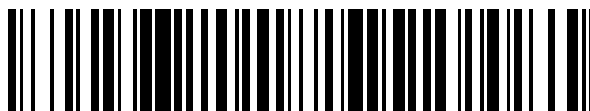


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 050**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2012** **E 12160615 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014** **EP 2503336**

54 Título: **Nanoesferas recubiertas de plasminógeno como soporte directo de amplificación cíclica de la proteína priónica PrPsc**

30 Prioridad:

21.03.2011 FR 1152298

21.03.2011 US 201161454727 P

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

03.02.2015

73 Titular/es:

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (100.0%)
20 avenue du Stade de France
93210 La Plaine Saint Denis, FR

72 Inventor/es:

SEGARRA, CHRISTIANE;
COSTE VAN DER LUUR, JOLIETTE y
BOUGARD, DAISY

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 528 050 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

Nanoesferas recubiertas de plasminógeno como soporte directo de amplificación cíclica de la proteína priónica PrP^{sc}.

5

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento in vitro de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento una etapa previa de captura del conformero patógeno mediante puesta en contacto de la muestra con nanoesferas recubiertas de un ligando del conformero patógeno, a continuación la implementación de una amplificación cíclica de la proteína priónica mal plegada directamente sobre el soporte sólido que ha capturado el conformero patógeno, y la detección de la presencia de conformero patógeno. La invención también se refiere a un kit para la implementación de este procedimiento.

[0002] Las enfermedades conformacionales constituyen un grupo de enfermedades no emparentadas entre sí pero que comparten los mismos mecanismos moleculares que implican la transición conformacional de una proteína existente (conformero no patógeno) hacia un plegamiento aberrante (conformero patógeno) que conduce a agregaciones proteicas y la formación de depósitos tisulares.

[0003] Son ejemplos típicos de estas enfermedades las encefalopatías espongiformes transmisibles y la enfermedad de Alzheimer. Las encefalopatías espongiformes transmisibles son relativamente raras en seres humanos pero fueron objeto de una atención particular cuando se revelaron los riesgos de transmisión de la forma bovina de la encefalopatía espongiforme al hombre, a través de la cadena alimentaria. La variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vECJ) es la contrapartida humana de la encefalopatía espongiforme bovina.

[0004] A principios del año 2010, se habían catalogado 246 casos primarios de vECJ en 11 países diferentes. Aunque la incidencia clínica de la vECJ sigue siendo reducida, la prevalencia global de la enfermedad en la fase preclínica es evaluada en 1:4000 en Reino Unido. La proteína priónica celular normal (PrP^c), que experimenta una transición conformacional hacia un conformero patógeno anormalmente plegado (PrP^{sc}), está en el origen de las encefalopatías espongiformes transmisibles. La proteína PrP^{sc} se encuentra principalmente a nivel del cerebro y de los órganos linfáticos de los animales infectados, pero también puede detectarse en numerosos tejidos que incluyen el músculo esquelético, el hígado, el páncreas, los riñones, el útero y la piel.

[0005] Esta distribución periférica de la PrP^{sc} plantea el problema de la transmisión potencial entre individuos de la variante de la ECJ, mediante cirugía o procedimiento médico invasivo, tal como la transfusión sanguínea o los trasplantes.

[0006] Es, por lo tanto, particularmente importante poder detectar de manera sensible y específica las donaciones de sangre que hubieran podido ser recogidas a partir de pacientes afectados por la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob. El control sanitario de los alimentos de origen animal (leche, carnes) es también importante.

[0007] De forma más general, el desarrollo de un procedimiento altamente sensible y específico para detectar conformeros patógenos de enfermedades priónicas presenta una utilidad para el diagnóstico de estas enfermedades en pacientes, en particular cuando están todavía en una fase asintomática.

45

[0008] La capacidad de la proteína priónica PrP^{sc} de catalizar la transformación del conformero no patógeno en un conformero patógeno se aprovechó para desarrollar un procedimiento de detección de conformeros patógenos mediante amplificación cíclica. Esta tecnología, llamada "amplificación cíclica de proteínas mal plegadas" (PMCA) también ha sido descrita por Saborio et al. (Nature, 2001, 401 (6839): 810-3). La amplificación cíclica se basa en la conversión de un sustrato constituido por conformeros no patógenos mediante cantidades no detectables de conformeros patógenos, para obtener niveles de conformeros patógenos detectables mediante procedimientos convencionales tales como inmunotransferencias (*immunoblots*). Esto se hace posible mediante la repetición de ciclos de incubación del conformero patógeno en presencia del conformero no patógeno, que permiten incrementar la cantidad de conformero patógeno, seguida de la desagregación de los agregados formados, para hacer accesibles a los conformeros patógenos para catalizar la conversión de nuevos conformeros no patógenos.

[0009] Sin embargo, la amplificación cíclica de la proteína PrP^{sc} directamente a partir de la sangre, sigue siendo difícil, particularmente debido a los grandes volúmenes de muestras requeridos para permitir una detección y debido a la presencia en la sangre de inhibidores de la proteína PrP^{sc}.

[0010] Para remediar estos problemas, los inventores intentaron desarrollar una metodología de PMCA mejorada, con una etapa previa de concentración de la proteína PrP^{SC}.

5 **[0011]** Ensayos realizados utilizando fosfotungstato de sodio o sulfato de estreptomicina, aunque condujeron efectivamente a una concentración de la proteína PrP^{SC}, no permitieron a continuación una amplificación eficaz del conformero patógeno PrP^{SC} por PMCA.

[0012] Los inventores han conseguido desarrollar un procedimiento extremadamente sensible de detección
10 de la proteína PrP^{SC}, basado en la captura del conformero patógeno de la proteína priónica presente en la muestra a analizar, con ayuda de un soporte sólido constituido por nanoesferas recubiertas de plasminógeno, seguida de la amplificación directa del conformero patógeno unido al soporte sólido mediante PMCA, a continuación detección de los conformeros patógenos amplificados.

15 **[0013]** Recientemente se ha descrito que nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro tenían la capacidad de unirse selectivamente a la proteína PrP^{SC} (Miller y Supattapone, J. Virol. 12 de enero de 2011. [Publicación electrónica previa a la impresión]). La capacidad de la proteína PrP^{SC} de unirse a las nanopartículas se puso de manifiesto implementando un ciclo de amplificación PMCA directamente sobre las nanopartículas que se han unido a PrP^{SC}. Este artículo sugirió que la implementación de una etapa de concentración mediante unión de
20 PrP^{SC} con las nanopartículas magnéticas, acoplada a una PMCA, podría mejorar la detección de concentraciones reducidas de proteínas priónicas. Los niveles de amplificación mostrados después de 72 horas de PMCA siguen siendo, sin embargo, muy reducidos, no dando 5 µl de cerebro al 5% ninguna señal sin PMCA y dando una señal muy débil con PMCA para la cepa RML de ratones CD1, y una señal débil para la cepa 237 de hámster.

25 **[0014]** Por otro lado, se ha descrito que el plasminógeno actúa como un cofactor que estimula la conversión de la proteína PrP^C, estando la velocidad de producción de PrP^{SC} multiplicada por aproximadamente 2,5 en presencia de 0,5 µM de plasminógeno humano en el medio de reacción de PMCA (Mays y Ryou, Prion. 2011; 5(1): 22-7; Mays y Ryou, FASEB J. 2010; 24(12): 5102-12).

30 **[0015]** El principio de la implementación de una amplificación PMCA después de concentración de la proteína PrP^{SC} con ayuda de esferas recubiertas de un ligando de la proteína PrP^{SC} ha sido descrito por los inventores (Transfusion Clinique et Biologique 2009, 16(3): 295), sin identificar, sin embargo, la naturaleza del ligando utilizado.

[0016] Ahora bien, se han identificado varios tipos de ligando de la proteína PrP^{SC} e incluyen particularmente
35 ácidos nucleicos aptámeros (Sayer et al., J. Biol. Chem. 2004, 279(13): 13102-13109), anticuerpos anti-ADN (Zou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 2004, 101: 1380-1385), anticuerpos monoclonales anti-PrP^{SC}, (Korth et al., Nature 1997, 390: 74-77, y Paramithiotis et al., Nat. Med. 2003, 9: 893-899) y ligandos polianiónicos (solicitud de patente internacional WO 03/073106).

40 **[0017]** Los inventores han demostrado de este modo, de manera inesperada, que el plasminógeno unido a nanoesferas permite unir los conformeros patógenos PrP^{SC} y que estos siguen siendo accesibles para la conversión de conformeros no patógenos PrP^C en conformeros patógenos PrP^{SC}.

[0018] La especificidad del plasminógeno por la proteína PrP^{SC} es controvertida, habiéndose descrito a la vez
45 que el plasminógeno se une exclusivamente a la proteína PrP^{SC} (véase por ejemplo Fischer et al. Nature 2000, 408(6811): 479-483; Maissen et al., The Lancet,) mientras que otros trabajos mostraron que el plasminógeno se unía también a la proteína PrP^C (Cuccioloni et al., Proteins 2005; 58(3): 728-734).

[0019] De este modo, la solicitud WO 02/00713 describe que el plasminógeno se une a PrP^{SC} y que puede
50 emplearse en un procedimiento de concentración de PrP^{SC} mediante tratamiento de una muestra fluida con una fase sólida que porta plasminógeno.

[0020] La solicitud EP1435521 describe que el plasminógeno permite diferenciar PrP^{SC} de PrP^C y que el
55 plasminógeno unido a esferas magnéticas permite precipitar selectivamente PrP^{SC}.

[0021] Sin haber aclarado si las esferas recubiertas de plasminógeno capturaban solamente la proteína PrP^{SC} o también las isoformas de PrP normal a partir de las muestras a analizar, los inventores formularon la hipótesis de que la presencia de PrP^C residual además de la proteína del conformero patógeno PrP^{SC} no representaba un problema fundamental teniendo en cuenta que la amplificación cíclica de las proteínas mal

plegadas realizada a continuación utiliza la proteína PrP^C como sustrato para la amplificación de la proteína PrP^{SC}.

[0022] La implementación del procedimiento de los inventores a plasmas dopados con homogeneizados de cerebro infectado de ratones transgénicos modelos de tembladera de los ovinos (línea tg 338) permitió la detección de la proteína PrP^{SC} en diluciones con un factor 10⁻¹⁰ de homogeneizados de cerebros infectados, que corresponden al equivalente de una cantidad inicial de 10 pg de cerebro. De este modo, se obtuvo una sensibilidad más elevada que la obtenida mediante un bioensayo efectuado en la misma cepa (dilución 10⁻⁸; Tixador et al., PLoS Pathog 2010, 6(4:e1000859)). La sensibilidad del procedimiento desarrollado de este modo correspondería a menos de 0,01 veces la dosis letal media. El procedimiento de los inventores aplicado a la detección de la proteína priónica en glóbulos blancos de oveja, es sensible al 100%.

[0023] Por otro lado, se ha demostrado que la etapa de captura es esencial, cuando el procedimiento se implementa en muestras de sangre, para poder detectar la proteína PrP^{SC} en las muestras infecciosas, la PMCA realizada sin captura previa conducía a resultados falsos negativos.

[0024] El procedimiento aplicado a la detección de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob humana permitió la detección de la proteína PrP^{SC} humana en muestras de plasma humano adicionado con homogeneizados de cerebro infectados con el equivalente de una cantidad inicial de tan solo 100 pg de cerebro.

[0025] Con respecto a la metodología de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas descrita por Jones et al. (Transfusion 2009, 49(2): 376-84) que detectaba la proteína PrP^{SC} utilizando las plaquetas como sustrato de amplificación, el procedimiento según la presente solicitud permitió obtener una sensibilidad 100 veces más elevada.

[0026] El procedimiento in vitro de detección de confórmero patógeno de una proteína característica de una enfermedad conformacional descrito en la presente solicitud constituye, por lo tanto, una mejora innegable frente a procedimientos de detección disponibles hoy en día.

Definiciones

[0027] La expresión «enfermedad conformacional» designa un conjunto de enfermedades caracterizadas por fenómenos de agregación proteica y de depósitos tisulares relacionados con la transición conformacional de una proteína, característica de la enfermedad conformacional, entre un confórmero normal, no patógeno, y un confórmero patógeno.

[0028] Las enfermedades conformacionales incluyen particularmente las encefalopatías espongiformes transmisibles.

[0029] La encefalopatía espongiforme transmisible (EET) designa las formas humanas de EET, en particular la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ) o su variante (vECJ), la enfermedad de kuru, la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheiker (GSS) y el insomnio familiar fatal (IFF), y las formas animales de EET, en particular la tembladera de los ovinos (o «*scrapie*»), la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la encefalopatía transmisible del visón (ETV) y la enfermedad consuntiva crónica (ECC) del cérvido. Una encefalopatía espongiforme transmisible es, preferentemente, la ECJ o su variante, más preferentemente, la vECJ.

[0030] Por «proteína característica de una enfermedad conformacional», se entiende una proteína que existe normalmente en forma de un confórmero no patógeno en un individuo sano y que puede experimentar una transición conformacional que conduce a un plegamiento anormal (confórmero patógeno). El confórmero patógeno es generalmente insoluble y forma agregados. El confórmero patógeno tiene la capacidad de interactuar específicamente con el confórmero no patógeno y de catalizar su conversión en confórmero patógeno, garantizando de este modo una propagación de la transición conformacional del confórmero patógeno al confórmero no patógeno.

[0031] La proteína característica de las encefalopatías espongiformes transmisibles es la proteína priónica (PrP) cuyo confórmero no patógeno se denomina generalmente PrP^C y el confórmero patógeno PrP^{SC} o PrP^{EST}.

55 *Procedimiento de detección de un confórmero patógeno de la proteína priónica*

[0032] La invención se refiere a un procedimiento de detección de un confórmero patógeno de la proteína priónica que comprende una etapa de concentración del confórmero anormal mediante captura del confórmero anormal presente en una muestra a analizar con ayuda de un ligando del confórmero anormal, el plasminógeno,

fijado sobre un soporte sólido constituido por nanoesferas, implementándose a continuación directamente una etapa de amplificación cíclica de proteínas priónicas mal plegadas sobre el soporte sólido que tiene fijadas moléculas de conformero anormal.

5 **[0033]** La invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento in vitro de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica (PrP^{SC}) en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- a) poner en contacto nanoesferas recubiertas de plasminógeno con una muestra;
- 10 b) separar dichas nanoesferas recubiertas de plasminógeno de la muestra;
- c1) poner en contacto dichas nanoesferas recubiertas de plasminógeno obtenidas en la etapa b) con una preparación que comprende el conformero no patógeno de la proteína priónica (PrP^C);
- c2) desagregar los agregados formados eventualmente durante la etapa c1);
- 15 d) detectar la presencia de PrP^{SC} en la preparación, siendo la presencia de PrP^{SC} en la preparación indicativa de la presencia de PrP^{SC} en la muestra;

formando las etapas c1) y c2) un ciclo que se repite al menos dos veces antes de implementar la etapa d).

[0034] Una muestra a analizar, en el sentido de la invención, puede ser cualquier fluido o sólido alimentario, en particular de origen animal, tal como leche, carne, y cualquier muestra biológica de un sujeto humano o animal.

[0035] El término «sujeto» designa un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, un ovino, un porcino, un cérvido, un felino, un cánido, un roedor o un visón.

25 **[0036]** Una «muestra biológica» puede designar un fluido biológico, células o un tejido, como por ejemplo sangre, linfa, orina, leche, tejido cerebral, médula espinal, tejidos o células linfáticas, o cualquier producto derivado de una fuente humana o animal susceptible de estar contaminado por un conformero patógeno tal como, por ejemplo, una preparación de hormona del crecimiento o un extracto tisular. Una muestra biológica también puede designar una extracción de sangre, de plasma, o un órgano destinado a un trasplante.

30 **[0037]** Cuando la muestra es un tejido, el procedimiento según la invención puede implementarse sobre un homogeneizado del tejido.

[0038] Por «nanoesferas» se designa esferas de un diámetro comprendido entre 1 y 900 nm, preferentemente entre 10 y 750 nm, más preferentemente entre 30 y 500 nm, más preferentemente entre 50 y 300 nm o incluso entre 75 y 150 nm.

[0039] Las nanoesferas son, preferentemente, paramagnéticas. Las nanoesferas paramagnéticas contienen generalmente un porcentaje elevado de óxidos de hierro, por ejemplo al menos el 50% en peso, o incluso al menos el 70% en peso. Pueden utilizarse nanoesferas paramagnéticas disponibles en el mercado, como por ejemplo las distribuidas por Ademtech (Francia), para la implementación de la invención. Puede tratarse, en particular, de nanoesferas carboxílicas superparamagnéticas tales como las esferas Carboxyl-Ademtech de la compañía Ademtech.

45 **[0040]** Sin desear estar vinculados por esta teoría, los inventores piensan que la utilización de nanoesferas paramagnéticas es importante para la implementación del procedimiento según la invención, ya que las nanoesferas, al repelerse constantemente debido a su paramagnetismo, permanecerían más tiempo en suspensión, favoreciendo de este modo la accesibilidad de las proteínas PrP^{SC} capturadas a las proteínas PrP^C de la mezcla de reacción de PMCA. En efecto, ensayos realizados con microesferas no permitieron obtener una amplificación satisfactoria de las proteínas PrP^{SC} capturadas cuando las etapas de incubación se realizan en ausencia de agitación.

[0041] Las nanoesferas están recubiertas de plasminógeno, y eventualmente de al menos otro tipo de ligando del conformero patógeno de la proteína priónica.

55 **[0042]** El plasminógeno es, preferentemente, plasminógeno humano.

[0043] Un «ligando de un conformero patógeno de la proteína priónica» es una molécula que puede ser de cualquier naturaleza, por ejemplo peptídica, proteica, ácido nucleico, lipídica, iónica, etc., y que es capaz de fijar un

confórmero patógeno de la proteína priónica. El ligando puede unir el confórmero patógeno preferentemente al confórmero no patógeno, más preferentemente puede unir específicamente el confórmero patógeno. El hecho de que el ligando pueda unirse a la vez al confórmero patógeno y al confórmero no patógeno no es limitante para la implementación de la invención ya que la etapa de captura del confórmero patógeno viene seguida a continuación por una amplificación cíclica de proteínas mal plegadas durante la cual el confórmero no patógeno constituye el sustrato de amplificación. Una unión preferencial o específica del ligando al confórmero patógeno, con respecto al confórmero no patógeno, es sin embargo preferible para evitar saturar el soporte sólido con una parte de confórmero no patógeno, con el riesgo de reducir la eficacia de la captura del confórmero patógeno a partir de la muestra a analizar.

[0044] Un ligando del confórmero patógeno PrP^{SC} puede seleccionarse entre el grupo constituido por ácidos nucleicos aptámeros (véase Sayer et al., J. Biol. Chem. 2004, 279(13): 13102-13109), anticuerpos anti-ADN (véase Zou et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 2004, 101: 1380-1385), anticuerpos monoclonales anti-PrP^{SC}, (véase por ejemplo Korth et al., Nature 1997, 390: 74-77, y Paramithiotis et al., Nat. Med. 2003, 9: 893-899) y ligandos polianiónicos.

[0045] Se han descrito ligandos polianiónicos apropiados en la solicitud de patente internacional WO 03/073106, e incluyen particularmente poliglucósidos polianiónicos, en particular poliglucósidos polisulfonados, preferentemente polisulfato de pentosano o sulfato de dextrano; politileniminas; poliaminas, particularmente polilisinas; poliamidoaminas, por ejemplo dendrímeros poli(amidoamina); y poliaminas cuaternarias tales como poli(cloruro de dialildimetilamonio) o polibreno (o polimetobromuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaudecametileno o bromuro de hexadimetrina). Se ha descrito que este tipo de ligandos se une a las proteínas PrP^{SC}, β -amiloide y tau.

[0046] Los aptámeros constituyen una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de ácidos nucleicos que tienen la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con una alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante un cribado llamado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) de un banco de secuencias aleatorias, tal como se ha descrito en Tuerk y Gold (Science. 1990 3; 249(4968): 505-10). El banco de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis de ADN mediante química combinatoria. En dicho banco, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, que corresponde a una secuencia única. Las posibles modificaciones, aplicaciones y ventajas de esta clase de moléculas fueron objeto de una revisión por Jayasena (Clin Chem. 1999 45(9): 1628-50). Los aptámeros también pueden ser de naturaleza peptídica. Consisten en una región variable conformacionalmente constreñida, ensamblada sobre una plataforma proteica, tal como Tiorredoxina A de E. coli, y pueden seleccionarse a partir de bancos combinatorios mediante procedimientos de doble híbrido (Colas et al., Nature 1996, 380, 548-50).

[0047] El plasminógeno, y eventualmente el ligando del confórmero patógeno de la proteína priónica, puede fijarse sobre las nanoesferas paramagnéticas mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, mediante unión directa o indirecta, por ejemplo mediante un medio físico (calor, presión), o químico mediante creación de enlaces covalentes o no covalentes (hidrófobos, aniónicos) por medio de grupos reactivos de tipo carboxilo, amina o de forma pasiva, por ejemplo si el ligando es un material polianiónico y el soporte sólido está compuesto por poliestireno, etc.

[0048] En la etapa a) del procedimiento según la invención, las nanoesferas recubiertas de plasminógeno se ponen en contacto con la muestra a analizar. Las nanoesferas se incuban en contacto con la muestra durante un periodo suficiente y en condiciones que permiten la unión al plasminógeno de todos o parte de los confórmeros patógenos PrP^{SC} presentes en la muestra.

[0049] El periodo y las condiciones de incubación pueden ser variables en función de la naturaleza de la muestra. Las condiciones y el periodo de incubación se determinarán preferentemente de modo que el plasminógeno fijado sobre las nanoesferas pueda fijar un máximo de confórmero patógeno PrP^{SC}.

[0050] La incubación puede realizarse a cualquier temperatura, por ejemplo en frío (4-10°C), a temperatura ambiente o a 37°C. Se implementa preferentemente a 37°C. La incubación puede realizarse con agitación (por ejemplo de 1 rpm a 1400 rpm) o sin agitación. La incubación puede realizarse durante un periodo de 1 minuto a 5 días, preferentemente durante de 5 minutos a 24 horas, preferentemente de 10 minutos a 4 horas, preferentemente de 30 minutos a 3 horas, más preferentemente de 1 hora a 2 horas. El periodo de incubación es susceptible de ser ajustado en función de las cantidades respectivas de confórmero patógeno de la proteína priónica en la muestra y de plasminógeno fijado sobre el soporte sólido.

[0051] Una optimización de los parámetros de captura permitió alcanzar una eficacia de captura de un rendimiento superior al 95%. Para ello se realizaron ensayos cruzados entre la cantidad de esferas a utilizar para la captura en 500 µl de plasma y la concentración de plasminógeno necesaria para la funcionalización de las 5 nanoesferas. Los ensayos realizados en una amplia gama de los dos componentes permitieron observar que las cantidades de nanoesferas y la concentración de plasminógeno debían definirse de manera muy fina para una captura óptima. En efecto, contrariamente a las ideas preconcebidas, las cantidades máximas no son las más eficaces. De este modo, en el caso de nanoesferas carboxílicas paramagnéticas (Ademtech, Francia) la 10 amplificación óptima se obtiene cuando las esferas son funcionalizadas con una cantidad de plasminógeno correspondiente a la cantidad mínima de proteína recomendada por el proveedor de nanoesferas.

[0052] De este modo, preferentemente, las nanoesferas, en particular las nanoesferas paramagnéticas, utilizadas en el marco de la invención, están recubiertas de plasminógeno a razón de 10 a 30 µg de plasminógeno por mg de nanoesferas, más preferentemente a razón de 10 a 20 µg de plasminógeno por mg de nanoesferas, de la 15 forma más preferente a razón de 10 µg de plasminógeno por mg de nanoesferas.

[0053] Del mismo modo, para los volúmenes de nanoesferas carboxílicas paramagnéticas funcionalizadas mediante el plasminógeno utilizadas para la captura, la señal óptima se obtiene con 10 µl de nanoesferas al 1% (es decir 10 µl de una suspensión de nanoesferas a 1 mg de nanoesferas por ml de suspensión). Una disminución de 20 señal se observa cuando se utilizan 20 µl y finalmente la señal desaparece cuando la captura se realiza con 30 µl de las nanoesferas funcionalizadas por el plasminógeno. Del mismo modo, cuando se utilizan cantidades decrecientes de nanoesferas funcionalizadas por el plasminógeno, la señal disminuye cada vez más cuando se utilizan 5 µl de nanoesferas para la captura y después con 2,5 µl de nanoesferas.

25 **[0054]** De este modo, preferentemente, las nanoesferas recubiertas de plasminógeno se ponen en contacto, en la etapa a) del procedimiento según la invención, con una muestra a una proporción de 2,5 a 90 µl de una suspensión de nanoesferas al 1% (peso/volumen) para de 50 a 500 µl de muestra, más preferentemente una proporción de 5 a 50 µl de una suspensión de nanoesferas al 1% (peso/volumen) para de 250 a 500 µl de muestra, de la forma más preferente una proporción de 8 a 12 µl de una suspensión de nanoesferas al 1% (peso/volumen) 30 para de 450 a 500 µl de muestra.

[0055] De este modo, una fijación óptima del confórmero patógeno PrP^{SC} sobre nanoesferas recubiertas de plasminógeno puede realizarse, por ejemplo, poniendo 500 µl de muestra de plasma en contacto con 10 µl de una 35 suspensión de nanoesferas (en particular nanoesferas carboxílicas paramagnéticas) al 1% (peso/volumen) recubiertas a razón de 10 µg de plasminógeno/mg de nanoesferas, e incubadas a 37°C durante dos horas.

[0056] Al final de la etapa a), las nanoesferas recubiertas de plasminógeno se separan de la muestra (etapa b)). Esta etapa puede implementarse recogiendo las nanoesferas por imantación o por centrifugado. 40 Ventajosamente, las esferas recogidas pueden lavarse.

[0057] Las nanoesferas recogidas de este modo después de la separación de la muestra portarán moléculas de confórmero patógeno PrP^{SC} unidas al plasminógeno, si la muestra analizada comprendía proteínas PrP^{SC}.

[0058] Puede utilizarse inmediatamente para proceder a la amplificación cíclica de las proteínas priónicas mal 45 plegadas o almacenarse en frío, por ejemplo a 4°C, antes de la utilización.

Amplificación cíclica de las proteínas priónicas mal plegadas

[0059] La amplificación cíclica de las proteínas priónicas mal plegadas se implementa utilizando directamente 50 el confórmero patógeno PrP^{SC} unido a las nanoesferas por medio de su ligando, el plasminógeno.

[0060] Esta amplificación se implementa repitiendo de manera cíclica las etapas que consisten en:

- 55 c1) poner en contacto dichas nanoesferas obtenidas en la etapa b) con una preparación que comprende dicho confórmero no patógeno PrP^C; y
c2) desagregar los agregados formados eventualmente durante la etapa c1).

[0061] La tecnología de amplificación cíclica de las proteínas mal plegadas es conocida por el experto en la

materia y se ha descrito particularmente en la solicitud de patente internacional WO 2002/004954.

[0062] La «preparación que comprende dicho confórmero no patógeno PrP^C» puede ser, por ejemplo, un homogeneizado de cerebro o de tejido linfático, o un fluido biológico, tal como sangre completa, plasma, etc., o un lisado celular de un individuo sano, preferentemente procedente de un individuo de la misma especie que el individuo del que proviene la muestra biológica a analizar (por ejemplo un homogeneizado de cerebro humano sano si se analiza una muestra biológica humana). La preparación que comprende dicho confórmero no patógeno PrP^C puede ser también una solución que comprende confórmero no patógeno PrP^C extraído y eventualmente purificado, sintético o recombinante.

[0063] Ventajosamente, el confórmero no patógeno PrP^C utilizado puede estar marcado, de manera radiactiva o fluorescente, de cara a la etapa de detección posterior.

[0064] Preferentemente, en la etapa c1), la cantidad de confórmero no patógeno PrP^C utilizada está en exceso con respecto a la cantidad de confórmero patógeno PrP^{SC} fijada a las nanoesferas.

[0065] Generalmente, la proporción inicial de confórmero no patógeno PrP^C con respecto a confórmero patógeno PrP^{SC}, si está presente, unido a las nanoesferas, será superior a 100:1, preferentemente superior a 1000:1, y más preferentemente superior a 1000000:1.

[0066] Las etapas c1) y c2) se implementan preferentemente en condiciones fisiológicas (pH, temperatura y fuerza iónica), eventualmente en presencia de inhibidores de proteasas y de detergente. Las condiciones se seleccionan preferentemente para permitir a los confórmeros patógenos PrP^{SC}, unidos a las nanoesferas por medio de plasminógeno, convertir los confórmeros no patógenos PrP^C en confórmeros patógenos PrP^{SC}, formando de este modo agregados u oligómeros de confórmeros patógenos PrP^{SC}.

[0067] Las condiciones precisas de incubación y el periodo de incubación podrán ser ajustados por el experto en la materia.

[0068] Por ejemplo, la etapa c1) puede implementarse durante de 1 minuto a 5 días, preferentemente durante de 1 minuto a 24 horas, preferentemente durante de 5 minutos a 6 horas, más preferentemente durante de 10 minutos a 4 horas, más preferentemente durante de 20 minutos a 2 horas, más preferentemente durante de 30 a 90 minutos, más preferentemente durante de 30 a 60 minutos. La incubación puede realizarse a cualquier temperatura, por ejemplo en frío (4-10°C), a temperatura ambiente o a 37°C. Se implementa preferentemente a 37°C. La incubación puede realizarse con agitación (por ejemplo de 1 rpm a 1400 rpm) o sin agitación.

[0069] La etapa c2) de desagregación puede realizarse mediante cualesquiera medios conocidos por el experto en la materia, tales como el tratamiento con disolventes (en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), acetonitrilo, dimetilsulfóxido, urea, ácido prefluoroacético diluido, ácido fórmico diluido, etc.), la modificación de los parámetros fisicoquímicos de la preparación, tales como pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica y procedimientos físicos, tales como sonicación, irradiación láser, congelación, descongelación, prensa francesa, incubación en autoclave, alta presión, mezcla, etc. Preferentemente, la desagregación se implementa por sonicación.

[0070] La etapa c2) se realiza de modo que al menos una parte de los agregados eventualmente formados durante la etapa c1) se desagregue. La duración de la etapa c2) podrá ser determinada por el experto en la materia en función del medio de desagregación utilizado. La etapa c2) durará generalmente entre 1 segundo y 1 hora. Sin embargo, puede estar prevista una duración superior. Si la desagregación se realiza por sonicación, la duración de la etapa c2) podrá ser, por ejemplo, de 1 segundo a 10 minutos, preferentemente de 2 segundos a 5 minutos, preferentemente de 5 segundos a 2 minutos, preferentemente de 10 segundos a 1 minuto, más preferentemente de 20 a 40 segundos.

[0071] La sucesión de las etapas c1) y c2) constituye un ciclo. Para la implementación del procedimiento según la invención, las etapas c1) y c2) se implementan sucesivamente al menos dos veces, es decir que el procedimiento comprende la repetición de al menos dos ciclos.

[0072] El número de ciclos a realizar puede ser determinado por el experto en la materia para obtener una amplificación suficiente del confórmero patógeno PrP^{SC}, para permitir su detección posterior.

[0073] El número de ciclos implementado en el procedimiento relacionado con la invención puede estar comprendido, por ejemplo, entre 2 y 1000, preferentemente entre 20 y 500, más preferentemente entre 50 y 350, más preferentemente entre 80 y 240.

5 **[0074]** En particular, la etapa c1) puede implementarse durante de 20 minutos a 2 horas, por ejemplo durante de 30 a 120 minutos, o entre 30 y 90 minutos, o incluso entre 30 y 60 minutos, la etapa c2) implementarse por sonicación durante de 10 segundos a 1 minuto, por ejemplo durante de 20 a 40 segundos y el número de ciclos puede estar comprendido entre 50 y 350, por ejemplo entre 50 y 100 por ronda de amplificación. La desagregación puede realizarse preferentemente con ayuda de un sonicador Misonix 4000, con una potencia comprendida entre el
10 60 y el 80%.

[0075] Las condiciones óptimas de amplificación en muestras de plasma dopado con homogeneizados de cerebro han sido identificadas como 30 minutos de incubación, 20 segundos de sonicación al 80% de potencia y 80 ciclos, pudiendo repetirse esta amplificación si la cantidad de confórmero patógeno obtenida es demasiado pequeña
15 para permitir una detección sensible.

[0076] De forma muy clásica, la amplificación de la proteína PrP^{Sc} por PMCA implementa ciclos en los que la etapa c1) dura 30 minutos.

20 **[0077]** Los inventores han constatado, sin embargo, que si, en el primer ciclo de amplificación por PMCA, el periodo de incubación de la etapa c1) es de solamente 30 minutos para muestras a analizar extremadamente concentradas en proteína PrP^{Sc}, la conversión de proteína PrP^C presente en la mezcla de reacción de PMCA (es decir comprendiendo dicha preparación el confórmero no patógeno PrP^C) puede no ser suficiente para iniciar eficazmente la amplificación por PMCA. En este caso, después de la etapa c2) de desagregación, es posible que no
25 quede suficiente proteína PrP^{Sc} apta para garantizar la conversión conformacional de la proteína PrP^C y que, al final, la proteína PrP^{Sc} presente en la muestra no pueda detectarse. La prolongación de la duración de la etapa c1) del primer ciclo de amplificación, por ejemplo a aproximadamente 90 minutos, permite descartar el riesgo de resultado falso negativo.

30 **[0078]** De este modo, ventajosamente el procedimiento según la invención comprende:

- un primer ciclo de amplificación en el que la etapa c1) se implementa durante de 60 a 120 minutos, preferentemente durante de 80 a 100 minutos, más preferentemente durante aproximadamente 90 minutos, pudiendo realizarse la etapa c2) en las condiciones tal como se han descrito anteriormente, preferentemente
35 mediante sonicación durante de 10 segundos a 1 minuto, más preferentemente durante de 20 a 40 segundos, y a continuación
- uno o varios ciclos de amplificación en los que las condiciones de implementación de las etapas c1) y c2) son tal como se han descrito anteriormente. Por ejemplo, la etapa c1) puede implementarse durante de 30 a 60 minutos y/o la etapa c2) puede implementarse mediante sonicación durante de 20 a 40 segundos. El número de
40 estos ciclos puede estar comprendido entre 49 y 99 por ronda de amplificación. La desagregación puede realizarse preferentemente con ayuda de un sonicador Misonix 4000, con una potencia comprendida entre el 60 y el 80%.

[0079] Al final de la amplificación cíclica, se detecta la presencia o la cantidad de confórmero patógeno
45 presente en la preparación.

Detección

[0080] La detección del confórmero patógeno PrP^{Sc} puede estar precedida por una etapa d1) de destrucción o de eliminación del confórmero no patógeno PrP^C, también presente en la preparación al final de la etapa c2). Siendo los confórmeros patógenos PrP^{Sc} generalmente insolubles, incluso en presencia de detergente no desnaturizante, y siendo resistentes a las proteasas, esta etapa puede realizarse típicamente mediante tratamiento con una o varias proteasas, tales como proteinasa K, tripsina, etc., o mediante centrifugado para separar los
50 confórmeros patógenos PrP^{Sc} insolubles de los confórmeros no patógenos solubles.

55 **[0081]** La detección de confórmero patógeno PrP^{Sc} presente en la preparación, eventualmente tratado como se indica en la etapa d1), puede realizarse mediante cualquier procedimiento apropiado. A título de ejemplos no limitantes, pueden utilizarse los siguientes procedimientos de detección:

- electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de transferencia de Western;
- inmunoensayo, en particular ELISA directo, indirecto, de tipo sándwich, utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína priónica, preferentemente específicos del conformero patógeno;
- ensayos radiactivos o fluorescentes: la utilización de conformero no patógeno marcado (de forma radiactiva con ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , etc., o de manera fluorescente, con cualquier fluoróforo apropiado) para la amplificación cíclica permite obtener, mediante transición conformacional, el conformero patógeno PrP^{SC} neoformado marcado que puede detectarse y cuantificarse;
- utilización de chips de proteínas, sensores velocimétricos, biosensores electroquímicos, etc.

10 **[0082]** A modo de ilustración, la detección de la proteína PrP^{SC} puede realizarse como se describe en el ejemplo 1 mediante separación por SDS-PAGE e inmunotransferencia con ayuda de anticuerpos monoclonales anti-PrP (por ejemplo el anticuerpo monoclonal 3F4 anti-PrP humana o el anticuerpo monoclonal 6D11 anti-PrP ovina).

15 **[0083]** La detección de la presencia de dicho conformero patógeno PrP^{SC} en la preparación es indicativa de la presencia del conformero patógeno PrP^{SC} en la muestra analizada.

20 **[0084]** Cuando el procedimiento según la invención se implementa sobre una muestra biológica de un sujeto, la detección de la presencia de dicho conformero patógeno en la etapa d) es indicativa de una enfermedad priónica o encefalopatía espongiforme transmisible (EET) en el sujeto. El procedimiento constituye entonces un procedimiento de diagnóstico in vitro de una enfermedad EET. Si la muestra es una extracción, por ejemplo de sangre, de plasma o de un órgano, la detección de la presencia de dicho conformero patógeno PrP^{SC} en la etapa d) indica entonces que la extracción de sangre o plasma es inapropiada para la transfusión, o el órgano es inapropiado para el trasplante, ya que es potencialmente infeccioso como vector de una EET.

25 **[0085]** Cuando el procedimiento según la invención se implementa sobre una muestra que es un fluido o sólido alimentario, la detección de la presencia de dicho conformero patógeno PrP^{SC} en la etapa d) es indicativa de una muestra contaminada por el conformero patógeno PrP^{SC} , inapropiada para el consumo, ya que es potencialmente infecciosa como vector de una EET.

30 **[0086]** La etapa d) puede comprender la cuantificación de dicho conformero patógeno PrP^{SC} .

Kit de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica

35 **[0087]** La invención también se refiere a un kit para la implementación del procedimiento según la invención.

[0088] Dicho kit puede comprender:

- nanoesferas, preferentemente paramagnéticas;
- plasminógeno, preferentemente humano
- 40 - eventualmente otro tipo de ligando del conformero patógeno de la proteína priónica;
- una cantidad conocida del conformero no patógeno PrP^{C} ;
- y eventualmente instrucciones para la implementación de un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente.

45 **[0089]** Preferentemente, dicho kit comprende nanoesferas ya recubiertas de plasminógeno y eventualmente de dicho al menos un tipo de ligando del conformero patógeno PrP^{C} .

[0090] El kit puede comprender, además, al menos un medio de desagregación, como por ejemplo al menos un disolvente o un aparato de desagregación física tal como un sonicador, un láser, etc.

50 **[0091]** El kit puede comprender, además, al menos un medio de detección tal como uno o varios anticuerpos dirigidos contra la proteína priónica, preferentemente al menos un anticuerpo específico del conformero patógeno.

[0092] Las instrucciones contenidas en el kit pueden precisar en particular cómo implementar la sucesión de las etapas de captura del conformero patógeno, de amplificación cíclica de las proteínas mal plegadas y de detección.

Procedimiento de descontaminación de una muestra biológica

[0093] Las nanoesferas recubiertas de plasminógeno también pueden utilizarse para capturar las proteínas priónicas PrP^{Sc} presentes en una muestra biológica para descontaminarla librándola de las proteínas PrP^{Sc} que contiene.

5 **[0094]** De este modo, la invención también se refiere a un procedimiento de descontaminación de una muestra biológica susceptible de contener el conformero patógeno de la proteína priónica (PrP^{Sc}), comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- 10 a) poner en contacto nanoesferas, preferentemente paramagnéticas, recubiertas de plasminógeno con una muestra;
- b) separar dichas nanoesferas paramagnéticas recubiertas de plasminógeno de la muestra;
- c) recoger la muestra descontaminada de este modo.

15 **[0095]** En la etapa a) de este procedimiento, las nanoesferas recubiertas de plasminógeno se ponen en contacto con la muestra a analizar y se incuban en contacto con la muestra durante un periodo suficiente y en condiciones que permiten la unión al plasminógeno de todos los conformeros patógenos PrP^{Sc} presentes en la muestra.

20 **[0096]** El periodo y las condiciones de incubación pueden ser variables en función de la naturaleza de la muestra.

25 **[0097]** La incubación puede realizarse a cualquier temperatura, por ejemplo en frío (4-10°C), a temperatura ambiente o a 37°C. Preferentemente se implementa a 37°C. La incubación puede realizarse con agitación (por ejemplo de 1 rpm a 1400 rpm) o sin agitación. La incubación puede realizarse durante un periodo de 1 minuto a 5 días, preferentemente durante de 10 minutos a 24 horas, preferentemente de 30 minutos a 8 horas, preferentemente de 1 a 4 horas, más preferentemente de 2 horas a 3 horas. El periodo de incubación es susceptible de ser ajustado en función de las cantidades respectivas de conformero patógeno de la proteína priónica en la muestra y de plasminógeno fijado sobre el soporte sólido.

30 **[0098]** Las nanoesferas recubiertas de plasminógeno pueden separarse de la muestra (etapa b)) por ejemplo recogiendo las nanoesferas mediante imantación si las esferas son paramagnéticas o por centrifugado.

35 **[0099]** La descontaminación de la muestra biológica tratada de este modo puede controlarse implementando un procedimiento in vitro de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica (PrP^{Sc}) en una muestra tal como se ha definido anteriormente, para asegurarse la ausencia de conformero patógeno de la proteína priónica en la muestra.

40 **[0100]** Las definiciones y condiciones descritas en relación con el procedimiento de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica según la invención, son aplicables también al kit de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica y procedimiento de descontaminación de una muestra definidos anteriormente.

[0101] La invención se describirá con más detalle considerando los siguientes ejemplos.

45 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

Preparación de las muestras

50

[0102] Se extrajo sangre completa de voluntarios humanos en tubos de recogida que contenían EDTA (Etablissement Français du Sang - Pyrénées, Méditerranée) después de haber obtenido el consentimiento informado por escrito de cada donante de sangre, de acuerdo con la ley francesa (Código de salud pública, artículo L. 1243-3). A continuación, el plasma se aisló y se recogió después de centrifugado a 1500 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.

[0103] Se recogió sangre completa de cuatro ovejas sanas y cuatro ovejas infectadas de forma natural por la tembladera, en la fase terminal de la enfermedad (INRA/Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - Francia). Las ovejas expresaban el alelo V136R154Q171 de la PrP ovina. Los glóbulos blancos sanguíneos de oveja (SWBC) se

prepararon a partir de la capa leucocitaria obtenida después del centrifugado a 2000 g durante quince minutos a temperatura ambiente. Los glóbulos rojos residuales fueron eliminados de la capa leucocitaria mediante lisis en NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8) durante 20 minutos en hielo, seguida de un centrifugado a 1500 g durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se lavaron los SWBC con PBS pH 7,4 y alícuotas de 10^7 SWBC clarificados mediante PBS se almacenaron a -80°C.

[0104] Se prepararon plasmas dopados de la siguiente manera: 500 µl de plasma de donantes humanos sanos se doparon con diluciones en serie a la décima (de 10^{-3} a 10^{-11}) de homogeneizados de cerebro infectado mediante la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vECJ), o de homogeneizados de cerebro infectado con la tembladera (cepa 127S) procedentes de ratones transgénicos con genes ovinos (línea tg338). Los homogeneizados de cerebro infectado (IBH) se prepararon al 10% (peso/volumen) en glucosa al 5% (es decir una dilución 10^{-1}).

Captura de la proteína priónica

15 *Recubrimiento de esferas magnéticas con plasminógeno humano (Plg)*

[0105] Según los estudios publicados por Fischer et al. (Nature, 2000, 408 (6811): 479-483), se utilizó plasminógeno humano como ligando eficaz para la captura de las proteínas priónicas. Esferas caboxílicas nanomagnéticas (Ademtech France) se recubrieron y almacenaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las esferas se recubrieron de plasminógeno humano (Fluka Sigma-Aldrich) por agitación durante 2 horas a 37°C. La cantidad de ligando óptima a utilizar se evaluó poniendo a prueba tres concentraciones de plasminógeno: 10, 20 y 30 µg/mg de esferas, siendo 10 µg/mg de esferas la concentración más baja recomendada por el fabricante. Después de una etapa de bloqueo a 37°C con una solución de albúmina a 0,5 mg/ml, las esferas se almacenaron a 4°C en la solución de almacenamiento de Ademtech.

Captura de la proteína priónica mediante las nanoesferas recubiertas de plasminógeno

[0106] Los plasmas dopados (500 µl) se mezclaron volumen a volumen con un tampón de lisis/unión (tampón LB: PBS 2X, NP40 al 6%, Tween 20 al 6%) antes de la incubación con las esferas recubiertas de plasminógeno a temperatura ambiente durante 90 minutos. La cantidad de esferas a utilizar para cada muestra se evaluó poniendo a prueba diferentes condiciones (2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 90 µl de esferas con plg al 1%). Después una etapa de lavado con PBS, las esferas magnéticas se aislaron para amplificación PMCA posterior.

35 **[0107]** Para la captura de PrP^{EST} a partir de los SWBC, las células se incubaron en primer lugar en hielo durante 30 minutos con 500 µl de tampón LB. Después del centrifugado a 1000 g a 4°C durante 2 minutos, el sobrenadante se recogió y se mezcló con 500 µl de tampón LB antes de la incubación con las nanoesferas recubiertas de plasminógeno como se ha descrito anteriormente.

40 *PMCA (Protein Misfolding Amplification Assay, ensayo de amplificación de proteínas mal plegadas)*

Preparación de los sustratos de PMCA:

45 **[0108]** Los homogeneizados de cerebro normal (NBH) de ratones transgénicos para PrP humana (alelo M¹²⁹, línea tg650) (Beringue et al., PLoS One 2008, 3 (1): e1419) o para PrP ovina (alelo VRQ, línea tg338) (Laude et al., C. R. Biol. 2002, 325 (1): 49-57) se utilizaron como sustrato PrP^{C} para PMCA. Los cerebros se recogieron a partir de animales sacrificados con CO_2 y se perfundieron con PBS que contenía 5 mM de EDTA. Los cerebros se aclararon en PBS frío y se congelaron inmediatamente en hielo seco antes del almacenamiento a largo plazo a -80°C. Los cerebros se homogeneizaron a continuación a una concentración del 10% (peso/volumen) con el tampón de lisis/conversión (tampón CB) compuesto por NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) en PBS (pH 7,2). Los homogeneizados se centrifugaron a 2000 g durante 20 segundos para retirar el grueso de los materiales del cerebro. El sobrenadante se congeló a -80°C en alícuotas de uso único hasta la utilización.

55 *PMCA*

[0109] La proteína priónica capturada se mezcló con 90 µl de NBH al 10%. A continuación, se implementó una amplificación automática mediante PMCA utilizando el Misonix 4000 (Misonix, NY, EE. UU.). Cada ciclo estaba compuesto por una etapa de incubación (37°C) y por una etapa de sonicación. Previamente, los parámetros de

PMCA siguientes se habían optimizado: periodo de incubación por ciclo (30 y 60 minutos, o incluso 90 minutos para el primer ciclo), periodo de sonicación por ciclo (20 y 40 segundos), nivel de potencia (60, 70, 80%) y número de ciclos de PMCA (50, 80, 100) por ronda. Después de la primera ronda de PMCA, el producto de reacción se diluyó en sustrato fresco (1/10) y se repitió la PMCA. Esta técnica se conoce como PMCA en serie (sPMCA). El producto de esta segunda ronda de PMCA también puede diluirse y someterse a PMCA, y así sucesivamente, permitiendo una amplificación indefinida de PrP^{EST}.

Digestión mediante proteinasa K (PK)

10 **[0110]** Los productos amplificados (muestras de 18 µl) se digirieron con PK a 200 µg/ml durante una hora a 45°C. La reacción se interrumpió mediante adición de fluoruro de metilfenil sulfonio 5 mM. Las muestras se desnaturalizaron a continuación a 100°C en un tampón para muestra SDS-PAGE (SDS al 2%, Tris/HCl 100 mM pH 7,4 y azul de bromofenol al 0,5 %) y se almacenaron a -80°C.

15 SDS-PAGE e inmunotransferencias

[0111] Las muestras proteicas se pusieron a migar en geles NUPAGE al 12% (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Francia) a 200 voltios, y se electrotransferieron sobre membranas de PVDF (Millipore, Molsheim, Francia). Después de bloqueo con leche desnatada al 5% en un tampón TBS-Tween 20 al 0,05 %, las transferencias se sondearon con anticuerpos monoclonales anti-PrP, 3F4 MAb o 6D11 MAb (Signet/Proteogenix, Illkirch, Francia) para la detección de la proteína priónica humana y ovina, respectivamente.

[0112] Las transferencias se desarrollaron utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unido a peroxidasa y el sustrato quimioluminiscente Luminol (reactivo ECL, Amersham Bioscience, Francia).

25 Materiales del Instituto nacional para patrones y controles biológicos (NIBSC)

[0113] El NIBSC puso a disposición una serie de reactivos de referencia preparados a partir de muestras de cerebro procedente de humanos a los que se les realizó la autopsia (www.nibsc.ac.uk/cjd/brainsamples.html). Los reactivos de referencia de cerebro se obtuvieron a partir del Centro de Recursos CJD en forma de homogeneizados al 10% (peso/volumen) en sacarosa 0,25 M.

[0114] Se pusieron a prueba dos paneles. El panel 1 estaba compuesto por 20 muestras de plasma negativo que incluían 10 plasmas seleccionados aleatoriamente distribuidos en duplicados. El panel 2 era un panel con enmascaramiento compuesto por duplicados de dilución de cerebro vCJD en plasma normal, y por controles negativos que incluían cerebro normal añadido al plasma y plasma negativo en solitario (4 series de 24 tubos numerados de A a X).

40 Ejemplo 2: Optimización de la tecnología de captura basada en plasminógeno/sPMCA utilizando material de cerebro infectado por la tembladera

[0115] Los parámetros de PMCA se optimizaron utilizando homogeneizados de cerebro normal e infectado por la tembladera procedentes de ratones transgénicos para PrP ovina (alelo VRQ, línea tg338) para la reacción PMCA. La PMCA se evaluó en primer lugar cruzando los parámetros de número de ciclos, incubación, sonicación y potencia del Misonix. Una ronda de 80 ciclos de PMCA (incubación de 30 minutos, sonicación de 20 segundos, potencia 80%) permitió la detección de PrP^{EST} en la dilución IBH 10⁻⁸ por inmunotransferencia (n=3 a partir de 2 IBH diferentes). El nivel de señal observado era similar al obtenido para la dilución 10⁻³ no amplificada, indicando un nivel de amplificación de 5 log mediante la primera ronda de PMCA. Cuando las muestras amplificadas se diluyeron 10 veces en NBH fresco y se sometieron a una segunda ronda de 80 ciclos de PMCA, una señal de detección específica de PrP^{EST} se detectó de manera reproducible hasta la dilución 10⁻¹⁰ (n=3 a partir de 2 IBH diferentes), indicando una amplificación de 7 log. No se detectó ninguna señal con los cerebros no infectados amplificados de manera similar (n=3 a partir de 2 IBH diferentes).

[0116] Estando la PMCA optimizada, los parámetros de captura de la PrP^{EST} por las nanoesferas recubiertas de plasminógeno se optimizaron a continuación (concentración de plasminógeno y volumen de esferas). Una dilución de IBH con la tembladera a 10⁻⁴ se diluyó en plasma humano (500 µl) y se mezcló con diferentes volúmenes de esferas con diferentes concentraciones de plasminógeno antes de la amplificación PMCA. La señal más intensa de PrP^{EST} se observó cuando se utilizaron la concentración más baja de plasminógeno, a 10 µg plasminógeno/mg de esferas, y el volumen más bajo de esferas, 10 µl de esferas/500 µl de plasma dopado.

[0117] Utilizando estas condiciones, PrP^{EST} pudo detectarse en diluciones de IBH a 10^{-6} añadidas a 500 μ l de plasma humano. La señal parecía ser similar a la obtenida cuando se utilizó una dilución de IBH 10^{-6} directamente para sembrar el sustrato PMCA, sugiriendo que la etapa de captura por las nanoesferas recubiertas de plasminógeno era eficaz. Los dos controles negativos (500 μ l de plasma humano mezclados con nanoesferas recubiertas de plasminógeno antes de PMCA) seguían siendo negativos.

Ejemplo 3: validación del ensayo combinado de nanoesferas recubiertas de plasminógeno/sPMCA sobre un panel de sangre de ovejas sanas e infectadas

[0118] A continuación se verificó que las condiciones experimentales utilizadas permitían detectar específicamente nPrP^{EST} en SWBC infectados por la tembladera. Después de una ronda de PMCA (80 ciclos), no se detectó ninguna señal específica de PrP^{EST} por inmunotransferencia en las 4 muestras infectadas de SWBC. Después de una segunda ronda, uno de los 4 SWBC infectados mostró una señal positiva. Después de una tercera ronda de PMCA, se detectó una señal PrP^{EST} intensa en la totalidad de los 4 SWBC infectados, mientras que en las muestras SWBC procedentes de ovejas sanas, no se detectó ninguna señal. La detección de los SWBC de ovejas infectadas por la tembladera y negativas se reprodujo 3 veces.

[0119] Por comparación, la implementación del procedimiento sPMCA en SWBC infectados por la tembladera, sin etapa previa de captura, no permitió detectar la proteína PrP^{EST}.

Ejemplo 4: Evaluación y validación del ensayo de nanoesferas recubiertas de plasminógeno/sPMCA sobre muestras humanas

[0120] Optimizaciones similares de la PMCA se implementaron utilizando los homogeneizados de cerebro humano vCJD y homogeneizados de cerebro normal procedentes de ratones transgénicos para PrP humana (alelo M¹²⁹, línea tg650), como se ha descrito para la PMCA ovina, y los parámetros que dan la amplificación óptima para la PMCA humana se identificaron como exactamente los mismos (80 ciclos, 30 minutos de incubación, 20 segundos de sonicación, potencia 80%).

[0121] Después de la captura de la PrP^{EST} en plasmas humanos dopados por adición de diluciones a 1/10 de IBH vCJD (10^{-5} a 10^{-9}), una primera ronda de PMCA permitió la detección de la proteína en las diluciones IBH a 10^{-6} . Esto indicaba una amplificación de aproximadamente 3 log comparada con la señal obtenida a partir de la dilución 10^{-3} no amplificada.

[0122] Después de una dilución a 1/10 de las muestras amplificadas con NBH frescos, se realizaron una segunda y una tercera ronda de 80 ciclos de PMCA. Esto permitió la detección de una señal específica de PrP^{EST} hasta las diluciones 10^{-7} y 10^{-9} respectivamente, indicando un factor de amplificación de 4 y 6 log. La sensibilidad del ensayo se confirmó repitiendo este ensayo a partir de tres IBH diferentes, siendo uno de ellos el panel NIBSC "blue capped brain tissue vCJD codon 129M/M" (Ref NHB0/0003).

[0123] Esta prueba que combina la captura basada en el plasminógeno del prión en muestras de sangre humana y la amplificación PMCA se evaluó a continuación poniendo a prueba paneles suministrados por el NIBSC. Todas las muestras del panel 1 (muestras negativas) se pusieron a prueba como negativas (20/20) conduciendo a una especificidad del 100%.

[0124] Los resultados del análisis con enmascaramiento de las 80 muestras del panel 2 fueron analizados por el comité NIBSC y se obtuvo una sensibilidad de una dilución de 10^{-5} para los homogeneizados de cerebro vECJ añadidos al plasma (tabla 1). Las 32 muestras de control del panel 2 se pusieron a prueba todas como negativas y confirmaron la especificidad del 100% (total 52/52).

Tabla 1: Evaluación de la prueba de detección de PrP^{EST} sobre un panel humano con enmascaramiento (NIBSC)

Material biológico	Diluciones	Positivos
Plasma dopado de cerebro con vECJ	10 ⁻²	4/4
	10 ⁻³	4/4
	10 ⁻⁴	4/4
	10 ⁻⁵	3/8
	10 ⁻⁶	1/4
	10 ⁻⁷	0/4
	10 ⁻⁸	0/8
Plasma dopado de rata con vECJ	10 ⁻¹	4/4
	10 ⁻²	0/4
	10 ⁻³	0/8
	10 ⁻⁴	0/4
	10 ⁻⁵	0/4
Plasma dopado de cerebro de control	10 ⁻²	0/4
	10 ⁻³	0/4
	10 ⁻⁴	0/4
Plasma dopado de rata de control	10 ⁻¹	0/4
	10 ⁻²	0/4
Plasma de control	--	0/16
Total positivo		20/96

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento in vitro de detección de un conformero patógeno de la proteína priónica (PrP^{SC}) en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
 - a) poner en contacto nanoesferas recubiertas de plasminógeno con una muestra;
 - b) separar dichas nanoesferas recubiertas de plasminógeno que portan la PrP^{SC} eventualmente presente, de la muestra;
 - c1) poner en contacto dichas nanoesferas recubiertas de plasminógeno que portan la PrP^{SC} eventualmente presente, obtenidas en la etapa b) con una preparación que comprende conformero no patógeno de la proteína priónica (PrP^C);
 - c2) desagregar los agregados formados eventualmente durante la etapa c1);
 - d) detectar la presencia de PrP^{SC} en la preparación, siendo la presencia de PrP^{SC} en la preparación indicativa de la presencia de PrP^{SC} en la muestra;
2. Procedimiento in vitro según la reivindicación 1, en el que la etapa d) es precedida por una etapa d1) de destrucción o eliminación de la proteína PrP^C presente en la preparación al final de la etapa c2).
3. Procedimiento in vitro según la reivindicación 1 ó 2, en el que las nanoesferas son nanoesferas paramagnéticas recubiertas de plasminógeno a razón de 10 a 30 µg de plasminógeno/mg de nanoesferas.
4. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las nanoesferas recubiertas de plasminógeno se ponen en contacto con la muestra en la etapa a) a una proporción de: 2,5 a 90 ml de suspensión de nanoesferas al 1% (peso/volumen) para de 50 a 500 ml de muestra.
5. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa a) se realiza con agitación y la desagregación de la etapa c2) se realiza mediante sonicación.
6. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas que consisten en:
 - a) poner en contacto nanoesferas paramagnéticas recubiertas de plasminógeno con una muestra, a razón de 10 a 30 µg de plasminógeno/mg de nanoesferas paramagnéticas;
 - b) separar dichas nanoesferas paramagnéticas recubiertas de plasminógeno que portan la PrP^{SC} eventualmente presente, de la muestra;
 - c1) poner en contacto, durante de 20 minutos a 2 horas, dichas nanoesferas paramagnéticas recubiertas de plasminógeno que portan la PrP^{SC} eventualmente presente, obtenidas en la etapa b), con una preparación que comprende conformero no patógeno de la proteína priónica (PrP^C);
 - c2) desagregar por sonicación los agregados eventualmente formados durante la etapa c1) durante de 10 segundos a 1 minuto;
 - d) detectar la presencia de PrP^{SC} en la preparación, siendo la presencia de PrP^{SC} en la preparación indicativa de la presencia de PrP^{SC} en la muestra;
7. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
 - un primer ciclo de amplificación en el que la etapa c1) se implementa durante de 60 a 120 minutos y la etapa c2) se implementa mediante sonicación durante de 10 segundos a 1 minuto, y a continuación
 - uno o varios ciclos de amplificación en los que la etapa c1) se implementa durante de 30 a 60 minutos.
8. Procedimiento in vitro según la reivindicación 7, que comprende:
 - un primer ciclo de amplificación durante el cual la etapa c1) se implementa durante de 80 a 100 minutos, y la etapa c2) se implementa mediante sonicación durante de 20 a 40 segundos, y a continuación
 - de 49 a 99 ciclos de amplificación durante los cuales la etapa c1) se implementa durante de 30 a 60 minutos, y la etapa c2) se implementa mediante sonicación durante de 20 a 40 segundos.
9. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha muestra es

una muestra biológica de un sujeto y la detección de la presencia de PrP^{SC} en la etapa d) es indicativa de una enfermedad, encefalopatía espongiforme transmisible, en el sujeto.

10. Procedimiento in vitro según la reivindicación 9, en el que la encefalopatía espongiforme transmisible es la enfermedad de Creutzfeld Jacob o su variante.

11. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha muestra es un fluido o sólido alimentario y la detección de la presencia de PrP^{SC} en la etapa d) es indicativa de un fluido o sólido alimentario contaminado por el confórmero patógeno PrP^{SC}.

12. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha muestra es, o procede de, una extracción de sangre, de plasma o de un órgano y la detección de la presencia de PrP^{SC} en la etapa d) es indicativa de una extracción de sangre o plasma inapropiada para transfusión, o de un órgano inapropiado para trasplante.

13. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la etapa d) comprende la cuantificación de dicho confórmero patógeno.

14. Utilización de un kit que comprende:

- nanoesferas paramagnéticas;
- plasminógeno;
- una cantidad conocida de confórmero no patógeno de la proteína priónica PrP^C,
para la implementación de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Utilización de un kit según la reivindicación 14, que comprende además al menos otro ligando de un confórmero patógeno de la proteína priónica PrP^{SC}.