ligadas para análisis.

10 Primero, se ajustó el nivel de tampón de trabajo en cada tubo a 1 ml y se hizo una suspensión de las perlas por agitación vorticial cuidadosa del tubo. Usando una pipeta, se retiraron 500 µl de la suspensión y se transfirieron a un pequeño tubo microcentrifugador Eppendorf™ (Brinkmann instruments, Westbury, NY). Se dejó que la suspensión sedimentara durante diez minutos y se ajustó el volumen de perlas sedimentadas a 100 µl. Después se centrifugaron las perlas transferidas y se retiró el sobrenadante. Se prepararon inmediatamente las alícuotas de perlas por electroforesis y análisis por el método western.

15 Cuantificación de perlas secas frente a perlas hidratadas.

Se calculó el peso seco basándose en volumen de perlas sedimentadas y relación de hinchamiento como sigue:

Peso seco de perlas = Volumen sedimentado/Relación de hinchamiento

Relación de hinchamiento = Volumen de perla hidratado (µl)/ Peso seco (mg)

Para Toyopearl™ 42,5 mg de peso seco = 200 µl de perlas húmedas en metanol al 20%.

20 Relación de hinchamiento (en metanol al 20%) = 200/42,5=4,71.

Ejemplo 4

Análisis por ensayo Western

25 Los siguientes procedimientos del método Western se diseñaron para permitir la valoración de proteínas del prión infecciosas y no infecciosas, recuperadas o reducidas, de disoluciones de homogenados de cerebro agregados a concentrados de glóbulos rojos (RBC). Estos procedimientos se aplicaron a muestras obtenidas del ensayo de unión a priones de la columna descrito anteriormente en el Ejemplo 3, incluyendo muestras de perlas expuestas a las disoluciones expuestas y muestras de las disoluciones expuestas que fluyeron por las columnas y se recogieron.

30 En general, las muestras procedían del ensayo de unión de la columna de perlas con materiales de unión fijados como objetivo que reaccionaron con disoluciones que contenían priones o de flujo pasante de estas reacciones. Después se analizó por método Western en las muestras preparadas la presencia de proteína del prión. Se llevó a cabo la inmunodetección de proteína del prión usando anticuerpos monoclonales de ratón primarios específicos para proteínas del prión. Estos inmunocomplejos del prión fueron detectados después con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina y se visualizó una reacción quimioluminiscente en una película de rayos X.

Preparación de las muestras de electroforesis de gel

35 Las siguientes etapas se realizaron preferiblemente inmediatamente después del ensayo de columna descrito en el Ejemplo 3.

40 Para cada muestra de perlas de la columna preparada, se mezclaron 100 µl de perlas suspendidas en pozos con 100 µl de tampón de muestra X2 Invitrogen mediante agitación vorticial. También se prepararon controles por mezcla del homogenado de cerebro no usado (cerebro humano normal, cerebro CJD esporádico, cerebro de hámster normal, cerebro de hámster de tembladera, etc.) del ensayo en columna con Tampón de Muestra X2 Invitrogen. Más específicamente, se añadieron 20 µl de alícuota de homogenado de cerebro a 40 µl de tampón de muestra X2.

45 También se preparó un control de IgG de Ratón como sigue. Se preparó un estándar de 50 ng por línea mezclando 20 µl de 2,5 mg/ml de IgG de ratón con 480 µl de PBS, que iguala 100 µl/ml. Se añade 25 de esta mezcla a 475 de tampón de muestra 2X Invitrogen para proporcionar una disolución de 5 ng/ml. 10 µl de esto por línea proporcionaron 50 ng/línea para el estándar de gel de carga directa de alta concentración. Se mezclaron cinco microlitros de una disolución de 100 µg/ml de IgG de Ratón con 495 µl de tampón de muestra reducido 2X Invitrogen. Esto dio como resultado 1 ng/µl de IgG de Ratón; cargar 10 µl de esto por línea proporcionó 10 ng/línea (el estándar de gel de carga directa de alta concentración) (10 ng/línea). También se preparó un estándar de gel de carga directa de baja concentración de IgG de Ratón (2 ng/línea) por dilución del estándar de concentración media de la etapa previa por mezcla de 50 µl del IgG de Ratón de 1 ng/µl en tampón de carga con 200 µl de tampón de muestra Invitrogen 2X (que da como resultado 0,2 ng/µl). Cargar 10 µl de esto por pozo proporcionó 2 ng/línea.

También se prepararon Estándares de Peso Molecular Pre-Marcado Invitrogen SeeBlue Plus2 como indica el fabricante.

5 Todas las muestras se calentaron en tampón Invitrogen durante diez minutos a 90°C. Las muestras se centrifugaron brevemente después y se almacenaron durante la noche a -20°C. Se repitió el procedimiento de calentamiento la siguiente mañana, previamente a aplicar las muestras al gel de SDS-PAGE.

Procedimiento de inmunoreacción

10 Después de que se cargara un gel SDS-PAGE NuPAGE Bis Tris al 12% con las muestras descritas anteriormente, se sometió a electroforesis el gel durante 45 minutos a 200 V constante y se realizó un procedimiento de transferencia electroblot. La membrana a la que se transfirió la proteína se puso después en una Placa Cuadrada de Fischer y se incubó durante una hora en una plataforma de basculante a temperatura ambiente en 25 ml de agente de bloqueo Western Breeze (12,5 ml de agua, 5 ml de Diluyente A y 7,5 ml de Diluyente B). Se desechó la disolución de bloqueo.

15 Se incubó la membrana en una dilución 1:5.000 de disolución de anticuerpo primario Signet 3F4 en 20 ml de Diluyente de Anticuerpo Primario Western Breeze fresco (14 ml de agua, 4 ml de diluyente A, 2 ml de diluyente B). Se diluyó previamente el anticuerpo primario 1:1 en glicerol y por lo tanto, la dilución de trabajo fue 1:10.000. Se incubó la membrana con refrigeración en una plataforma basculante.

20 Se desechó la disolución de anticuerpo primaria y se lavó la membrana tres veces durante diez minutos cada una en 20 ml de Lavado de Anticuerpo Western Breeze™ (1,25 ml de Disolución de Lavado de Anticuerpo (X16) en 18,75 ml de agua) a temperatura ambiente en una plataforma basculante. Se incubó después la membrana en anticuerpo secundario AP3 1:10.000 (KPL, Gaithersburg, MD) en 20 ml de Diluyente de Anticuerpo Primario Western Breeze durante 60 minutos a temperatura ambiente en una plataforma basculante. Se desechó la disolución de anticuerpo secundario y se lavó la membrana en Lavado de Anticuerpo Western Breeze como se describió anteriormente. Después se lavó la membrana con 20 ml de Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM a pH 9,8 durante diez minutos a temperatura ambiente.

25 Procedimiento de desarrollo quimioluminiscente

30 Se transfirió la membrana a una bandeja seca y se remojó con 5 ml de Sustrato Quimioluminiscente premezclado Western Breeze (sustrato CDP Star™, Applied Biosystems, Foster City, CA) durante cinco minutos con agitación suave. Se secó la membrana ligeramente con una toalla de papel y después se puso en un protector de láminas. Después se transfirió la membrana en el protector de láminas a un casete de película (sin pantalla de intensificación) mantenida a temperatura ambiente durante 30 minutos y se expuso a autoradiografía durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Ejemplo 5

Unión de PrPc endógeno de plasma humano.

35 Para mostrar la capacidad de las resinas de unión a prión para retirar PrPc de plasma humano endógeno, no agregado con PrPc, se realizaron los siguientes experimentos.

Se usó plasma humano mezclado, fresco, no diluido, para unión de PrPc endógeno mediante materiales de unión de prión. Se descongeló plasma humano mezclado, congelado, a 37°C, se filtró por un filtro de 0,45 µm y se añadió Sarkosyl a una concentración final de 0,05%. La unión de plasma a las columnas y la detección de priones se realizaron como se describió en otra parte en la presente memoria descriptiva.

40 Los resultados de ensayo de unión de PrPc endógeno de plasma humano se representan en la Figura 1. El panel A representa los resultados de detección por ensayo Western de proteína del prión en eluido de las perlas en ausencia de Sarkosyl (la línea 1 es marcador de peso molecular; línea 2 - Mo IgG ba; línea 3 - Mo IgG med; línea 4 - Mo IgG alta; línea 5 - plaquetas humanas normales; líneas 6-7 - resina a; líneas 8-9 - resina b; líneas 10-11 - Amino 650-M; líneas 12-13 - Amino 650 acetilado). El panel B representa los resultados de detección mediante el ensayo Western de la fracción no ligada de las muestras en el Panel A (línea 1 - marcador de peso molecular; línea 2 - Mo IgG bajo; línea 3 - Mo IgG med; línea 4 - Mo IgG alta; línea 5 - cerebro de hámster normal (nHB); línea 6 - plaquetas humanas normales; líneas 7-8 - resina a; líneas 9-10 - resina b; líneas 11-12 - Amino 650-M; líneas 13-14 - Amino 650 acetilado.). El panel C muestra los resultados de detección por ensayo Western de proteína del prión en presencia de Sarkosyl (línea 1 - marcador de peso molecular; línea 2 - Mo IgG bajo; línea 3 - Mo IgG med; línea 4 - Mo IgG alto; línea 5 - cerebro de hámster normal; línea 6 - plaquetas humanas; línea 7 - plasma humano normal + Sarkosyl, 1:10; línea 8 - resina a; línea 9 - resina a; línea 10 - resina b; línea 11 - resina b; línea 12 - Amino 650-1; línea 13 - Amino 650-2). El panel D muestra los resultados de detección de fracciones no ligadas de las muestras en el Panel C por ensayo Western de proteína del prión en presencia de Sarkosyl (línea 1 - marcador de peso molecular; línea 2 - Mo IgG bajo; línea 3 - Mo IgG med; línea 4 - Mo IgG alto; línea 5 - cerebro de hámster normal; línea 6 - plaquetas humanas; línea 7 - plasma humano normal + Sarkosyl; línea 8 - resina a; línea 9 - resina a; línea 10 - resina b; línea 11 - resina b; línea 12 - Amino 650-1; línea 13 - Amino 650-2).

Con referencia a la Figura 1, el panel A, líneas 10 y 11 y el panel C, líneas 12 y 13, se detectó la unión de PrPc a resina Toyopearl™ Amino 650-M; la unión se suprimió si se retiraba la carga en el grupo amino por acetilación (resultados mostrados en el panel A, líneas 12 y 13).

- 5 Los resultados experimentales demostraron la capacidad de las resinas para unir PrPc endógeno de plasma humano, proporcionando de ese modo pruebas de que las resinas son útiles para la eliminación de PrP de muestras obtenidas de seres humanos o animales.

Ejemplo 6

Requerimiento de espaciador para unir PrPsc de fracciones de sangre

- 10 Como se muestra en la Figura 1, la resina Toyopearl™ Amino 650-M se ligó a PrPc endógena de plasma humano. Al menos una porción de esta resina contenía un brazo espaciador o grupo patentado para Tosoh™. Se investigó la importancia del espaciador para unir PrPsc.

- 15 Estuche de Aislamiento de Cuatro (4) Proteínas para columnas de Identificación de Sorbente (PIKSI™) (se empaquetaron 0,5 ml/cada una como sigue: dos columnas cada una de una muestra experimental de Toyopearl™ Amino 650 M que carece de espaciador y una resina Toyopearl™ Amino 650 M comercial con un espaciador. También se ensayó resina Toyopearl™ Amino 650 C que carece de espaciador.

- 20 Se trataron dos mililitros (2 ml) de homogenado de cerebro con tembladera (SBH) al 10% con Sarkosyl al 0,5%. Se expusieron las columnas con sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con tampón de trabajo (1:100) por adición de 3 ml de SBH en 297 ml de tampón de trabajo. Se expusieron las columnas por duplicado con 10 ml de SBH diluido en tampón por carga a la velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se recogió el flujo por las disoluciones y se retiraron alícuotas de resina de cada columna y se lavó con 10 ml de tampón de trabajo.

- 25 Se sometió la mitad de cada muestra a digestión con proteinasa K con cada resina y la exposición en tampón. Se ensayaron las muestras por Métodos Western como se describió en la presente memoria en otra parte. Los resultados como se muestra en la Figura 2 (línea 1 - marcadores de peso molecular; línea 2- SBH tratado con Sarkosyl al 0,1% en tampón-PK; línea 3 – SBH tratado con Sarkosyl al 0,1% en tampón + PK; línea 4 -MWM; línea 5 - Amino 650M (comercial)-PK (1); línea 6 - Amino 650M (comercial)-PK (2); línea 7 - Amino 650M (comercial) + PK (1); línea 8 - Amino 650M (comercial) + PK (2); línea 9 - Amino 650M (experimental) + PK (1); línea 10 - Amino 650M (experimental) + PK (2); línea 11 - Amino 650M (experimental) + PK (1); línea 12 - Amino 650M (experimental) + PK (2); línea 13 - Amino 650C-PK (1); línea 14 - Amino 650C-PK (2); línea 15 - Amino 650C + PK (1); línea 16 - Amino 650C + PK (2)). Los resultados experimentales mostrados en la Figura 2 indican claramente que la presencia de un
30 brazo espaciador es necesario para unir PrPsc por la resina Amino 650-M.

Ejemplo 7

Captura de PrPc en presencia de altas concentraciones de albúmina de suero humano (HSA).

Para demostrar la capacidad de las resinas para retirar PrP de un producto terapéutico que comprende diversas proteínas, se investigó la unión de PrPc de en presencia de albúmina de suero humano.

- 35 Se empaquetaron cuatro columnas Bio-Rad™ con aminorresina Toyopearl™ Amino 650 M. La altura del lecho de resina fue 1 cm y el volumen fue 0,5 ml. Se enjuagaron las columnas de manera abundante con tampón de trabajo. Las muestras cargadas en las columnas fueron como sigue:

Columna I-nHaBH al 1% (homogenado de cerebro de hámster normal) en tampón de trabajo;

Columna II -HaBH al 1%, HSA al 25% (Sigma) en tampón de trabajo;

- 40 Columna III - HaBH al 1%, HSA al 25% (Sigma) y N-Ac-Trp 20 mM (Acros Organics, Bélgica) en tampón de trabajo;

Columna IV -HaBH al 1%, preparación American Red Cross (prep ARC).

Se disolvió N-Ac-Trp 20 mM en HSA al 25% en tampón de trabajo, con agitación y calentamiento a 37°C, durante 45 minutos. Se preparó el sobrenadante de nHaBH al 10% como se describió previamente y se diluyó 1:10 en materiales de elección (etapa 2) para obtener nHaBH al 1%.

- 45 Se conectó el fondo de cada columna con una bomba peristáltica de 4 canales. Se hicieron pasar cinco mililitros (5 ml) de nHaBH al 1% preparado en la etapa previa sobre las columnas I-IV a un caudal de 0,5 ml/min. Se lavaron las columnas con 10 ml de tampón de trabajo/columna, a un caudal de 0,5 ml/min. Se recuperaron las resinas, preparadas las muestras como se describió previamente y se realizaron en geles SDS-PAGE de Bis-Tris al 12%.

- 50 Se usaron métodos Western usando anticuerpo primario 3F4 para detectar PrPc que había sido capturado por las resinas. La fotografía del método se muestra en la Figura 3 (línea 1 – control IgG Ratón Bajo; línea 2 - control IgG Ratón Med.; línea 3 – control de nHaBH; línea 4 – columna de HaBH al 1%; línea 5-columna de HaBH al 1%, HSA al

25%; línea 6-columna de HaBH al 1%, HSA al 25%, N-AC-Trp 20 mM; línea 7-HaBH al 1%, columna prep ARC). Se observaron las bandas de aproximadamente la misma intensidad en cada línea, indicando que la resina Toyopearl™ 650-M amino capturó PrPc de homogenado de cerebro de hámster en presencia de albúmina de suero humano al 25% obtenida de una variedad de fuentes.

5 Los resultados experimentales como se muestran en la Figura 3 demuestran la capacidad de las resinas para unirse a proteína del prión de una muestra que comprende HSA, proporcionando de ese modo pruebas de que las resinas son útiles para unir proteínas del prión en diversos productos terapéuticos y asegurando la seguridad de los productos terapéuticos en que se usan proteínas sanguíneas, por ejemplo, como estabilizantes o agentes terapéuticos y que pueden estar contaminados con PrP.

10 Ejemplo 8

Unión de PrPsc a aminorresina en albúmina de suero humano.

La unión de PrPsc infecciosa agregada a albúmina se demostró en el experimento descrito a continuación. Se empaquetaron 12 columnas PIKSI, 0,5 ml cada una, con resina Toyopearl™ Amino 650 M. Se trataron 2 ml de SBH al 10% (homogenado de cerebro con tembladera) con Sarkosyl al 0,5%.

15 Las siguientes seis exposiciones se prepararon como se indica en líneas generales a continuación.

1. Exposición con SBH en tampón: sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con tampón de trabajo (1:100); se añadieron 0,22 ml de SBH a 22 ml de tampón de trabajo.

2. Exposición con SBH en HSA (formulación American Red Cross (ARC)): sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con HSA al 25%(1:100); se añadieron 0,22 ml de SBH a 22 ml de HSA (Formulación American Red Cross).

20 3. Exposición con SBH en HSA (Sigma) con N-acetil-DL-triptófano y Caprilato: sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con HSA al 25% (1:100) que contiene N-acetil Trp 20 mM y Caprilato 20 mM; se obtuvo albúmina de Sigma y no contenía aditivos; se añadieron 0,22 ml de SBH a 22 ml de disolución de HSA.

4. Exposición con SBH en HSA (Sigma) con N-acetil Trp: sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con HSA al 25% (1:100); se añadieron 0,22 ml de SBH a 22 ml de HSA con N-acetil Trp 20 mM.

25 5. Exposición con SBH en HSA (Sigma) con caprilato: sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con HSA al 25% (1:100); se añadieron 0,22 ml de SBH a 22 ml de HSA con caprilato 20 mM.

6. Exposición con SBH en HSA (Sigma) sólo: sobrenadante tratado con Sarkosyl diluido con HSA al 25% (1:100); se añadieron 0,22 ml de SBH a 22 ml de HSA (Sigma).

30 Cada resina se expuso por duplicado con 10 ml de disolución. Se cargaron las columnas a un caudal de 0,5 ml/min controlado con una bomba peristáltica. Se recogieron las disoluciones de flujo pasante, a medida que estaba la resina de cada columna. Se condujo la digestión de proteinasa K con cada resina y se expuso en tampón. Se sometieron las muestras a métodos Western según el método descrito en la presente memoria. Se representan los métodos en la Figura 4 (panel A: línea 1 – Estándar de Peso molecular; línea 2 - SBH tratado con Sarkosyl al 0,1% en tampón - PK; línea 3 - SBH tratado con Sarkosyl al 0,1% en tampón + PK; línea 4 - SBH en tampón-PK(1); línea 5 - SBH en tampón-PK(2); línea 6 - SBH en tampón + PK (1); línea 7 - SBH en tampón + PK (2); línea 8 - SBH en HSA (formulación ARC)-PK(1); línea 9 - SBH en HSA (Formulación ARC)-PK(2); línea 10 -SBH en HSA (formulación ARC) + PK(1); línea 11 - SBH en HSA (formulación ARC) + PK(2); línea 12 - SBH en HSA (Sigma) -PK(1); línea 13 - SBH en HSA (Sigma) -PK(2); línea 14 -SBH en HSA (Sigma) + PK(1); línea 15 - SBH en HSA (Sigma) + PK(2); línea 35 ; Panel B: línea 1 - Estándar de Peso molecular; línea 2 - SBH tratado con Sarkosyl al 0,1% en tampón - PK; línea 3 -SBH tratado con Sark al 0,1% en tampón + PK; línea 4 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp-PK(1); línea 5 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp-PK(2); línea 6 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp+ PK(1); línea 7 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp+ PK(2); línea 8 - SBH en HSA (Sigma) con Caprilato-PK(1); línea 9 - SBH en HSA (Sigma) con Caprilato -PK(2); línea 10 - SBH en HSA (Sigma) con Caprilato + PK(1); línea 11 - SBH en HSA (Sigma) con Caprilato + PK(2); línea 12 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp y Caprilato-PK(1); línea 13 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp y Caprilato-PK(2); línea 14 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp y Caprilato + PK (1); línea 15 - SBH en HSA (Sigma) con AcetilTrp y Caprilato + PK (2).

Los resultados mostrados en la Figura 4 demuestran que la PrPres infecciosa podía unirse a una aminorresina cuando se combina con albúmina de suero humano y que una variedad de aditivos no interfirió con la unión.

50 Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describieron métodos y materiales adecuados anteriormente. Los materiales, métodos y ejemplos sólo son ilustrativos y no se destinan a ser limitantes.

Se proporciona la descripción anterior para describir diversas realizaciones referentes a la invención. Se pueden hacer diversas modificaciones, adiciones y supresiones a las realizaciones y estructuras sin apartarse del alcance de la invención.

Listado de secuencias

- <110> American Red Cross
Universidad del Estado de Carolina del Norte
Prometic Biosciences, Ltd.

- <120> Materiales de Unión de Proteína del Prión y Métodos de Uso

- <130> 51821-0111WP (51821-299536)

- <150> Patente EE.UU. 60/460.474
- <151> 2003-04-04

- <160> 1

- <170> PatentIn version 3.2

- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> Sintética

- <400> 1

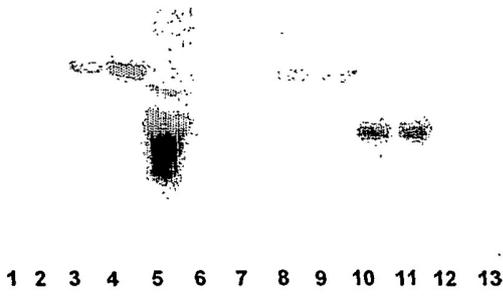
- Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
1 5

REIVINDICACIONES

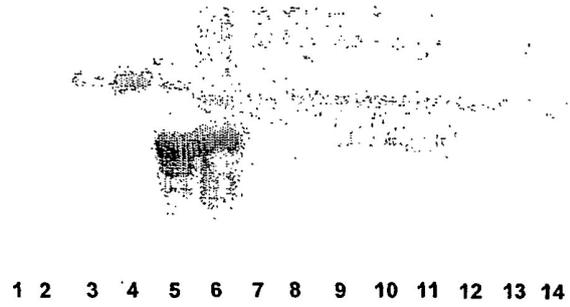
- 5 1. Un método de detección y separación de una proteína priónica infecciosa, PrPsc, de una muestra que comprende poner en contacto la muestra con el material de unión de proteína del prión en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la proteína del prión infecciosa y el material de unión de la proteína del prión, en el que el material de unión del prión comprende un grupo funcional, en el que el grupo funcional es un grupo funcional hidrófilo, uno hidrófobo o uno anfifílico seleccionado del grupo que consiste en: $-OCH_2-CHOH-CH_2NH_2$, $-C_6H_5$, $-(CH_2)_3-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N^+H(CH_3)_2$, $-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$, un grupo dimetilaminoetilo y un grupo trimetilaminoetilo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el material de unión comprende aluminio o sílice.
- 10 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el material de unión comprende una matriz polimérica.
4. El método según la reivindicación 3, en el que la matriz polimérica es un polimetacrilato o un metacrilato.
5. El método según la reivindicación 3, en el que la matriz polimérica es una resina de polimetacrilato.
6. El método según la reivindicación 3, en el que la matriz polimérica es una resina de hidroxilpolimetacrilato.
- 15 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el grupo funcional es $-OCH_2-CHOH-CH_2NH_2$.
8. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que el material de unión está en forma de perla.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra es una muestra biológica, un producto alimenticio, una muestra medioambiental o una muestra de agua.
- 20 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra comprende hasta 50% de albúmina de suero en peso.

FIGURA 1

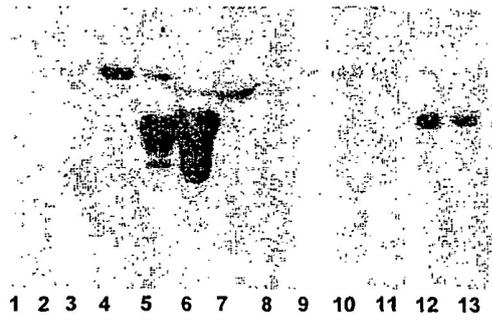
A



B



C



D

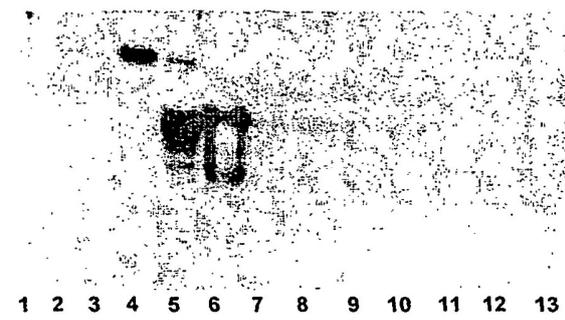


FIGURA 2

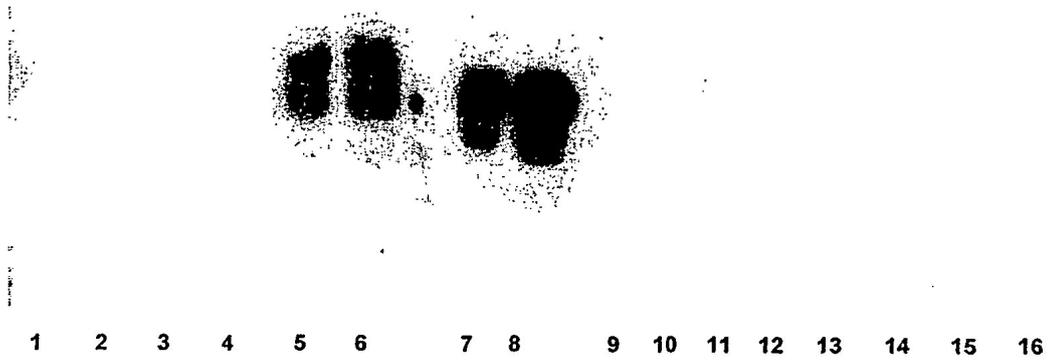


FIGURA 3

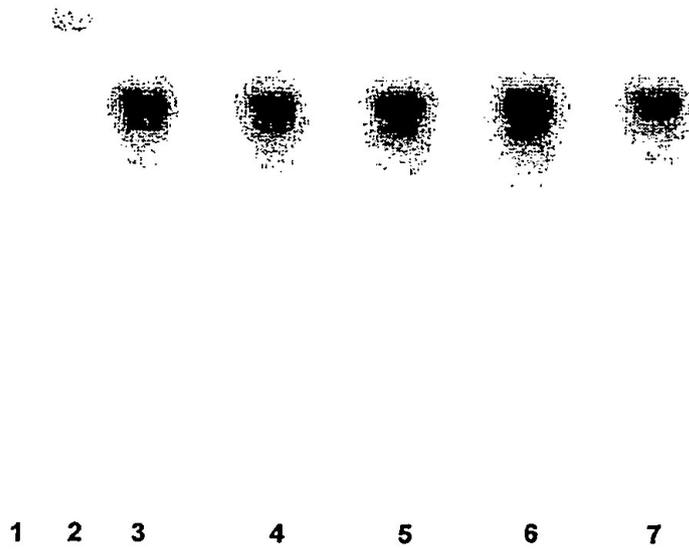


FIGURA 4

