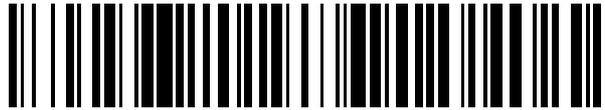


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 411**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2011 E 11722126 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2567237**

54 Título: **Ensayo de exploración de confirmación de la vECJ**

30 Prioridad:

**04.05.2010 GB 201007440**

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

**18.11.2015**

73 Titular/es:

**COMMON SERVICES AGENCY (100.0%)  
Gyle Square 1 South Gyle Crescent  
Edinburgh EH12 9EB, GB**

72 Inventor/es:

**JONES, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 551 411 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

Ensayo de exploración de confirmación de la vECJ

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la detección de proteínas priónicas, especialmente proteínas priónicas anormales (PrP<sup>Sc</sup>), en muestras de sangre, tales como plasma. La presente invención también se refiere a kits para usar en tales procedimientos.

**Antecedentes de la invención**

10 El agente infeccioso responsable de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) puede transmitirse de persona a persona (transmisión secundaria de la enfermedad) por transfusión de sangre [Turner y Ludlam (2009) Br. J. Haematol. 144: 14-23] y posiblemente por productos del plasma [Peden, McCardle, y col. (2010) Haemophilia 16: 296-304]. Además, los individuos afectados son infecciosos durante una fase de la enfermedad asintomática pre-clínica prolongada. Esto ha planteado preocupaciones de que un grupo de individuos asintomáticos posiblemente infecciosos podría existir en una población donante de sangre dando lugar a casos adicionales de transmisión secundaria de la enfermedad [Turner y Ludlam (2008) Br. J. Haematol. 144: 14-23]. La introducción de un ensayo de exploración ante mórtem rutinario capaz de detectar la infectividad en sangre, especialmente en plasma, podría ayudar a reducir el riesgo de la transmisión secundaria de la enfermedad a través de la transfusión de sangre, los productos sanguíneos, los trasplantes de órganos y la cirugía.

15 Las enfermedades priónicas, incluyendo la vECJ, se asocian estrechamente a la conversión de la proteína priónica de la célula hospedador anormal (PrP<sup>C</sup>) en una forma anormal asociada a la enfermedad (PrP<sup>Sc</sup>) [Prusiner (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13363-13383] y se asume que entre la infección inicial y la aparición de los síntomas esa PrP<sup>Sc</sup> se replica por la conversión de la PrP<sup>C</sup> del hospedador [Soto, Saborio y col. (2002) Trends Neurosci. 25: 390-394]. Por lo tanto los ensayos sustitutos de la infectividad de la vECJ se han centrado en la detección de la PrP<sup>Sc</sup>, que se considera por algunos que es el componente principal (si no el único) del agente infeccioso y es el único marcador de la enfermedad no ambiguo identificado hasta la fecha [Aguzzi, Heikenwandler y col. (2007) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8: 552-561; Grassi, Maillet y col. (2008) Vet. Res. 39: 33].

20 Un ensayo de exploración de sangre/plasma necesitaría ser altamente sensible, ya que puede requerirse la detección de cantidades atóxicas de PrP<sup>Sc</sup> por mililitro de plasma [Peden, Head y col. (2008) Exp. Opin. Med. Diagn. 2:207-219]. Este reto formidable se empeora adicionalmente por el hecho de que el plasma contiene cantidades de nanogramos por mililitro de PrP<sup>C</sup> [MacGregor, Hope y col. (1999) Vox Sang. 77: 88-96]. Un ensayo de exploración necesitaría por lo tanto ser capaz de detectar específicamente cantidades minúsculas de PrP<sup>Sc</sup> entre una masa de PrP<sup>C</sup> o podría dar lugar a más resultados falso positivo que la detección de casos verdaderos, que no solamente tendría un impacto serio en el suministro de sangre, sino que también plantean problemas éticos mayores [Turner y Ludlam (2008) Br. J. Haematol. 144: 14-23]. Por lo tanto, idealmente se requerirán dos tipos de ensayo, el primero sería un ensayo rápido de alto rendimiento capaz de explorar todas las donaciones sanguíneas y el segundo sería un ensayo de confirmación para asegurar que cualquier resultado positivo del ensayo de exploración inicial son realmente verdaderos positivos.

30 Aunque un número de posibles ensayos de exploración se están sometiendo actualmente a evaluación, hasta la fecha todavía ha de lograrse la sensibilidad y la especificidad necesarias [Turner y Ludlam (2008) Br. J. Haematol. 144: 14-23; Coste, Prowse y col. (2009) Vox Sang. 96:284-291]. Necesitan desarrollarse ensayos más sensibles o bien procedimientos para amplificar cualquier PrP<sup>Sc</sup> hasta niveles fácilmente detectables.

35 Grathwohl y col (J. of Virological Methods., 1997, 64, nº 2,1 páginas [205-216] desvela un procedimiento para recuperar PrP<sup>Sc</sup> de bazo que implica la salificación de la PrP<sup>Sc</sup> con NaCl (12 % p/v) y la posterior detección inmunológica usando ELISA.

40 Cai y col. (Biochimica et Biophysica acta. Protein structure and molecular enzymology (2002) Vol. 1597, nº 1, p28-35) describe procedimientos y medios para la precipitación y la recuperación de PrP<sup>Sc</sup> de la sangre que implican la precipitación usando sistemas de NaCl/EtOH.

Polymendiou y col (BMC Infectious diseases, Biomed Central Vol.2, nº 1 (2002) p23 proporciona un protocolo de precipitación con NaCl (usando una concentración final de NaCl del 10 % (p/v)) para la recuperación de PrP<sup>Sc</sup> de muestras de tejido cerebral y la detección de la PrP<sup>Sc</sup> recuperada.

50 Jones y col (Trasfusion (2009) 49 nº 1, p376-384) desvela procedimientos y medios para recuperar y detectar PrP<sup>Sc</sup> de plaquetas humanas, en los que la detección implica la Amplificación Cíclica de Mal plegamiento de Proteínas (ACMP) y el Inmunoensayo Dependiente de Confirmación (IDC).

**Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el desarrollo de un procedimiento que permita la amplificación eficiente y la

posterior detección de PrP<sup>Sc</sup> a partir de una muestra de sangre humana, tal como una muestra de plasma.

Un procedimiento para recuperar y detectar PrP<sup>Sc</sup> a partir de una muestra de sangre, tal como una muestra de plasma, comprendiendo el procedimiento: añadir cloruro sódico (NaCl) a dicha muestra, en el que la concentración final de NaCl está entre un 5 - 20 % p/v, en una cantidad suficiente para facilitar la precipitación de la PrP<sup>Sc</sup> desde la muestra el que la cantidad de NaCl no es suficiente para precipitar otros factores que pueden interferir con una posterior reacción de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> y centrifugar la muestra para recuperar dicha PrP<sup>Sc</sup> de dicha muestra y llevar a cabo una amplificación cíclica de mal plegamiento de proteínas (ACMP) en dicha PrP<sup>Sc</sup> recuperada.

Se recupera de la muestra de sangre lo más deseablemente, tal como al menos un 74 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % o sustancialmente todo de dicha PrP<sup>Sc</sup>.

La cantidad de NaCl a añadirse debería ser suficiente para provocar que dicha PrP<sup>Sc</sup> precipite fuera de la solución. La concentración final de NaCl está en la región del 5 - 20 %, preferentemente del 7,5 - 12,5 % p/v e idealmente del 10 % p/v, que no solamente facilita la recuperación de cualquier PrP<sup>Sc</sup> de una muestra de sangre, tal como plasma, sino que también asegura que cualquier factor que interfiera con la posterior reacción de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> permanece en solución.

Típicamente el precipitado, que forma un sedimento después de la centrifugación, se lava (como se conoce convencionalmente en la técnica) una o más veces, usando una "solución de lavado" adecuada. Una solución de lavado adecuada puede comprender una solución tamponada, tal como PBS, Tris-HCl que contiene un detergente tal como Sarkosyl. Lavar comprende generalmente resuspender el sedimento en una solución de lavado adecuada y re-centrifugar para sedimentar el material que precipita, incluyendo cualquier PrP<sup>Sc</sup> una vez más.

Siguiendo a la precipitación con NaCl inicial y las posteriores etapas de lavado el sedimento resultante se resuspende en un sustrato adecuado para la amplificación *in vitro* de PrP<sup>Sc</sup> por Amplificación Cíclica de Mal plegamiento de Proteínas.

La amplificación cíclica de mal plegamiento de proteínas (ACMP), que se basa en la suposición de que la propagación priónica sigue un mecanismo de agregación en semillas, es un procedimiento de amplificación tal. En la ACMP las muestras de reacción que contienen cantidades minúsculas de PrP<sup>Sc</sup> se siembran (diluyen) en un sustrato adecuado, que contiene PrP<sup>C</sup> en exceso y otros cofactores de conversión necesarios y se incuban en un procedimiento cíclico que consiste en etapas alternantes de incubación y sometimiento a ultrasonidos [Saborio, Permanne y col (2001) Nature 411: 810-813]. Se asume que durante la fase de incubación, la PrP<sup>Sc</sup> se agrega, se recluta y se convierten las moléculas de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> dando como resultado un crecimiento agregado, los ultrasonidos después rompen los agregados en subunidades más pequeñas cada una de las que a su vez actúan como semillas para reclutar y convertir PrP<sup>C</sup> adicional. Se ha demostrado que el grado de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> logrado depende del número de ciclos de ACMP llevados a cabo [Saborio, Permanne y col (2001) Nature 411: 810-813] y solamente se limita por la disponibilidad/estabilidad de la PrP<sup>C</sup> y/o de los otros cofactores de conversión presentes en el sustrato [Castilla, Saa y col (2005) Nat. Med. 11: 982-985].

Para superar esta limitación se ha desarrollado un procedimiento denominado ACMP en serie (ACMPs) [Bieschke, Weber y col (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101: 12207-12211; Castilla, Saa y col (2005) Nat. Med. 11: 982-985] en el que siguiendo la primera ronda de ACMP se siembra una alícuota del producto en sustrato fresco y se repite la ACMP, una alícuota del producto de esta segunda ronda de ACMP se diluye adicionalmente en sustrato fresco y de nuevo se somete a ACMP y así sucesivamente permitiendo la amplificación indefinida de PrP<sup>Sc</sup>. En estudios en animales, se ha usado la ACMPs para amplificar exitosamente la PrP<sup>Sc</sup> en niveles fácilmente detectables a partir de fracciones de capa leucocitaria, leucocitos, plasma y sangre completa durante la fase clínica de la enfermedad [Castilla, Saa y col (2005) Nat. Med. 11: 982-985; Murayama, Yoshioka y col (2007) J. Gen. Virol. 88: 2890-2898; Thorne y Terry (2008) J. Gen. Virol. 89: 3177-3184; Tattum, Jones y col (2010) Transfusion] y de fracciones de capa leucocitaria durante la fase pre-clínica de la enfermedad [Saa, Castilla y col (2006) Science 313: 92-94].

Siguiendo la ACMP o la ACMPs, los productos de reacción resultantes necesitan explorarse usando procedimientos adecuados para detectar PrP<sup>Sc</sup>. Los procedimientos para detectar PrP<sup>Sc</sup> se conocen en la técnica y muchos emplean típicamente digestión limitada con proteinasa K (PK) para distinguir entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup>. Tal tratamiento da como resultado la digestión completa de PrP<sup>C</sup> mientras que retiene el núcleo resistente a la proteinasa PrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>res</sup>) que puede detectarse por procedimientos adecuados tales como transferencia Western e inmunoensayo [Grassi, Maillet y col, (2008) Vet. Res. 39: 33]. Sin embargo, hay ahora una evidencia creciente que sugiere que las formas sensibles a la proteinasa de la PrP<sup>Sc</sup> posiblemente infecciosas existen [Yakoleva, Janiak y col (2004) Transfusion 44: 1700-1705; Safar, Geschwind y col (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102: 3501-3506; Pastrana, Sajani y col (2006) Biochemistry 45: 15710-15717; Cronier, Gros y col (2008) Biochem. J. 416: 297-305]. Dado que los presentes inventores conocen la naturaleza (resistencia a la proteinasa) de cualquier PrP<sup>Sc</sup> que pueda encontrarse y amplificarse a partir de sangre/plasma, se favorecen los ensayos capaces de distinguir entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> sin la necesidad de la digestión con proteinasa [Wadsworth, Joiner y col (2001) Lancet 358: 191-180]. Un ensayo tal es el Inmunoensayo Dependiente de Conformación (IDC) [Safar, Wille y col (1998) Nat. Med. 4: 1157-1165; Bellon, Seyfert-Brandt y col (2003) J. Gen. Virol. 84: 1921-1925; Safar, Geschwind y col (2005) Proc. Natl. Acad. Sci.

EE.UU. 102: 3501-3506]. Esta técnica se basa en el uso de un anticuerpo que se une a un epítipo que se expone en la PrP<sup>C</sup> nativa pero se entierra en la PrP<sup>Sc</sup> nativa, solamente volviéndose expuesta tras la desnaturalización. De esta manera comparando los resultados obtenidos para una muestra ensayada tanto en sus estados nativo (N) como desnaturalizado (D) es posible determinar la relación D/N IDC de la muestra y un valor de la relación D/N IDC por encima de un valor de corte definido (típicamente la relación D/N media obtenida para controles negativos conocidos más tres desviaciones estándar) es indicativo para la presencia de PrP<sup>Sc</sup> en esa muestra.

Una limitación principal a la aplicación de la ACMP en enfermedades priónicas humanas era la necesidad informada de usar un sustrato preparado a partir de tejido cerebral normal de la misma especie como la diana a amplificarse. Sin embargo, se ha demostrado que las plaquetas humanas eran tan eficientes como el tejido cerebral humano cuando se usan como una fuente de sustrato para la amplificación de PrP<sup>Sc</sup> de vECJ a partir de tejido cerebral humano [Jones, Peden y col (2009) J. Pathol. 213: 21-26; Jones, Peden y col (2009) Transfusion 49: 376-384]. Las plaquetas humanas podrían proporcionar por lo tanto una fuente de sustrato fácilmente disponible, alternativa y renovable para usar en reacciones de ACMP humanas. Sin embargo, se observó que el grado de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> logrado dependía del genotipo del codón 129 del gen de la proteína priónica (*PRNP*-129) tanto de la semilla como del sustrato [Jones, Peden y col (2009) Transfusion 49: 376-384]. El gen de la proteína priónica humana (*PRNP*) existe en dos formas alélicas principales que codifican metionina (M) o bien valina (V) en el codón 29. En consecuencia, los individuos pueden ser homocigotos para metionina (*PRNP*-129MM), heterocigotos para metionina/valina (*PRNP*-129MV) u homocigotos para valina (*PRNP*-129VV). En experimentos de ACMP usando sustratos plaquetarios del genotipo del codón 129 *PRNP* conocido [Jones, Peden y col (2008) Neuroreport 19: 1783-1786], la PrP<sup>Sc</sup> de vECJ (a partir de un individuo *PRNP*-129 MM) solamente se amplificó con eficacia en un sustrato plaquetario *PRNP*-129MM, mientras que, la PrP<sup>Sc</sup> asociada al tipo 2 MV y ECJ esporádica W (ECJe MV2 y ECJe W2, usados en ausencia de PrP<sup>Sc</sup> de vECJ a partir de individuos *PRNP*-129MV y W) solamente se amplificó con eficacia en un sustrato *PRNP*-129VV. Estas observaciones mostraron claramente que la compatibilidad semilla/sustrato *PRNP*-129 tenía una influencia importante en la eficacia de la amplificación.

Hasta la fecha todos los casos clínicamente confirmados de vECJ se han dado en individuos *PRNP*-129MM [Peden, Head y col (2008) Expert Opin. Med Diagn. 2: 207-219]. Sin embargo, también se ha identificado la evidencia de una posible infección de vECJ asintomática, a base de la detección de PrP<sup>Sc</sup>, en dos individuos *PRNP*-129MV [Peden, Head y col (2004) Lancet 364: 525-529; Peden, McCardle y col (2010) Haemophilia 16: 296-304] y dos *PRNP*-129W [Br. Med. J. 332: 1186-1188]. Además, los estudios de transmisión que usan ratones transgénicos que expresan PrP humana de los tres posibles genotipos *PRNP*-129 han demostrado que mientras que la presencia de metionina en el codón 129 se asocia a la transmisión de la enfermedad eficaz y corta incubación de la enfermedad, los tres genotipos son susceptibles a la infección [Bishop, Hart y col (2006) Lancet Neurol. 5: 393-398]. Evidentemente todos los individuos, a pesar del genotipo *PRNP*-129, están en riesgo.

Para evitar los problemas de incompatibilidad de *PRNP*-129 en un ensayo de exploración a base de ACMP todas las muestras ensayadas necesitarían ser del genotipo *PRNP*-129 para asegurar la compatibilidad semilla/sustrato o bien de forma alternativa la ACMP necesitaría llevarse a cabo tanto en sustrato *PRNP*-129MM como *PRNP*-129 W. Se aborda proporcionar compatibilidad de genotipo *PRNP*-129 semilla/sustrato, siguiendo cuatro rondas de ACMPs en sustrato plaquetario, sembrado directamente con diluciones seriadas diez veces de un homogenato de cerebro de vECJ al 10 % (p/v), se ha informado un aumento de 4 log (10.000 veces) en la sensibilidad de detección de la PrP<sup>Sc</sup>, como se determina por inmunoensayo dependiente de conformación (IDC) [Jones, Peden y col (2009) Transfusion 49: 376-384]. De esta manera, en una realización preferida puede usarse ACMPs en combinación con IDC para la amplificación y la posterior detección de PrP<sup>Sc</sup> recuperada de muestras de sangre/plasma por precipitación con NaCl. Sin embargo, debido al tiempo que toma ACMPs/IDC puede ser más adecuada para usar como un ensayo confirmatorio en lugar de un ensayo de exploración de alto rendimiento rápido inicial.

Preferentemente la detección de PrP<sup>Sc</sup> amplificada se lleva a cabo por inmunoensayo dependiente de confirmación (IDC).

### **Descripción detallada**

La presente invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplo y con referencia a las figuras que muestran:

La Figura 1 muestra la amplificación de PrP<sup>Sc</sup> de vECJ directamente a partir de plasma con adiciones El plasma (de cada genotipo *PRNP*-129, plasma MM, plasma MV, plasma W) y tampón de conversión de ACMP (Sin plasma) con adiciones de homogenato de cerebro con vECJ se sembraron directamente en un sustrato plaquetario. Las cuatro mezclas de reacción sembradas y un sustrato control no sembrado (Control) se dividieron en dos lotes iguales, con un lote almacenado a -80 °C (-ACMP) y el otro lote sometido a una ronda de ACMP (+ACMP). Las muestras +/- de ACMP se exploraron por IDC con los resultados obtenidos expresados como el factor de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> logrado en cada sustrato sembrado. El factor de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> se calculó como la relación D/N IDC obtenida para la muestra +ACMP dividida por la relación D/N IDC obtenida para la muestra -ACMP correspondiente.

La Figura 2 muestra los resultados de diferentes procedimientos para precipitar/enriquecer PrP<sup>Sc</sup> a partir de plasma con adiciones

Las alícuotas de plasma con adiciones de diluciones seriadas 10 veces de homogenato de cerebro con vECJ se precipitaron con NaPTA, se precipitaron con NaCl o bien se sometieron a centrifugación sola. El sedimento resultante se resuspendió, se sometió a digestión con proteinasa K y se probó para PrP<sup>Res</sup> por transferencia Western usando mAb 3F4.

5 La Figura 3 muestra los efectos de la amplificación de PrP<sup>Sc</sup> a partir del sedimento obtenido siguiendo a la precipitación del plasma con adiciones

El plasma con adiciones de homogenato de vECJ se precipitó con NaCl y el sedimento resultante se resuspendió en el mismo volumen de tampón de conversión de ACMP como el de la muestra de plasma con adiciones original. Las alícuotas del plasma con adiciones original (barras blancas) y el sedimento resuspendido (barras grises) se sembraron en sustrato de plaquetas, las muestras sembradas se dividen en dos lotes iguales con un lote almacenado a -80 °C (-ACMP) y el otro lote sometido a una ronda de ACMP (+ACMP). Las muestras +/- de ACMP se exploraron por IDC con los resultados expresados como la relación D/N IDC obtenida para cada muestra.

10 La Figura 4 muestra el grado de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> que puede lograrse  
 15 Dos lotes de plasma con adiciones de diluciones seriadas 10 veces de homogenato de cerebro con vECJ se precipitaron con NaCl y el sedimento resultante se resuspendió en sustrato plaquetario. Un conjunto de las diluciones seriadas se almacenó a -80 °C sin ACMP (Cuadrados abiertos) y el otro conjunto se sometió a cuatro rondas de ACMPs. Siguiendo a la ACMPs, los productos de la 4ª ronda de ACMP (Cuadrados cerrados) se recogieron y se exploraron a lo largo de las muestras sin ACMP por IDC con los resultados expresados como las relaciones D/N IDC obtenidas para cada dilución seriada. La línea discontinua representa el valor de corte de IDC calculado como la relación D/N IDC media obtenida para un plasma control sin adiciones más tres desviaciones estándar. Cualquier relación D/N IDC que caiga por encima de este corte se consideraría como positivo para PrP<sup>Sc</sup>.

20 La Figura 5 muestra la sensibilidad y la especificidad: Amplificación de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de plasma con adiciones de homogenatos de cerebro y de bazo vECJ/no ECJ  
 25 Las muestras de plasma con adiciones de diluciones seriadas 10 veces de homogenatos de cerebro con vECJ (Cuadrados cerrados, línea sólida); de cerebro sin ECJ (Cuadrados cerrados, línea discontinua), de bazo con vECJ (Cuadrados abiertos, línea sólida); y de bazo sin ECJ (Cuadrados abiertos, línea discontinua) se precipitaron con NaCl. El sedimento resultante se sometió a cuatro rondas de ACMPs en sustrato plaquetario y se exploraron los productos de la 4ª ronda de ACMPs por IDC con los resultados obtenidos expresados como la relación D/N IDC obtenida para cada dilución seriada. La línea discontinua representa el valor de corte de IDC calculado como la relación D/N IDC media obtenida para un plasma control sin adiciones más tres desviaciones estándar. Cualquier relación D/N IDC que caiga por encima de este corte se consideraría como positivo para PrP<sup>Sc</sup>.

30 La Figura 6 muestra los resultados de explorar muestras de plasma normal  
 35 Lotes duplicados de plasma normal, cuatro lotes de plasma control -ve y cuatro lotes de plasma control +ve (plasma con adiciones de una dilución 10<sup>-6</sup> de homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v)) se precipitaron con NaCl. El sedimento resultante se resuspendió en sustrato plaquetario, se sometió a cuatro rondas de ACMPs y los productos de la 4ª ronda de ACMP se exploraron por IDC con los resultados obtenidos expresados como las relaciones D/N IDC obtenidas. Las líneas discontinuas representan el valor de corte IDC calculado como la relación D/N IDC media obtenida para las muestras de plasma control -ve más tres desviaciones estándar. Cualquier relación D/N IDC que caiga por encima de este corte se consideraría como positivo para PrP<sup>Sc</sup>.

40

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 45 Preparación del sustrato plaquetario

Los lisados de plaquetas para usar como sustratos de ACMP se prepararon como se describió previamente [Jones, Peden y col. (2009) Transfusion 49: 376-384]. Brevemente, las fracciones de capa leucocitaria, obtenidas a partir de donantes individuales, se transfirieron a unos tubos de centrifuga de 50 ml. Una alícuota (200 µl) de cada capa leucocitaria se retuvo para genotipar PRNP-129 como se describió previamente [Nurmi, Bishop y col (2003) Acta Neurol. Scand. 108: 374-378] y el resto se centrifugó (1050 rpm, 20 min). Para cada capa leucocitaria la capa de plasma rica en plaquetas resultantes se recogió cuidadosamente en un tubo de centrifuga de 15 ml pre-pesado y se centrifugó (4000 rpm, 30 min). El plasma se decantó y los sedimentos de plaquetas se resuspendieron en 2 ml de tampón de lavado de plaquetas (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Sacarosa al 0,09 % (p/v), pH 7,4). Siguiendo a la centrifugación (4000 rpm, 30 min) el sobrenadante se descartó, el peso húmedo de cada sedimento de plaquetas se determinó y se almacenaron los sedimentos a -40 °C. Para la preparación de sustrato de ACMP los sedimentos de plaquetas se lisaron en 9 volúmenes de tampón de conversión ACMP (PBS que contiene NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1,0 %, EDTA 4 mM e inhibidores de proteasa Roche Complete EDTA-free®) para preparar lisados al 10 % (p/v). Los lisados plaquetarios del mismo genotipo PRNP-129 se agruparon, se alicuotaron y se almacenaron a -80 °C hasta que se usaron en reacciones de ACMP.

60

**Ejemplo 2****El plasma humano contiene factores, que inhiben la amplificación directa de la PrP<sup>Sc</sup>**

Al tampón de conversión de ACMP (véase el Ejemplo 2) y al plasma de cada genotipo PRNP-129 se les añadió un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) en una dilución final de  $10^{-3}$ . Una alícuota (40  $\mu$ l) de cada muestra con adiciones se sembró en sustrato plaquetario (360  $\mu$ l) PRNP-129MM. Los lotes duplicados (100  $\mu$ l) de cada mezcla de reacción de ACMP se almacenaron inmediatamente a -80 °C (-ACMP). Los lotes duplicados (100  $\mu$ l) de cada mezcla de reacción de ACMP se transfirieron a pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos de pared fina, los pocillos se sellaron, la placa se transfirió al cuerno de la microplaca del aparato de ultrasonidos [Misonix 3000] que contenía agua destilada (350 ml), establecido en una incubadora a 37 °C y se incubó durante 30 minutos. Se llevaron a cabo después 48 ciclos de ACMP consistiendo cada ciclo en una rotura de 40 segundos sometido a ultrasonidos establecido en un ajuste de amplitud del 80 % (~300 W) seguido de incubación a 37 °C durante 29 minutos y 20 segundos. Siguiendo la ACMP los productos de ACMP (+ACMP) se recogieron. Las muestras +/- ACMP se exploraron después por inmunoensayo dependiente de conformación (IDC), modificado a partir del procedimiento previamente descrito por Bellon, Seyfert-Brandt y col (2003) J. Gen. Virol. 84: 1921-1925, para determinar las cantidades relativas de PrP<sup>Sc</sup> en cada muestra. Brevemente, cada muestra de ensayo (100  $\mu$ l) se diluyó con PBS/Sarkosyl hasta un volumen final de 1 ml que contenía Sarkosyl al 2 % (p/v), se añadieron Benzonase® (concentración final de 50 unidades/ml) y MgCl<sub>2</sub> (concentración final de 1 mM) y las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C. Siguiendo la adición de 85  $\mu$ l de solución de precipitación de PrP<sup>Sc</sup> [ácido fosfotúngstico sódico (NaPTA)] al 4 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 34 mM, pH 7,4 y azul amilopectina (Sigma) al 0,06 % (p/v)] las muestras se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Después de la centrifugación (30 min, 37 °C, 20800 g) los precipitados de NaPTA resultantes se resuspendieron en 50  $\mu$ l de Sarkosyl al 0,2 % (p/v) en H<sub>2</sub>O que contenía inhibidores de proteasa Roche Complete EDTA-free®. Los precipitados resuspendidos se dividieron en dos lotes iguales con un lote desnaturalizado en HCl guanidina 4M a 81 °C durante 6 min (muestra desnaturalizada, D) y el otro lote se dejó sin tratar (muestra nativa, N). Tanto las muestras D como N se ajustaron a una concentración final de guanidina de 0,308 M en volúmenes finales de 650  $\mu$ l y se cargaron en pocillos por triplicado (200  $\mu$ l/pocillo) de una placa de poliestireno negro de 96 pocillos recubierta con 0,5  $\mu$ g/pocillo de anticuerpo MAR-1 anti-PrP (CSL Behring, Marburg, Alemania). Siguiendo la incubación (2 h a temperatura ambiente con agitación), los pocillos se lavaron cuatro veces con tampón de lavado DELFIA® (250  $\mu$ l/pocillo) y se secaron por transferencia. Se añadió anticuerpo 3F4 anti-PrP conjugado con europio (50ng/ml en tampón de ensayo DELFIA®, 200  $\mu$ l/pocillo) a todos los pocillos y siguiendo a la incubación (2 h a temperatura ambiente con agitación) los pocillos se lavaron seis veces con tampón de lavado DELFIA® (250  $\mu$ l/pocillo) y se secó por transferencia. Se añadió solución de mejora DELFIA® (200  $\mu$ g/pocillo) a todos los pocillos y siguiendo a la incubación (5 min a temperatura ambiente con incubación) los recuentos de fluorescencia resuelta en tiempo para las muestras desnaturalizadas (D) y nativas (N) se midieron usando un fluorómetro Victor<sup>2</sup>. Los recuentos obtenidos para las muestras D se dividieron por los recuentos obtenidos para las muestras N correspondientes para obtener el valor D/N para cada muestra ensayada. Para normalizar los resultados obtenidos para cada semilla usada los resultados obtenidos se expresaron como el factor de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> logrado dividiendo la relación D/N +ACMP por la correspondiente relación D/N -ACMP. Basándose en los resultados obtenidos (Figura 1) era evidente que mientras que la amplificación eficaz de la PrP<sup>Sc</sup> de vECJ se había logrado en el sustrato sembrado con tampón de conversión ACMP con adición, se había logrado poca si alguna amplificación en el sustrato sembrado con las muestras de plasma con adición. Evidentemente el plasma, independientemente del genotipo PRNP-129, contenía un factor/factores que inhibían la amplificación de la PrP<sup>Sc</sup>. Si hubiera de aplicarse ACMPs/IDC en un ensayo de exploración de confirmación para detectar PrP<sup>Sc</sup> en el plasma entonces necesitaría emplearse una etapa de pre-tratamiento inicial para retirar estos factores inhibidores del plasma. Idealmente una etapa de pre-tratamiento tal también daría como resultado la precipitación/enriquecimiento de la PrP<sup>Sc</sup> desde del plasma.

**Ejemplo 3****Procedimientos para recuperar la PrP<sup>Sc</sup> del plasma con adiciones**

Al plasma se añadieron diluciones seriadas 10 veces (en el intervalo de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) de un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v). Se investigaron entonces tres procedimientos para precipitar PrP<sup>Sc</sup> a partir de estas muestras de plasma con adiciones: precipitación con ácido fosfotúngstico sódico (NaPTA), precipitación con cloruro sódico (NaCl) y centrifugación sola.

La precipitación con NaPTA se llevó a cabo usando un procedimiento adaptado a partir del previamente descrito por Bellon, Seyfert-Brandt y col (2003) J. Gen. Virol. 84: 1921-1925. Brevemente, cada dilución seriada (100  $\mu$ l) se diluyó con PBS/Sarkosyl hasta un volumen final de 1 ml que contiene Sarkosyl al 2 % (p/v), se añadieron Benzonase® (concentración final de 50 unidades/ml) y MgCl<sub>2</sub> (concentración final 1 mM) y las muestras se incubaron durante 30 min a 37 °C. Siguiendo la adición de 85  $\mu$ l de solución de precipitación de PrP<sup>Sc</sup> [ácido fosfotúngstico sódico (NaPTA) al 4 % (p/v), MgCl<sub>2</sub> 34 mM y azul almidón al 0,06 % (p/v)] las muestras se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Después de la centrifugación (30 min, 37 °C, 20800 g) los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y los sedimentos (visibles como puntos azules debido al azul almidón) se almacenaron a -80 °C hasta que se exploraron por transferencia Western siguiendo a la digestión limitada con proteinasa K usando mAb 3F4 para detectar PrP<sup>res</sup>

como se ha descrito previamente [22].

Para las precipitaciones con NaCl se llevaron a cabo usando un procedimiento adaptado a partir del procedimiento previamente descrito por Polymenidou, Verghese-Nikalakaki y col (2002) BMC Infectious Dis. 2: 23. Brevemente, cada dilución seriada (100  $\mu$ l) se diluyó en PBS hasta un volumen final de 400  $\mu$ l. Se añadieron NaCl al 20 % (p/v), sarkosyl al 2 % (p/v) en PBS (400  $\mu$ l) a cada muestra, las muestras se incubaron a 4 °C con agitación (500 rpm) en un Termomezclador durante 30 min y se añadió a cada muestra azul almidón al 1 % (3  $\mu$ l). Siguiendo a la centrifugación (20800 g, 30 min, 4 °C) los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y los sedimentos (visibles como puntos azules debido al azul almidón) se resuspendieron en 500  $\mu$ l de tampón de lavado (Tris-HCl 25 mM, Sarkosyl al 0,05 %, pH 8,8). Siguiendo a la centrifugación (20800 g, 30 min, 4 °C) los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y los sedimentos se almacenaron a -80 °C hasta que se exploraron por transferencia Western siguiendo a la digestión limitada con proteinasa K usando mAb 3F4 para detectar PrP<sup>res</sup> como se ha descrito previamente [22].

Para la centrifugación sola, cada dilución seriada (100  $\mu$ l) se centrifugó simplemente (20800 g, 60 min, 4 °C), los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente y los sedimentos se almacenaron a -80 °C hasta que se exploraron por transferencia Western siguiendo a la digestión limitada con proteinasa K usando mAb 3F4 para detectar PrP<sup>res</sup> como se ha descrito previamente [Jones, Peden y col (2007) J. Pathol. 213: 21-26].

Basándose en los resultados de la transferencia Western obtenidos (Figura 2), tanto la precipitación con NaPTA como con NaCl dieron como resultado niveles similares de recuperación de PrP<sup>res</sup>, mientras que la centrifugación sola dio como resultado una recuperación de PrP<sup>res</sup> menor. Se decidió por lo tanto investigar si la precipitación con NaCl no solamente dio como resultado la precipitación/enriquecimiento de la PrP<sup>Sc</sup> o si también retiró los factores inhibidores de ACMP previamente mostrados que están presentes en el plasma (véase el Ejemplo 2).

#### Ejemplo 4

##### **El tratamiento con NaCl no solamente precipita la PrP<sup>Sc</sup> del plasma con adiciones sino que también permite su amplificación en posteriores reacciones ACMP**

Al plasma (200  $\mu$ l) se añadió un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) en una dilución final de  $10^{-3}$ . Una alícuota (20  $\mu$ l) de este plasma con adiciones se retuvo para las posteriores reacciones de ACMP y los restantes 180  $\mu$ l de plasma con adiciones se precipitaron con NaCl como se describe en el Ejemplo 3. El sedimento resultante se resuspendió en 180  $\mu$ l de tampón de conversión de ACMP. Se sembró sustrato plaquetario PRNP-129MM (180  $\mu$ l) con el plasma con adición original (20  $\mu$ l) y el sustrato resuspendido después de la precipitación con NaCl (20  $\mu$ l). Estas mezclas de reacción se separaron en lotes de 2 X 100  $\mu$ l, con un lote almacenado inmediatamente a -80 °C (-ACMP) y el otro lote sometido a 48 ciclos de ACMP (+ACMP) como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. Las muestras +/- ACMP se exploraron después por IDC como se ha descrito previamente en el ejemplo 1. Basándose en los resultados obtenidos (Figura 3) mientras que había evidencia de algo de amplificación de la PrP<sup>Sc</sup> en la reacción sembrada directamente con plasma con adición, se logró una amplificación mucho más eficiente de la PrP<sup>Sc</sup> en la reacción sembrada con el sedimento resuspendido obtenido siguiendo a la precipitación con NaCl. Evidentemente la precipitación con NaCl retiró los factores inhibidores de ACMP presentes en el plasma permitiendo la posterior amplificación de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de la fracción de sedimento resuspendida.

#### Ejemplo 5

##### **Un protocolo para la precipitación, la amplificación y la posterior detección de PrP<sup>Sc</sup> a partir del plasma con adiciones como una base para un ensayo de confirmación para la detección de la infectividad de vECJ en un plasma humano.**

Al plasma control se añadieron diluciones seriadas 10 veces de un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) en el intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ . Las alícuotas (2 X 180  $\mu$ l) de cada muestra de plasma con adición y cada muestra de plasma control sin adición se precipitaron con NaCl como se describe en el Ejemplo 3. El sedimento resultante se suspendió en sustrato plaquetario PRNP-129MM (100  $\mu$ l). Un conjunto de muestras se almacenó inmediatamente a -80 °C (-ACMP) y el otro conjunto se sometió a cuatro rondas de ACMP en serie (ACMPs). Brevemente, siguiendo la primera ronda de ACMP como se describe en el Ejemplo 1 unas alícuotas (10  $\mu$ l) de cada producto de la primera ronda de ACMP se diluyeron en sustrato plaquetario PRNP-129MM fresco (90  $\mu$ l) y se llevó a cabo una segunda ronda de ACMP. Unas alícuotas (10  $\mu$ l) de cada producto de la segunda ronda de ACMP se diluyeron en sustrato plaquetario PRNP-129MM fresco (90  $\mu$ l) y se llevó a cabo una tercera ronda de ACMP. Unas alícuotas (10  $\mu$ l) de cada producto de la tercera ronda de ACMP se diluyeron en sustrato plaquetario PRNP-129MM fresco (90  $\mu$ l) y se llevó a cabo una cuarta ronda de ACMP y se recogieron los productos de ACMP de la cuarta ronda (ACMPs+). Las muestras ACMPs +/- se exploraron por IDC como se describe en el Ejemplo 1. Se calculó un valor de corte de IDC, se obtuvo la relación D/N media para las muestras de plasma control sin adición más 3 desviaciones estándar y cualquier relación D/N IDC que cayó por encima de este corte se consideró como positiva para la PrP<sup>Sc</sup>. A partir de los resultados obtenidos (Figura 4) sin ACMP (-ACMP) la PrP<sup>Sc</sup> sólo podría detectarse en el plasma con la adición de la dilución  $10^{-3}$  del homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v), mientras que, siguiendo las cuatro rondas de

ACMPs (+ACMP) la PrP<sup>Sc</sup> podría detectarse ahora en el plasma con adición con la dilución  $10^{-7}$  del homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v), esta representó un aumento de 4 log (10.000 veces) en la sensibilidad de detección. Usando el protocolo indicado en este ejemplo (precipitación de NaCl, sedimento resultante sometido a cuatro rondas de ACMPs en sustrato plaquetario PRNP-129MM y posterior detección de PrP<sup>Sc</sup> en el producto de ACMP de la 4<sup>a</sup> ronda) fue posible detectar la PrP<sup>Sc</sup> en plasma con adición de una dilución  $10^{-7}$  del homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v).

### Ejemplo 6

#### Sensibilidad de detección de la PrP<sup>Sc</sup> lograda y su relación con la detección de la infectividad de vECJ

Aunque que el nivel de infectividad en el tejido cerebral con vECJ usado como la fuente de semillas de este estudio no se ha determinado, basándose en estudios previos [Bruce, McConell y col (2001) Lancet 358: 208-209], los niveles de infectividad en el cerebro pueden variar de  $10^5$  a  $10^7$  ID<sub>50</sub>/g (ID<sub>50</sub> = dosis infecciosa que provoca la enfermedad en el 50 % de los animales expuestos). Siguiendo cuatro rondas de ACMP en serie los presentes inventores fueron capaces de amplificar y detectar la PrP<sup>Sc</sup> a partir de una dilución  $10^{-7}$  de un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) con adición en 180  $\mu$ l de plasma que corresponde a 1,8 ng de cerebro con vECJ o una ID<sub>50</sub> de  $1,8 \times 10^{-4}$  a  $1,8 \times 10^{-2}$ . Los niveles de infectividad en el plasma, basándose en los resultados obtenidos a partir de modelos animales experimentales, están entre 1-10 ID<sub>50</sub>/ml en la fase preclínica y 100 ID<sub>50</sub>/ml en la clínica de la enfermedad [Peden, Head y col (2008) Exp. Opin. Med. Diagn. 2: 207-219; Jones, Oeden y col (2009) Transfusion 49: 376-384]. Asumiendo que estas cifras son válidas para los niveles de la infectividad de vECJ presente en el plasma humano durante la fase preclínica de la enfermedad, si se usan 180  $\mu$ l de plasma para sembrar la reacción de ACMP entonces la ID<sub>50</sub> presente estaría entre 0,18 y 1,8. Basándose en estas estimaciones (asumiendo que la detección de la PrP<sup>Sc</sup> se correlaciona con la infectividad y que la naturaleza del agente infeccioso encontrado tanto en el cerebro como en el plasma es la misma) entonces cuatro rondas de ACMP en serie permitirían la detección de la infectividad de vECJ en el plasma de los individuos con la enfermedad preclínica. Sin embargo, para reducir el riesgo de la transmisión de la enfermedad incluso más, sería deseable detectar al menos 1 ID/unidad de sangre completa que se iguala a aproximadamente 0,002 ID/ml o  $3,6 \times 10^{-4}$  ID/180  $\mu$ l. Cuatro rondas de ACMPs solamente lograrían aproximadamente la sensibilidad requerida para detectar 1 ID en una unidad de sangre completa.

### Ejemplo 7

#### Sensibilidad y especificidad logradas basándose en la amplificación de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de plasma con adiciones con homogenatos de cerebro y bazo vECJ/no-ECJ

Al plasma control se añadieron diluciones seriadas 10 veces de homogenatos de cerebro con vECJ y sin ECJ al 10 % p/v en el intervalo de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  y homogenatos de bazo con vECJ y sin ECJ al 10 % p/v en el intervalo de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Unas alícuotas (180  $\mu$ l) de cada muestra de plasma con adición y el plasma control sin adición se precipitaron con NaCl y el sedimento resultante se sometió a cuatro rondas de ACMPs en serie en sustrato plaquetario PRNP-129MM, como se describe en el Ejemplo 5. Los productos de la cuarta ronda de ACMP se recogieron y se exploraron por IDC, como se describe en el Ejemplo 2, usando la relación D/N media obtenida para las muestras de plasma sin adición para determinar el valor de corte de IDC. A partir de los resultados obtenidos (Figura 5) en las reacciones de ACMP sembradas con plasma con adición de homogenatos de cerebro y bazo con vECJ, se detectó la PrP<sup>Sc</sup> por debajo hasta al menos por debajo de la dilución  $10^{-7}$  del homogenato de cerebro al 10 % (p/v) y de la dilución  $10^{-5}$  del homogenato de bazo al 10 % (p/v). No se detectó evidencia de PrP<sup>Sc</sup> en las reacciones de ACMP sembradas con plasma con adición de homogenatos de cerebro y de bazo sin ECJ, sugiriendo que las cuatro rondas de ACMPs no dieron como resultado la producción espontánea/de novo de PrP<sup>Sc</sup>. Basándose en estos resultados parecería que el protocolo usado es tanto altamente sensible como específico para la amplificación y la posterior detección de PrP<sup>Sc</sup> a partir de plasma humano.

### Ejemplo 8

#### Detección de muestras de plasma normal: Una investigación adicional de la especificidad

Unos lotes duplicados (180  $\mu$ l) de muestras de plasma normal (n = 20), cuatro lotes de plasma control y cuatro lotes +ve de plasma control (plasma control con adición de una dilución  $10^{-6}$  de un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v)) se precipitaron con NaCl, como se describe en el Ejemplo 3, y el sedimento resultante se resuspendió en sustrato plaquetario PRNP-129MM (100  $\mu$ l) y se sometieron a cuatro rondas de ACMPs como se describe en el Ejemplo 5. Los productos de la cuarta ronda de ACMP se exploraron por IDC, como se describe previamente en el Ejemplo 2, usando las relaciones D/N IDC obtenidas el plasma control para determinar el valor de corte de IDC. Todos los productos de la reacción ACMP sembrados con las muestras de plasma normal tenían relaciones D/N IDC por debajo del corte calculado (Figura 6) y se clasificaron por lo tanto como negativos. Todos los productos de reacción ACMP sembrados con el plasma control +ve con adición tenían relaciones D/N IDC por encima del corte calculado. Para investigar adicionalmente la especificidad del ensayo se exploran actualmente unas 250 muestras de plasma normal adicionales por duplicado tanto en sustratos plaquetarios MM como W.

## Ejemplo 9

### Conclusiones

Como se ha informado previamente [Jones, Peden y col (2009) Transfusion 49: 376-384] ACMPs/IDC dio como resultado una amplificación eficaz y una detección posterior de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de homogenato de cerebro con vECJ sembrado directamente en sustrato plaquetario. Sin embargo, los intentos de amplificar la PrP<sup>Sc</sup> a partir del plasma con adición de homogenato de cerebro con vECJ y sembrado directamente en sustrato plaquetario fallaron (Ejemplo 2, Figura 1). Evidentemente el plasma, independientemente del genotipo *PRNP*-129, contenía un factor o factores que inhibían la amplificación de PrP<sup>Sc</sup> en posteriores reacciones de ACMP. Si ha de aplicarse ACMPs/IDC, tal como en un ensayo de exploración de confirmación para detectar la PrP<sup>Sc</sup> en plasma, entonces necesitaría emplearse una etapa de pre-tratamiento adicional para retirar los factores inhibidores. Idealmente una etapa de pre-tratamiento tal también daría como resultado el enriquecimiento/precipitación de la PrP<sup>Sc</sup> del plasma, permitiendo que se usen mayores volúmenes de partida de plasma aumentando posiblemente la sensibilidad del ensayo sin tener que recurrir a rondas adicionales de ACMP en serie. Se investigaron tres procedimientos posibles precipitación con NaPTA, precipitación con cloruro sódico (NaCl) y centrifugación sola (Ejemplo 3, Figura 2). Tanto la precipitación con NaPTA como con NaCl mostraron niveles similares de recuperación de PrP<sup>Sc</sup>, mientras que, la centrifugación sola dio como resultado una recuperación de PrP<sup>Sc</sup> menos eficaz. Basándose en la naturaleza inerte del procedimiento de precipitación con NaCl, este procedimiento de pre-tratamiento del plasma se tomó hacia la investigación adicional y se mostró que la precipitación con NaCl también retiró los factores inhibidores de ACMP presentes en el plasma permitiendo la amplificación posterior de la PrP<sup>Sc</sup> precipitada (Ejemplo 4, Figura 3). Se adoptó por lo tanto un protocolo de ACMPs/IDC modificado que incluía la etapa de pre-tratamiento del plasma por precipitación con NaCl (NaCl/ACMPs/IDC). Como se indica en el Ejemplo 5, las alícuotas duplicadas de plasma con adición de diluciones seriadas 10 veces de un homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) se precipitaron con NaCl, el sedimento resultante se suspendió directamente en sustrato plaquetario. Un conjunto de muestras se almacenó a -80 °C (-ACMP) y los otros conjuntos se sometieron a cuatro rondas de ACMPs (+ACMP). Las muestras +/- ACMP se exploraron después por IDC. Usando el protocolo NaCl/ACMPs/IDC se logró representar un aumento de 4 log (10.000 veces) en la sensibilidad de detección de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de plasma con adición de una dilución 10<sup>-7</sup> de homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) (Figura 4). Como se analiza en el Ejemplo 6, el protocolo NaCl/ACMPs/IDC parecería lograr la sensibilidad de detección necesaria para detectar la PrP<sup>Sc</sup> en plasma a partir de los individuos con vECJ pre-clínica. Los estudios adicionales en la sensibilidad y la especificidad (Ejemplo 7) del protocolo NaCl/ACMPs/IDC mostraron que la PrP<sup>Sc</sup> podía amplificarse exitosamente y detectarse posteriormente a partir de plasma con adición de al menos una dilución 10<sup>-7</sup> de homogenato de cerebro con vECJ al 10 % (p/v) y una dilución 10<sup>-5</sup> de homogenato de bazo con vECJ al 10 % (p/v) (Figura 5). No se observó evidencia de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> a partir de plasma con adición de homogenatos de cerebro y bazo sin ECJ (Ejemplo 7, Figura 5) ni a partir de 20 muestras de plasma normal (Ejemplo 8, Figura 6). Basándose en los resultados obtenidos hasta la fecha parecería que el protocolo que los presentes inventores han desarrollado (NaCl/ACMPs/IDC) puede lograr tanto la sensibilidad necesaria como la especificidad que se necesita para detectar la PrP<sup>Sc</sup> en plasma a partir de los individuos con vECJ pre-clínica. Este protocolo podría por lo tanto formar la base de un ensayo, tal como un ensayo de exploración de vECJ de confirmación para asegurar la seguridad futura del suministro de sangre reduciendo el riesgo de casos adicionales de transmisión secundaria de vECJ.

40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento de recuperación y detección de PrP<sup>Sc</sup> a partir de una muestra de sangre, comprendiendo el procedimiento: añadir cloruro sódico (NaCl) a dicha muestra, en el que la concentración final de NaCl está entre el 5 y el 20 % p/v, en una cantidad suficiente para facilitar la precipitación de la PrP<sup>Sc</sup> a partir de la muestra en el que la cantidad de NaCl no es suficiente para precipitar otros factores que pueden interferir en una reacción de amplificación de PrP<sup>Sc</sup> posterior y centrifugar la muestra de tal manera que se recupere dicha PrP<sup>Sc</sup> de dicha muestra y llevando a cabo además una amplificación cíclica de mal plegamiento de proteínas (ACMP) en dicha PrP<sup>Sc</sup> recuperada.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es una muestra de plasma.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un 75 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o sustancialmente toda la PrP<sup>Sc</sup> dicha, es recuperada de la muestra de sangre/plasma.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la concentración final de NaCl está entre el 7,5 y el 12,5 % p/v.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende adicionalmente una o más etapas de lavado posteriormente a la precipitación de NaCl inicial.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el sedimento formado posteriormente a la centrifugación es resuspendido en un sustrato adecuado para la amplificación *in vitro* de PrP<sup>Sc</sup> por ACMP.
- 20 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la etapa de amplificación se lleva a cabo usando un procedimiento de ACMP en serie (ACMPs).
8. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en el que la detección de la PrP<sup>Sc</sup> amplificada se lleva a cabo por inmunoensayo dependiente de conformación (IDC).

Figura 1

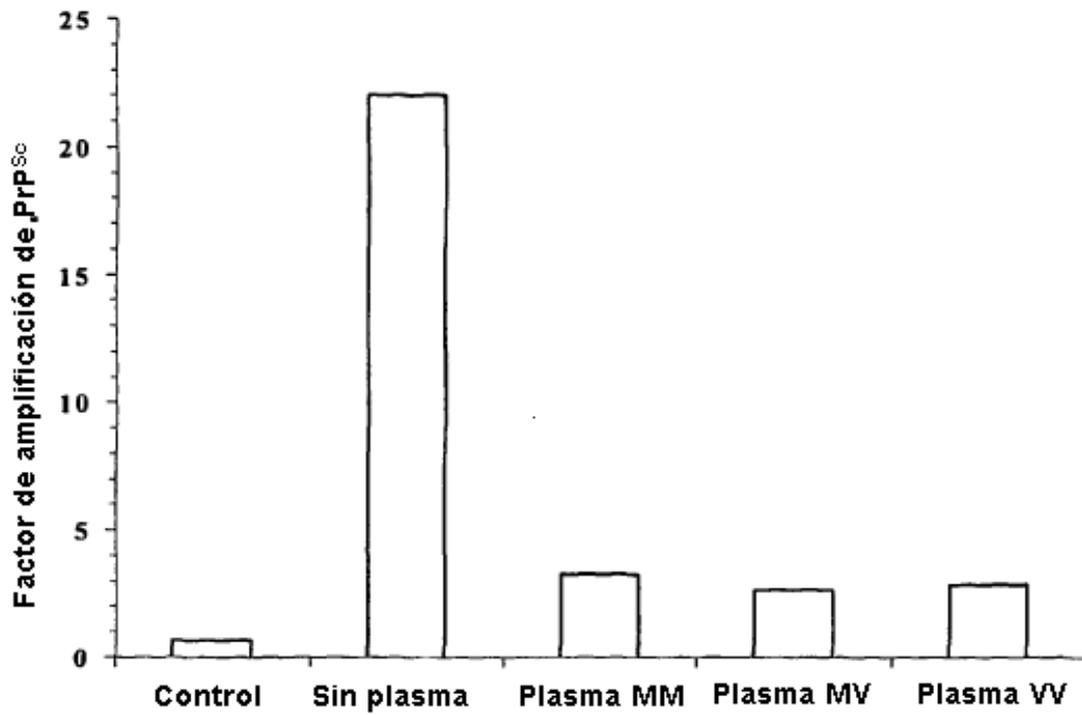


Figura 2

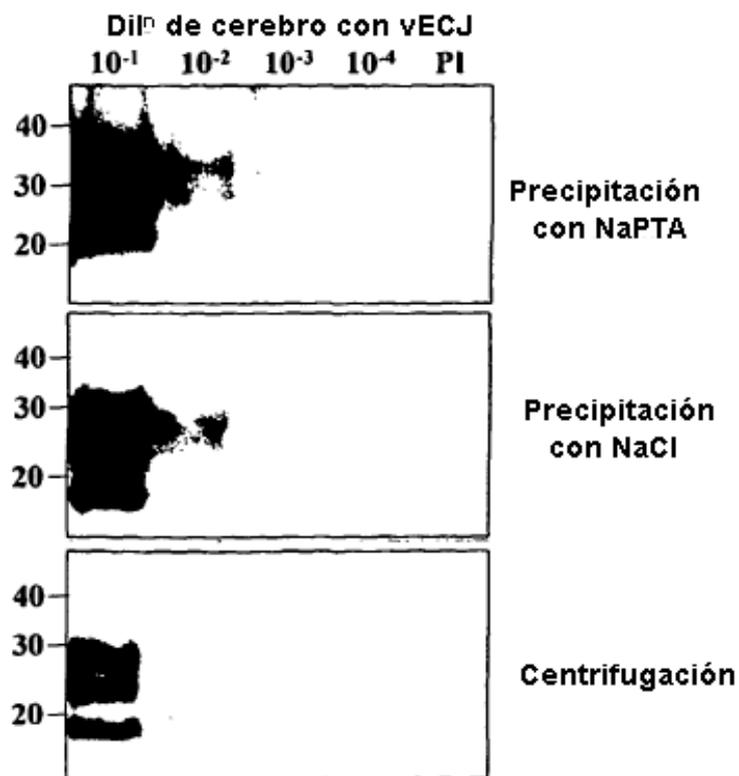


Figura 3

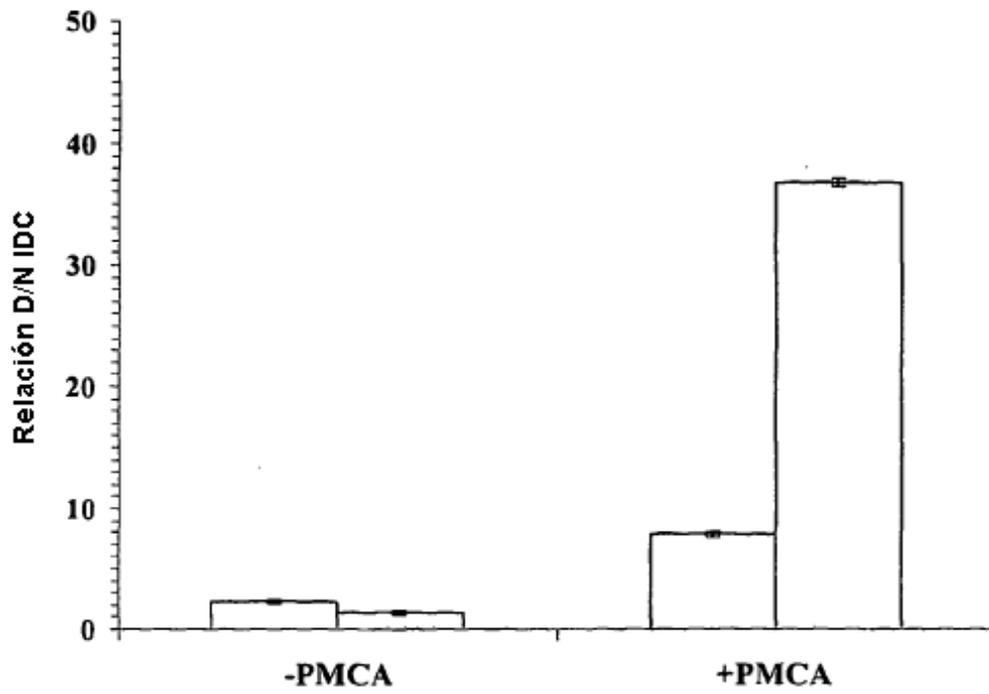


Figura 4

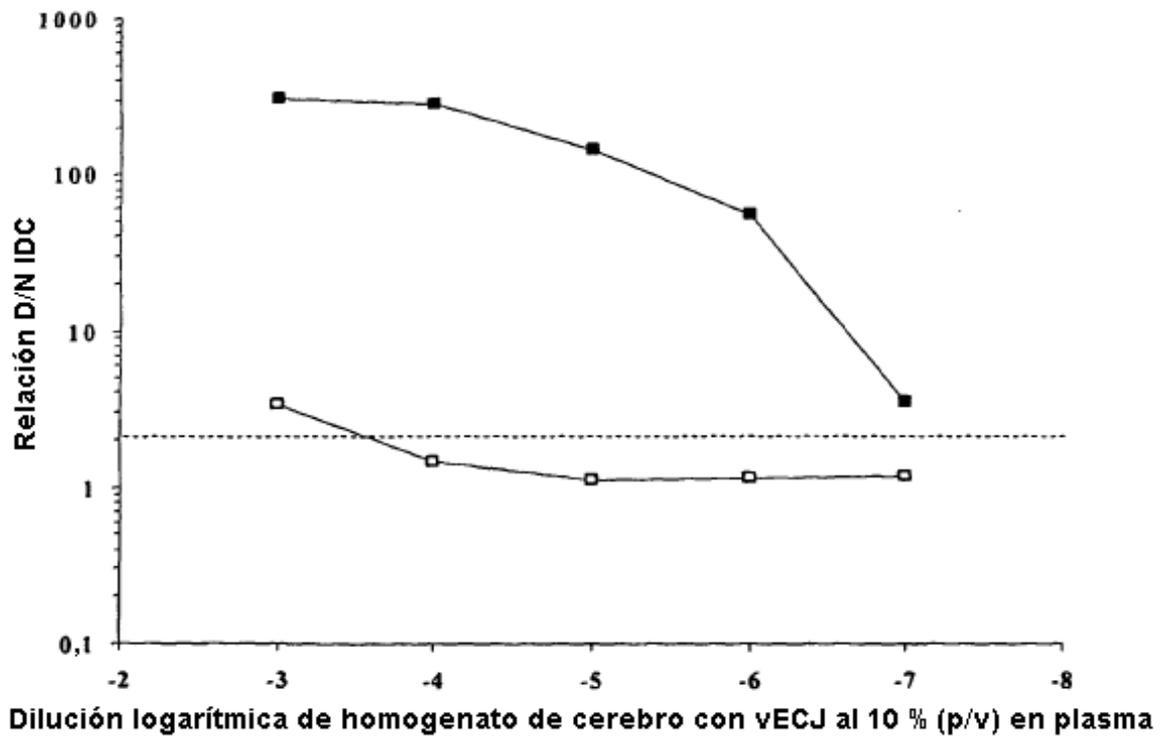


Figura 5

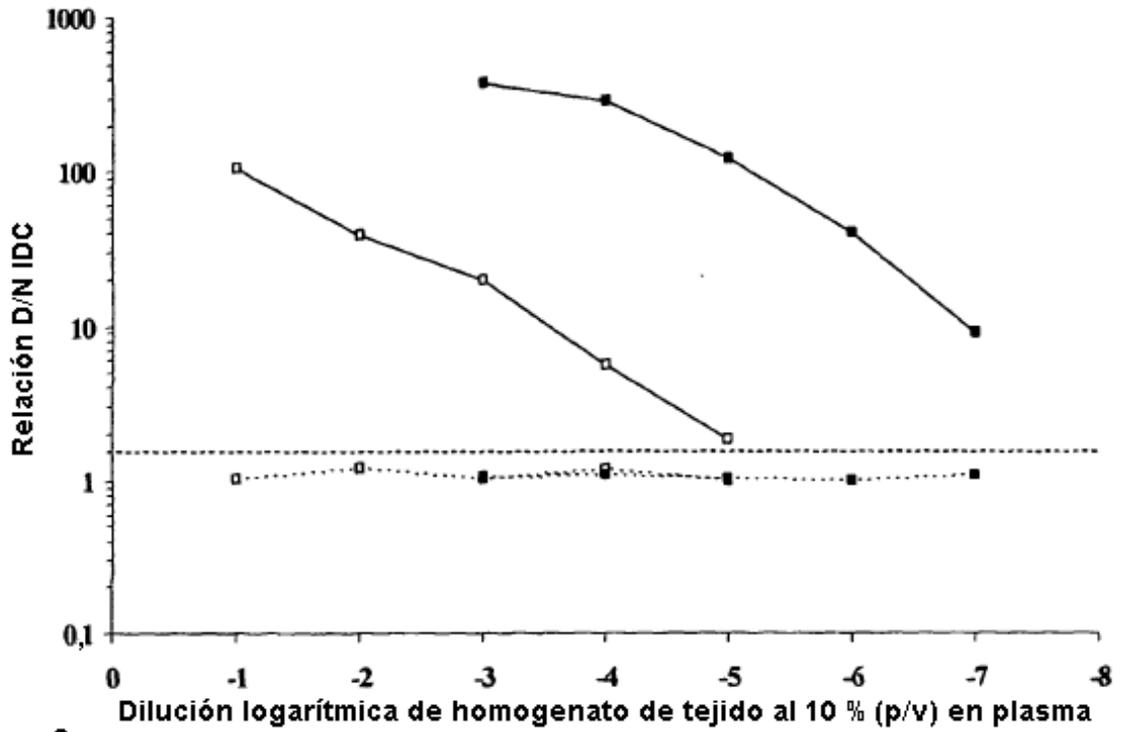


Figura 6

