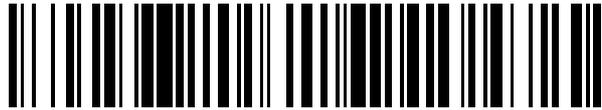


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 293**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2003 E 03709945 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1478931**

54 Título: **Enlazamiento de formas patológicas de proteínas priónicas**

30 Prioridad:

28.02.2002 GB 0204797

18.07.2002 GB 0216808

19.12.2002 GB 0229614

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

21.03.2016

73 Titular/es:

**MICROSENS BIOPHAGE LIMITED (100.0%)
LONDON BIOSCIENCE INNOVATION CENTRE, 2,
ROYAL COLLEGE STREET
LONDON NW1 0TU, GB**

72 Inventor/es:

**LANE, AMIN REZA;
STANLEY, CHRISTOPHER J. y
WILSON, STUART MARK**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 564 293 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

Enlazamiento de formas patológicas de proteínas priónicas

Descripción

- 5 La presente invención se refiere al uso de agentes de enlazamiento resistentes a la proteasa, típicamente, a materiales poliiónicos tales como materiales polianiónicos, que incluyen polisulfato de pentosano, sulfato de dextrano u otros poliglicósidos polianiónicos o materiales policatiónicos que incluyen polibreno, dendrímero de poliamidoamina o poli(cloruro de dialildimetilamonio), bajo condiciones selectivas para capturar la forma rogue o patológica de la proteína priónica PrP^C y proteínas que son formas anormales similares de agregación de proteínas que en su forma normal no están agregadas.
- 10 Las enfermedades priónicas, también denominadas como encefalopatías espongiformes transmisibles o TSE, solo han sido reconocidas recientemente. La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) fue reportada por primera vez en 1985. Los primeros casos de variantes de la enfermedad de Creutzfeldt Jacob (vCJD) se reportaron en 1996. La vCJD es una enfermedad neurodegenerativa fatal en humanos que se cree que es provocada por el consumo de carne contaminada con BSE. El tiempo de incubación entre la infección hasta los síntomas clínicos en los humanos, puede ser de varios años.
- 15 El único componente identificado del prión, el agente que provoca las enfermedades priónicas, es PrP^{Sc}, una isoforma anormal de PrP^C (PrP^{Sc} se denomina también como PrP^{res} y PrP^C se refiere también como PrP^{Sen}). PrP^{Sc} se ha considerado previamente que se distingue del PrP^{Sc} debido a que es relativamente resistente a la proteasa. Recientemente, sin embargo, se ha publicado que existe una forma sensible a la proteasa de PrP^{Sc}, es decir, que existe una forma infecciosa de PrP que es sensible a la proteasa.
- 20 Puede ser que la PrP^{Sc} infecciosa pero sensible a la proteasa sea capaz de agregarse (es decir, se agrega en forma natural) pero aun no se agregado o al menos sólo se ha agregado parcialmente.
- 25 Tanto las formas susceptibles a la proteasa como no susceptibles a la proteasa de PrP^{Sc} y las porciones centrales de PrP^{Sc} surgidas después de digestión parcial con proteasa (frecuentemente denominada en el arte como PrP²⁷⁻³⁰) se denominan aquí como PrP^{Sc} excepto cuando el contexto indica su significado específico. También, el término "proteínas de agregación" se usa para incluir tanto formas de PrP^{Sc} agregadas resistentes a la proteasa como formas similares de otras proteínas, así como formas de PrP^{Sc} infecciosas no agregadas o parcialmente agregadas u otras proteínas, que pueden incluir a la PrP^{Sc} infecciosa susceptible a la proteasa observada recientemente.
- 30 El PrP^C es una glicoproteína anclada a GPI de función desconocida. A pesar de que se han sugerido algunos otros marcadores para enfermedades priónicas, PrP^{Sc} sigue siendo no solamente un componente priónico obligatorio, sino también el único marcador confiable y universalmente confiable para esta familia de enfermedades.
- 35 La metodología actualmente favorecida para evaluar la presencia de PrP^{Sc} es someter una muestra a proteólisis con la proteinasa K durante un periodo de tiempo suficiente para destruir PrP^C y luego determinar la presencia de PrP^{Sc} sobreviviente mediante un inmunoensayo utilizando un anticuerpo que no es selectivo para PrP^{Sc} en presencia de PrP^C (Serban y colaboradores, Neurology, Vol. 40, No. 1, Ene 1990). El uso de la proteasa excluye naturalmente la presencia de un anticuerpo como agente de captura o como un agente de detección durante la etapa de proteólisis. La proteasa debe eliminarse o desactivarse antes de poder introducir el anticuerpo. Sería deseable evitar esta limitación en el procedimiento.
- 40 El ensayo depende de la eliminación completa de PrP^C para evitar falsos positivos y bajo condiciones que tampoco sirven para degradar el PrP^{Sc} para evitar falsos negativos. Se deben desarrollar condiciones de proteólisis selectiva para cada tipo de muestra que se va a analizar. La sensibilidad de ensayo resultante es limitada. Por ejemplo, en ensayos de tejido de cerebro de bovino, la sensibilidad solamente puede ser tal que se obtiene un resultado confiable positivo aproximadamente en el tiempo en el que el animal habría mostrado probablemente síntomas clínicamente observables de BSE. Por lo tanto, el ensayo tiene un límite de sensibilidad en la región de 1 µg/ml, correspondiente a 10⁴-10⁵ unidades infecciosas priónicas.
- 45 Existe la necesidad de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas para enfermedades priónicas. En particular, se requiere una prueba antes de morir utilizando sangre u otros tipos de muestras para evaluar el estado de la enfermedad de un animal particular. En ausencia de tal método, se requiere sacrificar mucho ganado una vez que se identifica un animal afectado en el rebaño. Nuevamente es vital, desarrollar una prueba diagnóstico para cribar la población humana y proteger a los individuos de una infección potencial causada por sangre donada, procedimientos quirúrgicos y trasplantes de órganos y tejidos.
- 50 Los documentos US5977324 y US6221614 describen ambos métodos de enlazamiento de PrP^{Sc} usando ácido fosfotúngstico (PTA). PTA es una proteína no específica precipitante que también se enlaza a, y precipita, un amplio rango

de proteínas diferentes de PrP^{Sc}. La concentración de las proteínas en la muestra afectará también grandemente la recuperación utilizando PTA.

5 Se ha reportado que el plasminógeno enlaza PrP^{Sc} selectivamente con respecto a PrP^C y se propuso su uso en ensayos de diagnósticos (Fischer y colaboradores, Nature, 2000, Nov 23, 408 (6811): 479-83). Sin embargo, este método no ha demostrado ser lo suficientemente útil en la práctica. También se identifica un plasminógeno en una descripción relacionada, la US 2002/0004586, por ser un factor que enlaza selectivamente PrP^{Sc}.

10 De acuerdo con el documento US 6419916 y las descripciones relacionadas, el compuesto de poliamina Superfect^{MR} (una mezcla de poliamina ramificada producida por degradación inducida por calor de un dendrímero PAMAM) y otras poliaminas ramificadas similares son capaces de eliminar PrP^{Sc} de las células *in vitro*. El mecanismo es incierto. Se especula que tales compuestos pueden enlazarse directamente a PrP^{Sc} dispuestos como un amiloide con fracciones expuestas cargadas negativamente e inducir un cambio conformacional bajo condiciones ácidas. Se dice que el efecto no puede involucrar simplemente el enlazamiento de PrP^C e inhibir la síntesis de PrP^{Sc} debido a que se elimina el PrP^{Sc} existente. Se encuentra que la poliamina vuelve a la PrP^{Sc} sensible a la proteasa siempre y cuando el pH esté por debajo de 4. Se deduce que las poliaminas actúan en un compartimiento celular ácido en los experimentos de eliminación de PrP^{Sc} *in vitro*.

15 Parecería a partir de este trabajo, que sería especulativo concluir que tales poliaminas enlazan PrP^{Sc}. Se anticipan una cantidad de otras posibilidades. Se demuestra o se sugiere que no hay selectividad por el enlazamiento PrP^{Sc} sobre PrP^C. Además, no se puede deducir que la ocurrencia de algún enlazamiento se a más que transitoria, sirviendo solo mente para alterar la conformación de PrP^{Sc} para permitir el ataque de la proteasa. También, la acción de las poliaminas parece requerir de un pH bajo. Nuestras propias investigaciones muestran en realidad que tales poliaminas de dendrímeros no enlazan PrP^{Sc} a un pH bajo.

20 El polisulfato de pentosano (poli-b-xilosa-2,3-disulfonato, PPS) es una en el rango de los poliglicósidos polisulfonados grandes (PG) (PM 8.000-12.000). Elaborado a partir de madera de haya, es un compuesto económico que ha sido utilizado durante muchos años como un anticoagulante similar a la heparina. También un PG. Los PG incluyen PPS y otros polianiones, son conocidos por enlazar tanto PrP^C como PrP recombinante (recPrP), véase por ejemplo, Brimacombe DB y colaboradores, Biochem J, 1999 Sep 15; 342 pt 3, 605-13. El PPS ha sido propuesto por lo tanto como un agente terapéutico potencial para prevenir o tratar enfermedades de TSE. Sin embargo, se ha demostrado ahora que elimina el PrP^{Sc} existente *in vivo* o *in vitro*.

25 En la fabricación, se extrae el aserrín de la haya para producir el polímero de azúcar soluble de xilosa (un azúcar de anillo de cinco miembros) llamado pentosano. Este polímero se somete luego a una reacción de sulfatación utilizando una mezcla de ácido clorosulfónico y piridina, que da como resultado que 3 de cada 4 de todos los hidroxilos del anillo del azúcar, tengan un éster sulfato añadido a ellos. El contenido total de sulfato es entonces aproximadamente de 50-55% en peso que es mayor que en la heparina, en la cual es de aproximadamente de 30-35%. La única otra molécula similar que se acerca a este alto grado de sulfatación es el sulfato de dextrano (40-45%). El pentosano tiene un peso molecular tan bajo como 3.5 - 7.0 K.

30 Supattapone y colaboradores, PNAS, vol. 96, No. 25, p.14529-14534, reporta que es posible la eliminación de PrP^{Sc} es utilizando poliaminas ramificadas.

Brimacombe y colaboradores, Biochem J. 1999, vol. 342, p.605-613 discute el enlazamiento de polianiones polisulfatados a la proteína anterior.

35 Wong y colaboradores, The EMBO Journal 2001, vol. 20, No. 3, p.377-386 discute los efectos de los glicanos sulfatados sobre la formación de PrP^{Sc} y la conversión de PrP, y concluyen que el sulfato de heparán y el polisulfato de pentosano promueven la conversión de PrP en PrP^{Sc}.

Xiong y colaboradores, J Neurochem 2001, 79, 669-678 discuten el papel del sarcosil detergente en la estimulación de la conversión de PrP en PrP^{Sc}.

40 Shaked y colaboradores, J Neurochem 2002, 82, 1-5 discuten el enlazamiento de PrP^{Sc} con las proteínas del suero y su relevancia fisiológico.

Harada y colaboradores, J Controlled Release 2001, 71, 1, 71-86 discuten un derivado de dextrano marcado.

El documento EP0943919 divulga polilisina biotinilada.

El documento US6299055 divulga sulfato de dextrano fluoresceína y polilisina fluoresceína.

Bertolatus y colaboradores, Resumen de 42ª Reunión Nacional Anual de la Federación Americana para la Investigación Clínica, 1985, vol. 33, N ° 2, parte 1, p.477A divulga ácido hialurónico biotinilado.

5 No se ha reportado selectividad para el enlazamiento por polianiones o policationes de PrP^{Sc} con respecto al enlazamiento de PrP^C. Sorprendentemente, se han establecido ahora condiciones bajo las cuales, materiales poli-iónicos enlazan proteínas alteradas agregadas del tipo PrP^{Sc}, y además se han establecido condiciones bajo las cuales tales polianiones enlazan estas formas anormales pero no enlazan sus formas normales no agregadas tales como PrP^C, siendo el enlazamiento suficientemente fuerte y bajo condiciones preferidas suficientemente selectivas para ser útiles en ensayos para la presencia de la proteína alterada agregada (por ejemplo, PrP^{Sc}).

10 Por lo tanto, se proporciona ahora, en un primer aspecto de la invención, un proceso para el enlazamiento selectivo de una forma anormal de agregación de una proteína, en presencia de la forma normal de no agregación de la proteína, que comprende poner en contacto bajo condiciones de enlazamiento selectivas, un material que se pone en contacto tanto con la forma normal como anormal, con un agente de enlazamiento que es un poliglicósido polianiónico, una poliamina o una imina de polietileno, que tienen una avidez de enlazamiento por dicha forma de agregación de la proteína como esta presente en la muestra. Las condiciones de enlazamiento pueden incluir la presencia de un agente de competición en solución, donde el agente de competición tiene una menor avidez de enlazamiento por la forma anormal de la proteína que el material poliiónico que es el agente de enlazamiento.

15 El material poliiónico puede estar en solución. Un ejemplo de un polímero polianiónico adecuado es Nafión, un polímero hidrocarbonado sulfonado perfluorado disponible como perlas o como hojuelas. También se pueden utilizar polímeros policatiónicos.

20 En el caso de un material polianiónico, ya sea utilizado en solución o recubriendo una superficie sólida, el material polianiónico puede ser preferiblemente un poliglicósido polianiónico.

25 En general, el agente de competición tiene una menor densidad de grupos iónicos que el material poliiónico. Sin limitarse a la teoría, es probable que los hallazgos descritos en forma detallada aquí sean debidos a formas anormales de agregación de proteína que tienen más sitios de enlazamiento para la interacción con los grupos iónicos que la forma normal de no agregación de la misma proteína. Un agente de competición que tiene uno o unos pocos grupos iónicos es capaz de interactuar con una cierta avidez ya sea con formas de agregación o de no agregación de la proteína, pero un material poli-iónico es capaz de enlazar la forma agregada de la proteína simultáneamente a través de muchos grupos iónicos, lo que conduce a que tenga una mayor avidez por la forma de agregación que por la forma de no agregación.

30 Los resultados de los experimentos con cerebros de bovinos infectados indican que tanto los polianiones (tales como el sulfato de dextrano) como los policationes (tales como polietilenimina) inmovilizados son capaces de capturar la forma anormal de la proteína priónica PrP^{Sc} en homogeneizados de cerebro. La señal obtenida utilizando un conjugado de anticuerpo de antiproteína priónica/enzima es aproximadamente 3 a 5 veces mayor para la mejor superficie de captura policatiónica que para la mejor superficie de captura polianiónica.

35 En ambos casos, el detergente Sarkosyl (N-lauroilsarcosina) puede actuar como un agente de competición útil para mejorar la especificidad de captura de la proteína anormal y evitar una señal de la proteína priónica normal, cuando se utiliza un anticuerpo de antiproteína priónica no específico. También, la digestión parcial la muestra con tripsina, incrementa sustancialmente la señal de PrP^{Sc} cuando se usan tanto compuestos policatiónicos como polianiónicos, pero no tiene efecto sobre la especificidad (lo que indica que, bajo las condiciones empleadas, la tripsina remueve un inhibidor de poliión que se enlaza a PrP^{Sc}, en vez de digerir preferencialmente PrP^C, como se ha observado para la proteinasa K).

40 Se reporta en la literatura científica que el PrP^{Sc} está asociado en forma nativa con polianiones tales como heparanos. Es probable que estos polímeros cargados negativamente estén interactuando con una región cargada positivamente de la estructura PrP^{Sc} y podrían haber múltiples interacciones con las proteínas agregadas.

45 Se propone que un polianión tal como sulfato de dextrano o polisulfato de pentosano es capaz de enlazarse a la estructura de PrP^{Sc} con mucha mayor avidez que los heparanos nativos y puede desplazar a los compuestos endógenos. Por lo tanto, los polímeros altamente cargados negativamente inmovilizados a una superficie, pueden capturar específicamente la proteína priónica anormal. La proteína priónica normal no se agrega y no tiene una afinidad de interacción tan alta con los heparanos endógenos o con polianiones tales como sulfato de dextrano. Bajo las condiciones escogidas del ensayo, la presencia de aniones de menor afinidad tales como el detergente Sarkosyl mejora la especificidad de la captura aún más por competencia con el polianión inmovilizado por los sitios de interacción de PrP^C de menor afinidad.

50 Por el contrario, se sugiere que un polication no puede desplazar a los heparanos endógenos de la estructura de PrP^{Sc}. Se sugiere que en vez de eso se compleja directamente con el heparano endógeno/agregado PrP^{Sc} – que forma una interacción iónica con las cargas negativas libres sobre el heparano. Por lo tanto, en esta configuración, el complejo intacto nativo heparano/PrP^{Sc} se enlaza firmemente al polication inmovilizado, mientras que, en el caso de un polianión inmovilizado, en vez de eso se captura la estructura “desplazada” no nativa de PrP^{Sc}. Esto proporciona una explicación

- para la señal más alta que se obtiene con las mejores superficies de captura policatiónicas, ya que la competencia por los polianiones para los heparanos endógenos puede no ser 100% eficiente y por lo tanto no todos los agregados de PrP^{Sc} son enlazados por los polímeros cargados negativamente.
- 5 Pueden preferirse los agentes de captura aniónica cuando no se espera que la proteína de agregación sea enlazada en forma nativa por heparano nativo, por ejemplo, cuando la muestra es sangre o suero o similares en vez de tejido.
- Además de las interacciones iónicas propuestas, puede haber enlazamientos hidrófobos adicionales entre otras regiones del agregado de PrP^{Sc} y los polímeros empleados. Esto fortalecerá además las interacciones de enlazamiento.
- 10 “Avidez” se utiliza aquí con el significado usual de la fortaleza global del enlazamiento de una molécula con muchos sitios de enlazamiento, con un agente de enlazamiento multivalente y en contraste con “afinidad”, estando la fortaleza de enlazamiento entre cada sitio de enlazamiento individual, y de la molécula y del agente de enlazamiento.
- El agente de competición, si se utiliza, es preferiblemente una amida de aminoácido de un ácido graso, tal como N-lauroilsarcosina. Tales materiales tienen propiedades detergentes, pero en este contexto pueden también actuar simplemente como agentes monovalentes de enlazamiento través de su grupo terminal COO⁻ o como agentes parcialmente polivalentes a través de la formación de micelas.
- 15 En realizaciones preferidas de cada aspecto de la invención, dicha forma anormal de una proteína es PrP^{Sc} y dicha forma normal es PrP^C. Sin embargo, la invención en todas sus formas puede ser ampliamente aplicada al enlazamiento selectivo de formas de agregación anormales de proteínas.
- 20 Los agentes de enlazamiento selectivos policatiónicos que se pueden utilizar incluyen polietileniminas, poliaminas, incluyendo polilisinas, poliamidoaminas, por ejemplo, dendrímeros PAMAM, aminas policuaternarias tales como poli(cloruro de dialildimetilamonio) y polimetobromuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno (también conocido como bromuro de hexadimetrina o Polibreno).
- El poliglicósido polianiónico preferido es un poliglicósido polisulfonado. Sin embargo, se pueden usar también, o en vez de, otros sitios aniónicos tales como grupos de ácido carboxílico o grupos de fosfato.
- Preferiblemente, el poliglicósido polisulfonado es polisulfato de pentosano (PPS) o sulfato de dextrano.
- 25 Se pueden usar otros derivados de dextrano o pentosano polianiónico como el poliglicósido polianiónico.
- Se prefiere un alto nivel de sulfonación (u otro grupo aniónico).
- Los niveles de sulfonación de las carrageninas, dextranos y pentosano son altos. Si una baja proporción de los sitios de sulfonación potenciales es realmente tomada por los grupos sulfato, entonces se puede encontrar que los compuestos no interactúan selectivamente con los sitios de enlazamiento en el PrP^{Sc}.
- 30 Los agentes de enlazamiento selectivo aniónicos adecuados pueden incluir:
- Polisulfato de pentosano (PM 3500-5000), sulfato de dextrano 500 (PM 500,000), Iota-carragenano, Lambda-carragenina y carragenanos, por ejemplo, Kappa-carragenano, heparinas y heparanos, sulfato de dextrano 8 (PM 8,000), poliglicósidos sulfonados tales como fucoidano, sulfato de queratina, polisulfato de ácido hialurónico, ácido colomónico (ácido polisiálico bacteriano), los tipos iii y iv de carragenano, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, furcellarano, polisacáridos sulfatados comercialmente disponibles, por ejemplo, polisorbato, sizofirano, goma xantana, almidón, compuestos de celulosa, pectina, mucina gástrica, ceratonia, agares, goma de acacia, glicósido sulfatado 1, glicósido sulfatado 2, N-acetil-D-glucosaminas o ácido L-idurónico de sulfato de Dermatano.
- 35 El material poli-iónico puede ser uno seleccionado que tenga la capacidad bajo condiciones no selectivas de enlazarse tanto con formas alteradas de agregación como formas rugues de una proteína y también la forma normal de no agregación de la proteína, así como la capacidad para enlazar la forma de agregación selectivamente bajo condiciones apropiadas.
- 40 La selectividad deseada se puede obtener mediante el ajuste adecuado de las condiciones de reacción, particularmente la presencia y concentración del agente de competición, el pH y la detergentencia. Preferiblemente, por lo tanto, se selecciona así el pH para permitir dicho enlazamiento selectivo.
- 45 El pH es preferiblemente de 5,6 a 9, por ejemplo, de 7 a 9, más preferiblemente de 8 a 9, por ejemplo, de 8,2 a 8,6, especialmente 8,4, particularmente cuando se usan los detergentes descritos más adelante. Los reguladores adecuados incluyen reguladores de fosfato y reguladores Tris.

La concentración de sal es preferiblemente no mayor a 250 mM y es preferiblemente significativamente menor, por ejemplo, no superior a 100 mM.

Preferiblemente, está presente un detergente que promueve dicho enlazamiento selectivo ya sea en virtud de la detergencia o actuando como un agente de competición.

5 Se prefiere particularmente para este propósito, detergentes que sean una amida de aminoácido de un ácido graso, por ejemplo, n-lauroilsarcosina u otras sarcosinas de ácido graso. Se prefiere especialmente la presencia de tal agente detergente/de competición, cuando el agente de enlazamiento selectivo es polianiónico.

10 Preferiblemente, la concentración de este detergente es al menos del 0,5% en peso, más preferiblemente al menos del 0,1%, preferiblemente al menos del 0,2%, por ejemplo, de 0,2 a 2%, más preferiblemente de 0,5 a 1,5% pero se pueden utilizar cantidades más grandes.

15 Se pueden utilizar otros detergentes que tienen un efecto similar, incluyendo CHAPS, Brij, Octil- β -glicósido, Tween 20, Triton X-100 y Nonidet P-40. El uso de altas concentraciones de dodecilsulfato de sodio (SDS) es sin embargo indeseable. Las combinaciones de n-lauroilsarcosina (o similar) con otros detergentes son adecuadas, preferiblemente contienen de 0,5 a 2%, por ejemplo, aproximadamente 1% de detergente de sarcosina, por ejemplo, con 0,5 a 2%, por ejemplo, aproximadamente 1% de uno de los detergentes enlistados anteriormente, particularmente Triton X-100 o Nonidet P-40.

20 Se ha encontrado que la presencia de tripsina, quimotripsina, proteinasa K, u otra de tales proteasas puede ser útil para prevenir la inhibición por materiales desconocidos del enlazamiento de la proteína de agregación ya sea con agentes de enlazamiento selectivos policatiónico o polianiónico. Este es especialmente el caso cuando la muestra contiene un nivel relativamente alto de otras proteínas, tal es el caso si se diluyen una muestra de cerebro negativa para PrP^{Sc} con un material de cerebro negativo para PrP^{Sc}. Se puede obtener una prevención adicional de la inhibición de matriz la incluyendo otras enzimas de naturaleza degradante que incluyen ADNasa y colagenasa.

El agente de enlazamiento selectivo después del enlazamiento con dicha forma anormal de agregación de la proteína puede ser capturado con un agente de captura inmovilizado y se puede determinar la presencia o cantidad de un complejo formado entre dicho agente de enlazamiento selectivo y dicho agente de captura.

25 Dicho agente de captura puede ser una lectina (cuando el agente de enlazamiento es adecuado, por ejemplo, es un poliglicósido), o un anticuerpo reactivo con dicho agente de enlazamiento selectivo. Dicho agente de enlazamiento selectivo puede contar con una fracción de etiqueta que puede enlazarse selectivamente y dicho agente de captura puede enlazarse entonces a dicha fracción de etiqueta.

30 Opcional y alternativamente, se inmoviliza el agente de enlazamiento selectivo a un medio sólido antes de exponerlo a dicha muestra. El agente de enlazamiento selectivo puede contar con una fracción de etiqueta que puede enlazarse selectivamente y puede ser inmovilizado a dicho medio sólido a través de dicha etiqueta.

Cuando está presente una fracción de etiqueta que puede ser enlazada, puede ser por ejemplo, biotina, fluoresceína, dinitrofenol, digoxigenina o (His)₆.

35 El agente de enlazamiento selectivo puede ser inmovilizado directamente a un sólido en vez de a través de una etiqueta que puede ser enlazada. Por ejemplo PG puede estar directamente acoplado mediante acoplamiento covalente a través de grupos hidroxilo restantes del PG usando fases sólidas que se convierten en derivadas por ejemplo con grupos epoxi o vinil sulfona.

40 En cada aspecto de la invención, ya sea que se haga el enlazamiento de la proteína anormal antes o después de la inmovilización o captura del agente de enlazamiento selectivo, se someten preferiblemente los complejos de proteína anormal/agente de enlazamiento selectivo inmovilizados a una etapa de lavado para eliminar la proteína normal para mejorar la selectividad. La etapa de lavado se realiza preferiblemente utilizando una solución que contiene dicho agente de competición, que puede ser una solución detergente, que preferiblemente comprende nuevamente un detergente ya sea en virtud de su detergencia o de otra forma promueve un enlazamiento selectivo. Esta es preferiblemente una amino amida de un ácido graso, por ejemplo, n-lauroilsarcosina u otra sarcosina de ácido graso. Preferiblemente, la concentración del detergente de sarcosina en la etapa del lavado es al menos del 0,5%, preferiblemente al menos del 0,1%, más preferiblemente al menos del 0,2%, por ejemplo, del 0,2 a 2%, preferiblemente del 0,5 al 1,5%. También pueden estar presentes otros detergentes y el lavado está preferiblemente regulado a un pH en el intervalo de 5,6 a 8,4.

50 Dicho enlazamiento de PrP^{Sc} (u otra proteína anormal) puede ser determinado cualitativa o cuantitativamente mediante un inmunoensayo para PrP^{Sc} (u otra proteína de agregación) después de la separación de PrP^{Sc} enlazado de PrP^C no enlazado (u otra proteína en forma normal).

También, una vez que la forma de agregación de la proteína ha sido selectivamente enlazada y opcionalmente después de que ha sido removida la forma normal, más material polianiónico, por ejemplo, poliglicósido aniónico (marcado adecuadamente con una etiqueta o marcación detectable) puede ser enlazada a la proteína de agregación ya enlazada para formar una estructura tipo sándwich (por ejemplo, una etiqueta de poliglicósidos de proteína agregada de poliglicósido) que puede ser luego cuantificado o detectado. Las condiciones de enlazamiento selectivo pueden no ser necesarias cuando se lleva a cabo la segunda parte de la formación de la estructura tipo sándwich.

Como se mencionó anteriormente, el agente de enlazamiento selectivo puede ser inmovilizado a un material sólido ya sea antes o después de ser puesto en contacto con la proteína alterada. La separación de la muestra del material sólido puede ser utilizada entonces para remover la forma normal de la proteína del ensayo dejando únicamente la forma alterada para una determinación adicional.

En este contexto, los materiales del soporte sólidos incluyen no solamente materiales macroscópicos o manipulables tales como placas de microtitulación, dispositivos de flujo laminar y tiras reactivas, sino también microperlas y microperlas superparamagnéticas, que pueden ser separadas por filtración o por captura magnética. La biotina u otras etiquetas pueden ser conjugadas con sulfato de dextrano o PPS y materiales similares mediante métodos químicos estándar. Aproximadamente uno de cada diez de los residuos de la cadena principal de azúcar en PPS es un éster metílico de ácido urónico y esto proporciona una ruta de acoplamiento través de sus residuos carboxílicos. Otras rutas conocidas para acoplamiento son hidroxilo (uno de cada cuatro está aún libre después de la reacción de sulfatación), o un el grupo terminal de un azúcar reductor. La biotina es una fracción de etiqueta que puede enlazarse convenientemente y empleada para enlazamiento del material polianiónico u otro agente de enlazamiento selectivo a un material sólido que forma derivados con avidina o un material con propiedades de enlazamiento de avidina tales como estreptavidina, Neutravidina, o Captavidina.

Otras moléculas adecuadas para uso como fracciones de etiquetas que pueden ser enlazadas incluirán todas aquellas que sean fácilmente conjugadas con el material poli-iónico y que se prestan para capturar un agente de captura adecuado. Por ejemplo, una molécula tal como la fluoresceína puede ser conjugada con PPS o moléculas similares mediante reacción con un derivado de amino fluoresceína con las cadenas laterales y urónicas del polisulfato de pentosano en presencia de carbodiimida EDC(1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida) y puede ser capturada por un anticuerpo adecuado fácilmente disponible que en sí mismo puede ser inmovilizado al material sólido. Otras etiquetas adecuadas para captura de anticuerpo en esta forma incluye dinitrofenol DNP, digoxigenina, ácido nucleico o secuencias análogas de ácido nucleico, y (His)₆. Los agentes de enlazamiento diferentes a anticuerpos también pueden ser utilizados, por ejemplo, secuencias complementarias de ácido nucleico complementario o secuencias análogas de ácido nucleico.

Alternativamente, sin embargo, se puede utilizar un agente de captura que se enlaza selectivamente al material poli-iónico mismo en vez de a través de una fracción de etiqueta. Por ejemplo, se pueden enlazar poliglicósidos mediante una lectina adecuada o mediante un anticuerpo adecuado. Los anticuerpos para enlazamiento de PPS son divulgados por ejemplo en Kongtawelert y colaboradores, J. Immunol. Methods 1990, Enero 24; 126(1); 39-49. Las técnicas estándar para inmovilización de tales anticuerpos son bien conocidas en el arte.

Cualquier método conocido o inventado en el futuro para determinar la presencia o cantidad de proteínas alteradas de agregación o agregadas tales como PrP^{Sc} (sin necesidad de excluir selectivamente la forma normal tal como PrP^C) puede ser usado para determinar la presencia o cantidad de la forma de agregación una vez que ha sido enlazada por el agente de enlazamiento selectivo y la proteína de forma normal no enlazada ha sido separada de allí, adecuadamente mediante inmovilización de lo enlazado y retirando mediante lavado no enlazado residual. Tales métodos incluyen los métodos conocidos ELISA, RIA, IRMA y otras formas de inmunoensayo, por ejemplo el método incorporado en el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad y descrito en Serban y colaboradores

Dependiendo de la forma del ensayo utilizado, puede ser deseable o requerido eluir la proteína de forma anormal capturada del agente de enlazamiento selectivo antes del ensayo. En la realización de dicha etapa de elución, puede ser deseable la presencia de un caótropro tal como tiocianato de guanidina en una concentración de al menos 1 M, preferiblemente de 2 a 6 M, por ejemplo, 4 a 6 M. Se pueden usar caótropros alternativos incluyendo urea.

Adicional o alternativamente, se puede usar un agente de competición que tenga una avidez aún mayor para desplazar la proteína del agente de enlazamiento selectivo. El dodecil sulfato de sodio (SDS) es adecuado para esto y se usa preferiblemente en una concentración de 0,5 a 1% en peso, preferiblemente por encima de 0,75%.

Otras proteínas que pueden ser selectivamente enlazadas y determinadas de acuerdo a la invención, incluyen la proteína β -amiloide y proteína tau que forma placas en la enfermedad de Alzheimer.

Sin querer estar restringido a la siguiente teoría, se piensa que PPS y moléculas similares funcionan en la invención mediante pares de enlazamiento de grupos sulfato negativos con pares de aminoácidos positivos (Lys y Arg) en las proteínas relevantes o a través de los sitios de enlazamiento metálicos de polihistidina de las proteínas. El enlazamiento a las formas agregadas puede ser más fuerte debido al mayor número de sitios de enlazamiento presentados por la

proteína de agregación. Los detergentes aniónicos adecuados pueden competir más efectivamente por el enlazamiento con la forma de no agregación para mejorar la selectividad. Convenientemente, la selectividad obtenida es tal que la afección por el enlazamiento con la proteína de agregación es al menos tres veces aquella para la forma normal, preferiblemente al menos de 10:1.

5 En un aspecto adicional, la invención incluye un proceso para separar PrP^{Sc} de PrP^C que comprende enlazar selectivamente PrP^{Sc} con un agente de enlazamiento que es un poliglicósido polianiónico, una poliamina o una polietilenimina en presencia de una amida de aminoácido de un ácido graso. Las condiciones preferidas para tal enlazamiento se exponen en forma detallada más arriba y la proteína enlazada puede ser ensayada como se describe.

10 La invención será descrita e ilustrará además mediante los siguientes ejemplos haciendo referencia al dibujo acompañante en el cual:

La Figura 1 muestra curvas de dilución contenidas en el Ejemplo 9.

Ejemplo 1: Separación de un prión normal de la proteína priónica rogue utilizando polisulfato de pentosano biotinilado y la posterior captura por afinidad.

Introducción

15 Se conjugó biotina con polisulfato de pentosano utilizando métodos químicos estándar. Se permitió que el polisulfato de pentosano biotinilado se enlazara a la proteína priónica rogue en homogeneizados de cerebro y después del enlazamiento se capturaron los complejos de polisulfato de pentosano/prión usando perlas superparamagnéticas que forman derivados con estreptavidina. Se eluyó posteriormente el prión rogue capturado de las perlas y se detectó usando el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad basado en inmunología; este último kit es incapaz de diferenciar la proteína priónica rogue de la normal y dará señal con ambas proteínas. Se investigó un banco de dos cerebros de bovino infectados con BSE y dos no infectados y se utilizaron para demostrar que el polisulfato de pentosano, bajo las condiciones específicas descritas, podría ser utilizado para capturar específicamente la proteína priónica rogue a partir de los homogeneizados de cerebro.

Método

25 Preparación de las perlas superparamagnéticas

1. Justo antes del uso, se lavaron 400 µl de perlas superparamagnéticas de estreptavidina (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de TBST (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, Tween 20 al 0,05% (v/v) [Sigma-Aldrich Company Ltd., P-7949]).

2. Se resuspendieron finalmente las perlas en 400 µl de TBST.

30 3. Se prepararon alícuotas de 100 µl en cuatro tubos y se removió el líquido. Las perlas estaban entonces listas para uso.

Preparación de los homogeneizados del cerebro.

1. Se agregaron 300-500 mg de cada tejido de cerebro a los tubos de trituración que contenían perlas de trituración suministradas en el kit de purificación BSE (Bio-Rad). Se aspiró el líquido suministrado originalmente en estos tubos en el kit y se descartó antes del uso.

35 2. Se añadió un volumen de NaCl de 150 mM que se calculó para generar un homogeneizado de cerebro al 50% (p/v) después de la homogeneización, a cada tubo.

3. Los tubos se homogeneizaron durante 45 segundos a una velocidad fijada en 6,5 en un Ribolyzer (adquirido a través de Bio-Rad).

4. Los homogeneizados se diluyeron 1:1 con NaCl 150 mM.

40 5. Se colocaron volúmenes de 50 µl de cada homogeneizado en tubos separados.

Captura específica de la proteína priónica rogue

6. Se agregaron luego 10 µl de N-lauroilsarcosina al 20% (p/v) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) a cada tubo del homogeneizado y se mezcló.

7. Se agregaron luego 50 µl de polisulfato de pentosano biotinilado (10 µg/ml) en agua estéril destilada) a cada tubo, se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

8. Se añadió luego cada reacción a un tubo de perlas superparamagnéticas lavadas de estreptavidina y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

5 9. Se lavaron luego las perlas mediante captura magnética en tres volúmenes de 1 ml de TBST.

Elución de la proteína priónica rogue e inmunodetección.

1. Finalmente, después del último lavado, se resuspendieron las perlas de cada reacción en 10 µl de C1 (suministrado con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad)

2. Se agregaron 5 µl de SDS al 0,2% (p/v) a cada suspensión de perlas y se mezcló.

10 3. Se agregaron 5 µl de tiocianato de guanidina 1 M (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) a cada suspensión de perlas y se mezcló.

4. Se calentó la reacción a 100°C durante 5 minutos.

5. Se agregaron luego 100 µl de R6 (suministrados con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad) y se mezcló.

15 6. Se utilizaron luego 100 µl de cada eluato en el kit de detección de Platelia^{MR} BSE de Bio-Rad usando el protocolo y los reactivos suministrados con este kit. En resumen, este kit involucra inmunocaptura de la proteína priónica rogue y/o normal e inmunodetección con un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante.

Resultados

Después de realizar la inmunodetección en el ensayo con Platelia^{MR} con base en la placa de microtitulación, se midió la señal en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de ELISA.

Homogeneizado de cerebro utilizado	DO450
Muestra 1 de cerebro de bovino infectado con BSE	0,229
Muestra 2 de cerebro de bovino infectado con BSE	0,208
Muestra 1 de cerebro de bovino normal	0,061
Muestra 2 de cerebro de bovino normal	0,047

20

La señales de los dos homogeneizados de cerebro infectados con BSE que contenían prión rogue, es significativamente mayor que en los homogeneizados de cerebro normales no infectados.

Discusión

25 El kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad no puede diferenciar entre la proteína priónica rogue o normal. Normalmente, la especificidad por la proteína priónica rogue se logra mediante digestión previa de la muestra con proteinasa K que remueve la proteína priónica normal susceptible a la proteasa. Cualquier proteína priónica rogue en la muestra es más resistente a la digestión con proteasa y permanece y es posteriormente detectada por el ensayo con Platelia^{MR}. En este experimento se demostró un enfoque alternativo para digestión de la muestra con proteasa. Se utilizaron condiciones definidas bajo las cuales el polisulfato de pentosano biotinilado en solución puede enlazarse específicamente con la proteína priónica rogue en la muestra. Se puede capturar luego el complejo de prión rogue/polisulfato de pentosano utilizando perlas superparamagnéticas de estreptavidina. Después del lavado, la proteína priónica rogue puede ser posteriormente eluida y detectada en el inmunoensayo. La proteína priónica normal no es capturada por este protocolo y retirada por lavado y por lo tanto no es detectada en el inmunoensayo. Se ha demostrado que mediante el uso de esta técnica se puede detectar correctamente la proteína priónica rogue en dos cerebros de

30

35 bovino infectados con BSE y no se observó señal en dos cerebros normales de bovino.

Ejemplo 2: Separación de la proteína priónica normal de la proteína priónica rogue utilizando polisulfato de pentosano biotinilado inmovilizado.

Introducción

5 Se conjugó la biotina con polisulfato de pentosano utilizando métodos químicos estándar. Se usó polisulfato de pentosano biotinilado para recubrir las perlas superparamagnéticas que forman derivado con estreptavidina. Las perlas recubiertas fueron utilizadas luego para captura específicamente la proteína priónica rogue de homogeneizados de cerebro. La proteína priónica rogue capturada fue posteriormente eluida de las perlas y se detectada utilizando el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad basado en inmunología; este último kit es incapaz de diferenciar la proteína priónica rogue de la normal, y dará una señal con ambas proteínas. Se investigó un banco de tres cerebros de bovino infectados con BSE y tres no infectados, y se utilizó para demostrar que el polisulfato de pentosano, bajo las condiciones específicas descritas, podría capturar específicamente proteína priónica rogue a partir de los homogeneizados de cerebro.

Método

Preparación de perlas magnéticas recubiertas con polisulfato de pentosano.

- 15 1. Se lavaron 600 µl de perlas superparamagnéticas de estreptavidina (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) mediante magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de TBS (Tris 50 Mm Tris, NaCl 150 mM, pH 7,5).
2. Se resuspendieron finalmente las perlas en 540 µl de TBS y 60 µl de 10 mg/ml de polisulfato de pentosano biotinilado en TBS añadido. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, con movimiento de balanceo suave para permitir que el polisulfato de pentosano recubra las perlas.
- 20 3. Después de recubrir las perlas fueron lavadas por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de albúmina bovina al 5% (p/v) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906), regulador de fosfato 50 mM pH 8,4 y finalmente se resuspendieron en 60 µl del mismo regulador. Las perlas estaban entonces listas para uso.

Preparación de los homogeneizados de cerebro.

- 25 1. Se agregaron 300-500 mg de cada tejido de cerebro a los tubos de trituración que contenían perlas de trituración como las suministradas en el kit de purificación BSE (Bio-Rad). El líquido originalmente suministrado en estos tubos en el kit fue aspirado y descartado antes del uso.
2. Se añadió un volumen de NaCl 150 mM que se calculó para generar un homogeneizado de cerebro al 50% (p/v) después de homogeneización, a cada tubo.
3. Se homogeneizaron los tubos por 45 segundos a una velocidad fijada en 6,5 en un Ribolyzer (adquirido a Bio-Rad).
4. Se diluyeron los homogeneizados 5 veces con albúmina bovina al 5% (p/v) regulador de fosfato 50 mM pH 8,4.
- 30 5. Se colocaron volúmenes de 45 µl de cada homogeneizado en tubos separados.
6. Se agregaron 5 µl de SDS al 20% (p/v) (dodecil sulfato de sodio) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) a cada tubo y se mezcló completamente.
7. Se agregaron luego 450 µl de albúmina bovina al 5% (p/v), regulador de fosfato 50 mM pH 8,4 a cada uno y se mezcló.
8. Se agregaron luego 50 µl de N-lauroilsarcosina al 20% (p/v)(Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) y se mezcló.

35 Captura específica de la proteína priónica rogue

1. Se agregaron 10 µl de perlas superparamagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosano, a cada homogeneizado de cerebro diluido y se incubó con movimiento de balanceo durante 1 hora a temperatura ambiente.
2. Se lavó luego cada reacción mediante captura magnética con 3 volúmenes de 100 µl de TBS.

Elución de la proteína priónica rogue e inmunodetección.

- 40 1. Se resuspendieron las perlas de cada reacción en 10 µl de C1 (suministrado con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad).

2. Se agregaron 5 µl de SDS al 0,2% (p/v) a cada suspensión de perlas y se mezcló.
3. Se agregaron 5 µl de tiocianato de guanidina 1 M (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) a cada suspensión de perlas y se mezcló.
4. Se calentó la reacción a 100°C por 5 minutos.
5. Se agregaron luego 100 µl de R6 (suministrado con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad) y se mezcló.
6. Se usaron luego 100 µl de cada eluato en el Bio-Rad.
7. El kit de detección de BSE Platelia^{MR} utilizando el protocolo y los reactivos suministrado con este kit. En resumen, este kit involucra inmunocaptura de la proteína de priónica rogue y/o normal e inmunodetección con un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante.

10 Resultados

Después de realizar la inmunodetección en el ensayo con Platelia^{MR} con base en la placa de microtitulación, se midió la señal en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de ELISA.

Homogeneizado de cerebro utilizado	DO450
Muestra 1 de cerebro de bovino infectado con BSE	0,465
Muestra 2 de cerebro de bovino infectado con BSE	0,382
Muestra 3 de cerebro de bovino infectado con BSE	0,437
Muestra 1 de cerebro de bovino normal	0,060
Muestra 2 de cerebro de bovino normal	0,074
Muestra 3 de cerebro de bovino normal	0,066

- 15 Las señales de los tres homogeneizados de cerebro infectados con BSE que contenían proteína priónica rogue, son significativamente mayores que en los homogeneizados de cerebro normal no infectados.

Discusión

- 20 El kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad no puede diferenciar entre la proteína priónica rogue o la normal. Normalmente, la especificidad para la proteína priónica rogue se logra mediante digestión previa de la muestra con proteinasa K que remueve la proteína priónica normal susceptible a la proteasa. Cualquier proteína priónica rogue en la muestra es más resistente a la digestión con proteasa y permanece y es posteriormente detectada por el ensayo con Platelia^{MR}. En este experimento se demostró un enfoque alternativo para digestión de la muestra con proteasa. Se han utilizado condiciones definidas bajo las cuales el polisulfato de pentosano puede capturar específicamente la proteína priónica rogue de la muestra. Esta proteína priónica rogue capturar se eluye y detecta en el inmunoensayo. La proteína priónica normal no es capturada por el polisulfato de pentosano y se lava y por lo tanto no se detectada en el inmunoensayo. Se demostró que mediante el uso de esta técnica se podía detectar correctamente la proteína priónica rogue en tres cerebros de bovino infectados con BSE y no se observó señal en tres cerebros normales de bovino.

Ejemplo 3: Biotinilación de PPS

Principio del método.

- 30 Aproximadamente uno de cada diez de los residuos de azúcar en la cadena principal de poli-xilosa del sulfato de pentosano es sustituido con un residuo de ácido urónico, este a su vez es sustituido con un éster metílico sobre alguno de los grupos carboxilo, de tal manera que existe una cantidad de grupos carboxilo libres en la molécula y pueden formar derivados con carbodiimida para formar ésteres activos. Estos a su vez pueden ser sustituidos con especies amino para generar un enlace amida. En este caso particular se escogen EDC y NHS para formar el éster activo y se escoge la hidrazida de biotina como la especie amino. Se realizaron dos reacciones, en una etapa de reacción en la cual está

presente inicialmente hidrazida de biotina y no se añade NHS, y una segunda reacción en la cual se permite que NHS/EDC reaccione simultáneamente con PS e hidrazida de biotina.

Materiales

El sulfato de pentosano (Norton Healthcare) fue un obsequio de Stephen Dealler.

5 100 mg de Hidrazida de biotina, Pierce #21339 pm 258,33 lote AH41461

EDC [metiodida de 1-etil-3-(3-dimetilamimopropil)carbodiimida] Sigma #16.534-4, 1 g,

NHS [N-hidroxisuccinimida] Sigma # H7377, 5 g, pm 115,1, tubo de diálisis mwco 3,5k Pierce #68035 DMSO Sigma

Método

Se llevaron a cabo las dos reacciones utilizando los siguientes protocolos en dos versiones con y sin NHS:

10 Disolver 100 mg de hidrazida de biotina en 6 ml de DMSO en un vial de vidrio, esto puede requerir calentamiento y/o ultrasonificación. La concentración final es por lo tanto 16,7 mg/ml o 65 mM. Tomar 1000 mg de sulfato de pentosano y disolver en 10 ml de una mezcla 50/50 de DMSO y agua, esto puede hacerse en un recipiente plástico universal. Disolver 100 mg de EDC en 1 ml de DMSO en un vial de vidrio, puede requerir calentamiento. Disolver NHS (aproximadamente 40-50 mg) en 1 ml de agua.

15 La reacción se realiza en recipientes universales de poliestireno de fondo cónico con una pequeña barra magnética circular de agitación (aproximadamente 10 mm de diámetro) en una base de agitación magnética que cuenta con una combinación de electrodo de pH de 12 mm de diámetro (o menos).

Ejemplo 3a: Reacción sin NHS

20 Colocar 5,0 ml de solución de sulfato de pentosano en el recipiente de reacción, añadir 1,0 ml de solución de hidrazida de biotina, agitar bien y registrar el pH. Se puede esperar un valor de 7 - 8. Añadir 0,2 ml de solución de EDC y mientras se continua la agitación se registrar el pH y se añaden alícuotas de 10 µL de HCL 1 N a partir de una micro jeringa de vidrio y aguja, registrando el pH después de cada adición. Continuar las adiciones del ácido hasta que el pH esté en el intervalo de 5-6. Esto es necesario ya que la reacción genera iones OH. La reacción debe mantenerse clara e incolora todo el tiempo. Si se forma cualquier precipitado blanco de hidrazida de biotina, entonces se debe incrementar la concentración de DMSO, el valor objetivo es $\geq 50\%$. Dejar la reacción durante 2 - 3 horas a temperatura ambiente (o durante la noche si es más conveniente).

30 Registrar el pH final de la mezcla de reacción. Añadir un volumen igual de NaCl 1 M para diluir el DMSO hasta un 25% y desplazar iónicamente la hidrazida enlazada y transferir todo el contenido a un tubo de diálisis de 35 cm de largo por 2,2 cm de diámetro. Obsérvese que la concentración de DMSO se reduce hasta un 25% para evitar daño al tubo de diálisis, el tubo debe ser probado con agua antes de uso para detectar cualquier perforación y debe llenarse únicamente hasta un tercio para permitir el aumento de volumen con la diálisis. Dializar durante la noche dos litros de agua y repetir esto varias veces; entre más diálisis más tiende el sulfato de pentosano a retener fuertemente los iones básicos mediante interacción iónica no covalente en virtud de su fuerte carga negativa. Liofilizar la solución dializada y registrar el peso seco. El producto final debe ser una torta blanca firme. Los rendimientos pueden variar mucho, pero 50-60% es típico, la mayoría de las pérdidas ocurren en la diálisis, debido a la heterogeneidad de peso molecular del sulfato del pentosano y la pérdida de especies con un peso molecular menor a 3,500.

Ejemplo 3b: Reacción con HNS

40 Esta reacción se lleva a cabo esencialmente como anteriormente excepto porque se añade 1,0 ml (44 mg) de NHS al vial de reacción antes de la adición del reactivo EDC que inicia la reacción. El pH inicial puede estar en el intervalo de 6-7 y debe ser ajustado hacia abajo con HCl 1 N hasta aproximadamente pH 5-6.

Control de calidad

45 Después de calcular la recuperación a partir del peso seco, se elabora una solución de 10 mg/ml en agua y se escanea el espectro desde 200 a 400 nm. Los picos deben observarse en 260 y 280 nm aunque uno o ambos pueden ser hombros no resueltos. Esta adsorción es debida a residuos de piridina incorporados en la molécula durante la etapa de sulfatación. Se pueden utilizar para controlar la concentración del sulfato de pentosano, por ejemplo, durante la cromatografía. El pentosano puede ser controlado mediante absorción UV a 260 nm o a menores concentraciones mediante el ensayo de metacromasia de azul de toluidina.

Ejemplo 4: Remoción de la proteína priónica del plasma.

Remoción de la proteína priónica rogue.

5 1. Se agregaron 100 µl de perlas superparamagnéticas preparadas recubiertas con polisulfato de pentosano a una de dos alícuotas de plasma humano recientemente preparadas que tienen incorporado PrP^{Sc}. Ambas alícuotas fueron incubadas con movimiento de balanceo durante una hora a temperatura ambiente.

2. Se removieron luego las perlas de la alícuota de plasma con la incorporación mediante captura magnética. Este sobrenadante, junto con la alícuota de plasma restante fueron luego analizados por la presencia de la proteína priónica rogue.

Prueba de las alícuotas con la incorporación para la proteína priónica rogue.

10 1. Las dos alícuotas de plasma fueron tratadas con la proteínasa K bajo condiciones que han demostrado digerir la proteína priónica normal pero dejan intacta la proteína rogue. Estas condiciones se determinan fácilmente de manera empírica. Las muestras tratadas con la proteínasa K fueron luego analizadas por la presencia de la proteína priónica rogue usando el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad basado en inmunología.

Resultados

15 Después de efectuar la inmunodetección en el ensayo de Platelia^{MR} con base en placas de micropozos, se midió la señal en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de ELISA. La proteína priónica rogue se pueden detectar fácilmente en la muestra de suero con la incorporación que no había sido tratada con polisulfato de pentosano. Por el contrario, la muestra tratada con polisulfato de pentosano no produjo señal en el ensayo demostrando que no quedaba proteína priónica rogue detectable en esta muestra.

20 Discusión

Este experimento demuestra que el polisulfato de pentosano se puede usar para remover efectivamente la proteína priónica rogue de las muestras de interés.

Ejemplo 5: Investigación de las condiciones detergentes que permiten el enlazamiento específico de polisulfato de pentosano a la proteína priónica rogue.

25 Introducción

Se conjugó la biotina con polisulfato de pentosano usando métodos químicos estándar. El polisulfato de pentosano biotinilado se usó para recubrir las perlas superparamagnéticas con derivados de estreptavidina. Las perlas recubiertas se usaron luego para establecer condiciones detergentes bajo las cuales se puede enlazar el polisulfato de pentosano a la proteína priónica rogue pero no a la proteína priónica celular normal.

30 Método

Preparación de perlas magnéticas recubiertas con polisulfato de pentosano.

1. Se lavaron 600 µl de perlas superparamagnéticas de estreptavidina (Sigma Aldrich Company Ltd., S-2415) mediante captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, PH 7.5).

35 2. Se resuspendieron finalmente las perlas en 540 µl de TBS, albúmina bovina al 5% (p/v) (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) y se agregaron 60 µl de 10 mg/ml de polisulfato de pentosano biotinilado en TBS. Se incubaron las perlas a temperatura ambiente por 1 hora con movimiento de balanceo suave para permitir que el polisulfato de pentosano recubriera las perlas.

40 3. Después de recubrir las perlas, se lavaron por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de solución reguladora de fosfato 50 mM pH 8,4, BSA al 5% (p/v) y finalmente se resuspendieron en 60 µl de la misma solución reguladora. Las perlas estuvieron listas entonces para uso.

Preparación de los homogeneizados de cerebro.

1. Se agregaron muestras de 300-500 mg de tejido de cerebro de bovino normal e infectado con BSE a los tubos de trituración que contenían perlas de trituración como las suministradas en el kit de purificación de BSE (Bio-Rad). El líquido originalmente suministrado en estos tubos en el kit fue aspirado y descartado antes del uso.

2. Se añadió un volumen de NaCl 150 mM que fue calculado para generar un homogeneizado de cerebro al 50% (p/v) después de homogeneización, a cada tubo.

3. Los tubos se homogeneizaron por 45 segundos a una velocidad ajustada en 6.5 en un Ribolyzer (adquirido a Bio-Rad).

4. Los homogeneizados se diluyeron 5 veces con BSA al 5% (p/v), solución reguladora de fosfato 50 mM pH 8,4.

5 5. Se colocaron alícuotas de un volumen de 45 µl de cada homogeneizado en tubos por separado.

6. Se agregaron 5 µl de SDS al 20% (p/v) (dodecil sulfato de sodio) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) a cada tubo y se mezclaron completamente.

7. Se agregaron luego 450 µl de BSA al 5% (p/v), solución reguladora de fosfato 50 mM pH 8,4 a cada alícuota y se mezclaron.

10 8. Se agregaron luego 50 µl de N-lauroilsarcosina (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) a diversas concentraciones de detergente a diferentes alícuotas y se mezclaron. A un grupo (un cerebro infectado con BSE y un cerebro no infectado) no se le había añadido N-lauroilsarcosina.

Captura de proteína priónica

15 1. Se agregaron 10 µl de perlas superparamagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosano preparado a cada homogeneizado de cerebro diluido y se incubaron con movimiento de balanceo por una hora a temperatura ambiente.

2. Luego se lavó cada reacción por captura magnética con tres volúmenes de 100 µl de TBS.

Elución de la proteína priónica e inmunodetección.

1. Las perlas de cada reacción se resuspendieron en 10 µl de C1 (suministrado con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad).

20 2. Se agregaron 5 µl de SDS al 0,2% (p/v) a cada suspensión de perlas y se mezclaron.

3. Se agregaron 5 µl de tiocianato de guanidina 1 M (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) a cada suspensión de perlas y se mezclaron.

4. Se calentó la reacción a 100°C por 5 minutos.

5. Se agregaron luego 100 µl de R6 (suministrado con un kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad) y se mezcló.

25 6. Se usaron luego 100 µl de cada eluato en el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad usando el protocolo y reactivos suministrados con este kit. En resumen, este kit involucra la inmunocaptura de la proteína priónica normal y/o rogue y la inmunodetección con un anticuerpo conjugado de peroxidasa de rábano picante.

Resultados

30 Después de efectuar la inmunodetección en el ensayo Platelia^{MR} basado en placas e microtitulación, se midió la señal en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de ELISA.

Concentración final de N-lauroilsarcosina en el regulador de captura de las perlas	Cerebro de bovino usado	DO450
2%	Cerebro infectado con BSE	0,52
2%	Cerebro normal	0,14
1%	Cerebro infectado con BSE	0,33
1%	Cerebro normal	0,13
0,5%	Cerebro infectado con BSE	0,45

0,5%	Cerebro normal	0,13
0,2%	Cerebro infectado con BSE	0,41
0,2%	Cerebro normal	0,09
0%	Cerebro infectado con BSE	0,24
0%	Cerebro normal	0,86

5 En todas las concentraciones de N-lauroilsarcosina había una discriminación entre el cerebro infectado con ESE y el normal. N-lauroilsarcosina al 0,2% fue la mejor concentración de detergente y permitió que el polisulfato de pentosano se enlazara y capturara la proteína priónica rogue sin enlazarse o capturar la proteína priónica normal. En ausencia de N-lauroilsarcosina, aunque estaba presente el detergente SDS, no hubo discriminación del enlazamiento de polisulfato de pentosano con la proteína priónica rogue y la normal. Bajo estas condiciones, el polisulfato de pentosano se enlazó tanto a la proteína priónica normal como a la rogue.

Discusión

10 1. La especificidad del enlazamiento del polisulfato de pentosano a la proteína priónica rogue bajo estas condiciones de prueba específicas depende de la presencia de N-lauroilsarcosina o detergentes similares. Sin este detergente, el polisulfato de pentosano se enlaza tanto a la proteína priónica normal como a la rogue.

Ejemplo 6: Investigación de las condiciones de pH que permiten el enlazamiento específico del polisulfato de pentosano a la proteína priónica rogue

Introducción

15 La biotina se conjugó al polisulfato de pentosano usando métodos de química estándar. Se usó el polisulfato de pentosano biotinilado para recubrir las perlas superparamagnéticas que forman derivados de estreptavidina. Las perlas recubiertas se usaron luego para establecer condiciones de pH bajo las cuales el polisulfato de pentosano podría enlazarse a la proteína priónica rogue, pero no a la proteína priónica celular normal.

Método

20 Preparación de las perlas magnéticas recubiertas de polisulfato de pentosano.

1. Se lavaron alícuotas de 1 ml de perlas superparamagnéticas de estreptavidina (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5).
- 25 2. Cada alícuota de perlas fue finalmente resuspendida en 1 ml de albúmina de suero de bovino (BSA) en TBS al 5% (p/v) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906), y se agregaron 100 µl de 10 mg/ml de polisulfato de pentosano biotinilado en TBS. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con movimiento de balanceo suave para permitir que el polisulfato de pentosano recubriera las perlas.
3. Después del recubrimiento, se lavó cada alícuota de perlas por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de BSA al 5% (p/v), solución reguladora Tris 50 mM pH 8,4.
- 30 4. Se resuspendieron luego alícuotas de perlas en soluciones reguladoras de pH 5,7, 7,5, 8,4 y 9,6 todas con un contenido de BSA al 5% (p/v).

Preparación de homogeneizados de cerebro en soluciones reguladoras de varios pH

1. Se agregaron muestras de 300-500 mg de tejido de cerebro de bovino normal e infectado con BSE a los tubos de trituración que contenían perlas de trituración como las suministradas en el kit de purificación de BSE (Bio-Rad). El líquido originalmente suministrado en estos tubos en el kit fue aspirado y descartado antes del uso.
- 35 2. Se añadió un volumen de NaCl 150 mM que fue calculado para generar un homogeneizado de cerebro al 50% (p/v) después de homogeneización, a cada tubo.

3. Los tubos se homogeneizaron por 45 segundos a una velocidad ajustada en 6.5 en un Ribolyzer (adquirido a Bio-Rad).
4. Se diluyeron 5 veces 50 µl de cada homogeneizado en soluciones reguladoras de pH 5,7, 7,5, 8,4 y 9,6 que contenían todas BSA al 5% (p/v).
5. Se colocaron alícuotas de un volumen de 45 µl de cada homogeneizado diluido en tubos por separado.
- 5 6. Se agregaron 5 µl de SDS al 20% (p/v) (dodecil sulfato de sodio) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) a cada tubo y se mezclaron completamente.
7. Se agregaron luego 450 µl de solución reguladora del mismo pH que la solución reguladora de la dilución inicial que contenía albúmina de bovino al 5% (p/v) a cada alícuota y se mezclaron.
8. Se agregaron luego 50 µl de N-lauroilsarcosina al 20% (p/v) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) y se mezclaron.
- 10 Captura con perlas de los homogeneizados de cerebro
 1. Se agregaron 10 µl de perlas preparadas superparamagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosano en solución reguladora del correspondiente pH a cada homogeneizado de cerebro diluido, y se incubó con movimiento de balanceo durante 1 hora a temperatura ambiente.
 2. Cada reacción se lavó luego por captura magnética con 3 volúmenes de 100 µl de TBS.
- 15 Elución de la proteína priónica rogue e inmunodetección.
 1. Se resuspendieron las perlas de cada reacción en 10 µl de C1 (suministrado con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad).
 2. Se agregaron 5 µl de SDS al 0,2% (p/v) a cada suspensión de perlas y se mezcló.
 - 20 3. Se agregaron 5 ml de tiocianato de guanidina 1 M (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) a cada suspensión de perlas y se mezcló.
 4. Se calentó la reacción a 100°C durante 5 minutos.
 5. Se agregaron luego 100 µl de R6 (suministrado con el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad) y se mezcló.
 6. Se usaron luego 100 µl de cada eluato en el kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad usando el protocolo y los reactivos suministrados con este kit. Brevemente, este kit involucra inmunocaptura de la proteína priónica rogue y/o normal y la inmunodetección con un anticuerpo conjugado de peroxidasa de rábano picante.
- 25

Resultados

Después de realizar la inmunodetección en el ensayo Platelia^{MR} con base en la placa de microtitulación, se midió la señal en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de ELISA.

Regulador de pH usado	Cerebro de bovino usado	DO450
5,7	Cerebro infectado con BSE	0,79
5,7	Cerebro normal	0,30
7,5	Cerebro infectado con BSE	1,57
7,5	Cerebro normal	1,25
8,4	Cerebro infectado con BSE	0,42
8,4	Cerebro normal	0,04

Regulador de pH usado	Cerebro de bovino usado	DO450
9,6	Cerebro infectado con BSE	0,08
9,6	Cerebro normal	0,04

5 A un pH de 7,5 y menor, las perlas recubiertas de polisulfato de pentosano podrán enlazarse tanto a la proteína normal como rogue. A pH de 9,6 y superiores, las perlas recubiertas de polisulfato de pentosano no podrán enlazarse a ambas formas de la proteína priónica. A un pH de 8,4, las perlas recubiertas con polisulfato de pentosano capturaron la proteína priónica rogue, pero no capturaron la proteína priónica normal. A este pH, el polisulfato de pentosano muestra una especificidad para enlazarse a la proteína priónica rogue.

Discusión

10 La especificidad de enlazamiento bajo las condiciones del ensayo del polisulfato de pentosano con la proteína priónica rogue depende del pH. A pH 8,4, el polisulfato de pentosano se enlaza a la proteína priónica rogue pero no puede enlazarse a la proteína priónica normal. A pH de 7,5 y menores, tanto la proteína priónica rogue como la normal se enlazan, mientras que a pH de 9,6 y superiores, no hay enlazamiento de la proteína priónica rogue o normal. Por lo tanto, para enlazamiento específico de polisulfato de pentosano a la proteína priónica rogue bajo estas condiciones, deberá usarse un pH cercano al 8,4.

15 Ejemplo 7: Demostración de la captura específica de PrP^{res} (PrP^{Sc}) a un ligando polianiónico de alta densidad de carga usando polianiones competidores de menor densidad de carga para inhibir selectivamente el enlazamiento de PrP^C

Antecedentes

20 PrP puede ser enlazado a polianiones inmovilizados. En ausencia de polianiones competidores en la solución reguladora de captura, se capturan tanto PrP^{res} como PrP^C. La especificidad para la captura de PrP^{res} puede lograrse mediante la inclusión en la solución reguladora de captura de un polianión de una densidad de carga más baja que el polianión de captura. En este ejemplo, se usa sulfato de dextrano como el polianión de captura de alta densidad de carga y N-lauroil sarcosina (que forma micelas de detergente multimoleculares) y se usan polisulfato de pentosano o fucoidano como los polianiones competidores de densidad de carga más débil.

Método

25 1. Se recubrieron pozos de microtitulación Maxisorp con sulfato de dextrano (peso molecular de 500.000) siguiendo procedimientos estándar.

2. Se agregaron 100 µl de homogeneizado de cerebro que contenía 1 mg de cerebro, Tris 50 mM pH 8,3, BSA al 1% (p/v), Triton X-100 al 1% (v/v), a los pozos recubiertos. En algunos casos, esta solución reguladora de captura también contenía ya sea N-lauroil sarcosina al 1% (p/v), fucoidano, sulfato de dextrano o varias concentraciones de polisulfato de pentosano.

30 3. Después de la incubación durante 2 horas para permitir la captura de la proteína priónica, se lavaron los pozos 3 veces con Tris 50 mM pH 8,3, BSA al 1% (p/v), Triton X-100 al 1% (v/v).

4. Se lavaron luego los pozos 3 veces con PBS.

5. Se agregaron 100 µl de tiocianato de guanidina 5 M a cada pozo y se incubó 5 minutos a 4°C.

6. Se lavaron los pozos 3 veces con PBS y luego la proteína priónica capturada detectada con el conjugado de antiproteína priónica del kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad de acuerdo con el protocolo del kit.

35 7. Se midió la señal desarrollada en un lector de ELISA con DO450.

Resultados

Polianión competidor usado	Cerebro normal o infectado con BSE	DO450
Ninguno	Infectado con BSE	0,10
Ninguno	Normal	0,15
N-lauroil sarcosina al 1% (p/v)	Infectado con BSE	0,95

Polianión competidor usado	Cerebro normal o infectado con BSE	DO450
N-lauroil sarcosina al 1% (p/v)	Normal	0,03
1 mg/ml de polisulfato de pentosano	Infectado con BSE	0,26
1 mg/ml de polisulfato de pentosano	Normal	0,03
0,1 mg/ml de polisulfato de pentosano	Infectado con BSE	0,14
0,1 mg/ml de polisulfato de pentosano	Normal	0,07
1 mg/ml de fucoidano	Infectado con BSE	0,13
1 mg/ml de fucoidano	Normal	0,03
1 mg/ml de sulfato de dextrano	Infectado con BSE	0,02
1 mg/ml de sulfato de dextrano	Normal	0,03

Discusión

5 En ausencia de polianión competidor en la solución reguladora de captura, la señal completa es menor y no hay diferencia en la señal del cerebro normal o infectado, es decir, no hay captura específica de PrP^{res}. La señal del cerebro infectado, sin embargo, se incrementa mediante la inclusión de un polianión competidor en la solución reguladora de captura y se suprime la señal del correspondiente cerebro normal o no infectado. En este ejemplo, la mejor diferenciación entre el cerebro normal y el infectado se logra mediante el uso de la N-lauroil sarcosina al 1% (p/v) en la solución reguladora de captura. Además, puede lograrse una diferenciación entre el cerebro normal y el infectado con fucoidano o polisulfato de pentosano. Con polisulfato de pentosano, puede incrementarse la diferenciación al incrementar la concentración del polianión competidor, polisulfato de pentosano, en la solución reguladora de captura de 0,1 hasta 1 mg/ml. Como el control, si se incluye sulfato de dextrano en la solución reguladora de captura, la señal, como se espera, se reduce a fondo a medida que compite e inhibe el enlazamiento del PrP al sulfato de dextrano inmovilizado.

Ejemplo 8: Demostración de captura específica de PrP^{res} con una superficie recubierta de polianión de alta densidad de carga

15 Antecedentes

En este experimento se demostró que el PrP^{res} podría ser capturado específicamente con una superficie polianiónica. En este caso, la superficie contaba con poliestireno de anhídrido maleico que forma derivados. Se usaron pozos Polisorp y Maxisorp como controles. En otros experimentos, se ha demostrado que estas superficies sin carga pueden formar derivados con sulfato de dextrano polianiónico y pueden luego enlazar PrP^{res}.

20 Método

1. Se formaron derivados de pozos de microplaca de poliestireno activado con anhídrido maleico (Perbio Science UK Ltd., Cheshire) con BSA al 5% (p/v) en TBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Esto genera una superficie cargada con carboxilo sobre el plástico (véase la literatura del producto). Como controles no cargados, se investigaron también los pozos Polisorp y Maxisorp (Nunc). Además, también se recubrieron pozos Maxisorp con un ligando de sulfato de dextrano polianiónico usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

2. Se agregaron a los pozos 100 µl de homogeneizados de cerebro que contenían 1 mg de cerebro infectado o no infectado en Tris 50 mM pH 8,3, BSA al 1% (p/v), Triton X-100 al 1% (v/v), N-lauroil sarcosina al 1% (p/v).

3. Después de incubación durante 2 horas para permitir la captura de priones, se lavaron los pozos 3 veces con Tris 50 mM pH 8,3, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v).

30 4. Se lavaron luego los pozos 3 veces con PBS.

5. Se agregaron 100 µl de tiocianato de guanidina 5 M a cada pozo y se incubó durante 5 minutos a 4°C.

6. Se lavaron los pozos 3 veces con PBS y luego se detectó el príon capturado con el conjugado anti-príon del kit de detección de BSE Platelia^{MR} de Bio-Rad de acuerdo con el protocolo del kit.

7. Se midió la señal desarrollada en un lector de ELISA a DO450.

35 Resultados

Tipo de pozos usados	Cerebro normal o infectado con BSE	DO450
Aniónico	Infectado con BSE	0,2
Aniónico	Normal	0,03

Tipo de pozos usados	Cerebro normal o infectado con BSE	DO450
Polisorp	Infectado con BSE	0,05
Polisorp	Normal	0,03
Maxisorp	Infectado con BSE	0,02
Maxisorp	Normal	0,02
Maxisorp recubierto con sulfato de dextrano	Infectado con BSE	1,0
Maxisorp recubierto con sulfato de dextrano	Normal	0,02

Discusión

La superficie de poliestireno aniónica, bajo las condiciones usadas en este experimento, capturó específicamente PrP^{res}. El plástico no cargado no tuvo este efecto, a menos que hubiera sido recubierto con un ligando polianiónico.

5 Ejemplo 9: Estudio de los efectos de la dilución de una muestra de cerebro positiva en una muestra negativa

Material

Muestra positiva: Una suspensión al 25% de homogeneizado de cerebro que se sabe que es positiva para PrP^{Sc}

Muestra negativa: Una suspensión al 25% de homogeneizado de cerebro que se sabe que es negativa para PrP^{Sc}

Preparación

10 Se recubrieron placas Maxisorb de acuerdo con el siguiente protocolo de recubrimiento. Se recubrieron las placas con 1 mg de Polibreno en solución reguladora de carbonato a pH 7,4 y se dejó durante la noche, se lavó 3 veces con PBS. Se recubrieron luego las placas con 1 mg de sulfato de dextrano en PBS. Después de 6 horas, se lavaron las placas 3 veces con PBS, luego se bloquearon con BSA al 5% mediante la adición de 400 µl de solución de BSA al 5% y se dejaron así durante 30 minutos. Se lavaron luego las placas 3 veces con PBS y se permitió que se secaran.

15 Preparación de la muestra

Preparación de la dilución de la muestra en cerebro negativo

Muestra	Método
+ve pura	40 µl de muestra +ve
1/5	8 µl de muestra +ve + 32 µl de muestra -ve
1/10	5 µl de muestra +ve + 45 µl de muestra -ve
1/100	6 µl de (muestra +ve diluida 1/10) + 54 µl de muestra -ve
1/250	20 µl de (muestra +ve diluida 1/100) + 30 µl de muestra -ve
1/1000	10 µl de (muestra +ve diluida 1/250) + 30 µl de muestra -ve
-ve pura	25 µl de muestra -ve

Preparación de la dilución de la muestra en agua

Muestra	Método
+ve pura	40 µl de muestra +ve
1/5	8 µl de muestra +ve + 32 µl de H ₂ O
1/10	5 µl de muestra +ve + 45 µl de H ₂ O
1/100	6 µl de (muestra +ve diluida 1/10) + 54 µl H ₂ O
1/250	20 µl de (muestra +ve diluida 1/100) + 30 µl de H ₂ O
1/1000	10 µl de (muestra +ve diluida 1/250) + 30 µl de H ₂ O

20 Preparación de la muestra antes de correrla en el ensayo

Se mezclaron 40 µl de la muestra con 60 µl de H₂O y 25 µl de solución reguladora de captura, Tris 250 mM pH 8,4, BSA al 5%, Triton X-100 al 5%, Sarkosyl al 5%, 1,25 mg/ml de tripsina.

Los ensayos se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo de ensayo:

ES 2 564 293 T3

1. Agregar 100 µl de la muestra a la placa e incubar a temperatura ambiente durante 120 minutos.
2. Lavar 3 veces con Tris 50 mM pH 8,4 + Sarkosyl al 1% y 3 veces con PBS.
3. Agregar 100 µl de GuSCN 4 M en PEG al 20% e incubar durante 10 minutos a 2-8°C.
4. Lavar 3 veces con PBS.
5. Agregar 100 µl de conjugado de anticuerpo de enzima Platelia^{MR} de Bio-Rad e incubar a 2-8°C durante 60 minutos.
6. Lavar 5 veces con lavado Platelia^{MR} de Bio-Rad.
7. Agregar 100 µl de sustrato Platelia^{MR} de Bio-Rad e incubar durante 30 minutos en la oscuridad.
8. Agregar 100 µl de solución de detención Platelia^{MR} de Bio-Rad y leer.

Diseño de la placa

	1	1
A	+ve pura	1/10 en H ₂ O
B	1/5 en cerebro negativo	1/100 en H ₂ O
C	1/10 en cerebro negativo	1/250 en H ₂ O
D	1/100 en cerebro negativo	1/1000 en H ₂ O
E	1/250 en cerebro negativo	
F	1/1000 en cerebro negativo	
G	-ve pura	
H	1/5 en H ₂ O	

10

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Dilución de 10 mg de cerebro

homogeneizado en cerebro -ve.

Etiqueta de la muestra	mg de cerebro -ve	mg de cerebro +ve	Factor de dilución	OD
+ve pura	0.00	10.00	1	4
1/5	8.00	2.00	5	1,992
1/10	9.00	1.00	10	1,252
1/100	9.90	0.10	100	0,175
1/250	9.96	0.04	250	0,077
1/1000	9.99	0.01	1000	0,039
-ve pura	10.00	0.00	0	0,021

15

Dilución de 10 mg de homogeneizado de cerebro en H₂O

Etiqueta de la muestra	mg de cerebro -ve	mg de cerebro +ve	Factor de dilución	OD
+ve pura	0,00	10,00	1	4
1/5	0,00	2,00	5	2,377
1/10	0,00	1,00	10	1,395
1/100	0,00	0,10	100	0,145
1/250	0,00	0,04	250	0,053
1/1000	0,00	0,01	1000	0,016

Resumen

	DO	
mg de cerebro +ve	Diluido en cerebro -ve	Diluido en H ₂ O
10,00	4	4

mg de cerebro +ve	DO	
	Diluido en cerebro -ve	Diluido en H ₂ O
2,00	1,992	2,377
1,00	1,252	1,395
0,10	0,175	0,145
0,04	0,077	0,053
0,01	0,039	0,016
0,00	0,021	-----

Estos resultados se presentan gráficamente en la Figura 1, que muestra las curvas de dilución para la dilución de cerebro positivo respectivamente con cerebro negativo y agua. Las dos curvas son esencialmente iguales, demostrando que la presencia de material de cerebro negativo no interfiere con el ensayo.

5 Ejemplo 10: Captura de la proteína tau agregada en cerebro con Alzheimer y controles normales agrupados por edad

10 Se ha mostrado que, bajo condiciones definidas, varios agentes de captura selectivos son específicos para la captura de proteína priónica patógena agregada de tal manera que no se captura el prión no agregado normal. La proteína priónica agregada tiene una estructura de lámina de pliegues beta, mientras que el prión normal es principalmente de estructura de hélice alfa. Este ejemplo demuestra que otras proteínas de lámina de pliegues beta agregadas, tales como los agregados tau que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer, pueden ser selectivamente capturados en forma similar.

Método

1. Se prepararon homogeneizados al 25% (p/v) de cerebros con Alzheimer y de control agrupados por edad, en agua destilada.
- 15 2. Se llevaron 4 µl de cerebro hasta 100 µl en solución reguladora de captura (Tris 50 mM pH 8,4, Triton X-100 al 1% (v/v), N-lauroil sarcosina al 1% (p/v), BSA al 1% (p/v)).
3. Se llevaron 25 µl de cerebro hasta 100 µl en solución reguladora de captura que contenía 25 µg de Tripsina.
4. Se agregaron alícuotas por duplicado de 100 µl de cerebro preparadas como en las etapas 2 y 3 anteriores, a pozos de microtitulación recubiertos con sulfato de dextrano y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Se lavaron luego los pozos tres veces con Tris 50 mM pH 8,4, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v).
- 20 6. Se incubaron las muestras con un anticuerpo monoclonal anti-tau en Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
8. Se detectó el anticuerpo primario inmovilizado con un conjugado de peroxidasa de rábano picante - IgG antirratón de acuerdo con procedimientos estándar.

Resultados

25 Resultados con el anticuerpo anti-tau

Cerebro	1 mg de cerebro sin tripsina	10 mg de cerebro con tripsina
1 de Alzheimer	1,32	1,26
2 de Alzheimer	0,85	0,62
Control 1	0,56	0,20
Control 2	0,97	0,51

Discusión

30 Se sabe que los cerebros de la mayoría de los individuos de edad contienen tau agregado, pero en la enfermedad de Alzheimer hay más de estos agregados que en los controles agrupados por edad. Aquí, el agente de captura selectivo captura estos agregados. En este ejemplo, la digestión de tripsina reduce el enlazamiento de la proteína y reduce la señal, pero, bajo estas condiciones, no la reduce completamente. La relación de señal después del tratamiento con tripsina con respecto a la señal sin tratamiento fue mucho mayor en los cerebros de Alzheimer que en los controles. Esto sugiere que

hay más agregados resistentes a la proteasa de la proteína tau en el cerebro de Alzheimer en comparación con los controles agrupados por edad.

Ejemplo 11: El efecto de la valoración de tripsina en muestras positivas para PrP^{Sc}

Método

5 Placa recubierta de sulfato de dextrano:

Se colocó 1 mg de bromuro de hexadimetrina (Polibreno) (100 µl de 10 mg/ml en solución reguladora de carbonato pH 7,4) en placas Maxisorb y se dejó durante la noche a temperatura ambiente.

Cada placa se lavó entonces 3 veces con PBS y se recubrió con 1 mg de sulfato de dextrano (PM 500.000) (patrón de 10 mg/ml en solución reguladora Tris pH 8,6) y se dejó a temperatura ambiente durante 4 horas.

10 Las placas se lavaron entonces 3 veces con PBS y luego se bloquearon con 300 µl de solución de BSA al 5% en TBS y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Las placas se lavaron luego 3 veces con PBS.

Regulador de captura

Solución reguladora Tris 250 mM a pH 8,4 que contenía BSA al 5%, Sarkosyl al 5%, Triton al 5%.

15 Muestra

Se trataron cerebros BI63 y SV10 débil y fuertemente positivos (homogeneizados al 25%) de la siguiente forma, para proporcionar muestras para ensayo.

25 µl de homogeneizado de cerebro + 25 µl de solución reguladora de captura, Tris 250 mM pH 8,4, BSA al 5%, Triton X-100 al 5%, Sarkosyl al 5%, + 65 µl de H₂O.

20 A esta muestra se le agregaron 10 µl de varias concentraciones de tripsina.

Solución reguladora de lavado

Tris 50 mM pH 8,4 + Sarkosyl al 1%

Método

Protocolo de ensayo

25 1. Agregar 100 µl de muestra a la placa y e incubar a temperatura ambiente durante 120 minutos.

2. Lavar 3 veces con Tris 50 mM pH 8,4 + Sarkosyl al 1% y 3 veces con PBS.

3. Agregar 100 µl de GuSCN 4 M (en PEG al 20%) y se incuba durante 10 minutos a 2-8°C.

4. Lavar 3 veces con PBS.

5. Agregar 100 µl de conjugado de anticuerpo de enzima Platelia^{MR} de Bio-Rad e incubar a 2-8°C durante 60 minutos.

30 6. Lavar 5 veces con lavado Platelia^{MR} de Bio-Rad.

7. Agregar 100 µl de sustrato Platelia^{MR} de Bio-Rad e incubar durante 30 minutos en la oscuridad.

8. Agregar 100 µl de solución de detención Platelia^{MR} de Bio-Rad y leer.

Resultados

5 mg de cerebro Bi63 positivo

Tripsina (1µg)	DO
1000	0,135
100	0,14
25	0,169
10	0,173
1	0,068
0	0,068

5 mg de cerebro SV10 positivo

Tripsina (1µg)	DO
25	2,858
0	0,894

5 Conclusión

La presencia de tripsina parece haber aumentado la señal. También parece que se puede usar un amplio intervalo de concentración de tripsina sin un efecto perjudicial sobre el ensayo.

Ejemplo 12: Demostración del enlazamiento específico de PrP^{Sc} por policonaciones

Método

- 10 Este ejemplo demuestra el uso de varias policonaciones para la captura específica de PrP^{Sc}. Los ligandos se recubrieron ya sea pasivamente en microplacas de poliestireno o se recubrieron activamente (es decir, se enlazaron), según sea apropiado, sobre placas de anhídrido maleico.

Inmovilización del agente de enlazamiento selectivo

- 15 Todos los agentes de enlazamiento selectivo se inmovilizaron durante la noche a 16-25°C en solución reguladora de carbonato 50 mM pH 9,6 a una concentración de 10 µg/ml. Después de la inmovilización, se lavaron los pozos 3 veces con PBS y luego se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en PBS durante 30 minutos. Después del bloqueo, se lavaron los pozos 2 veces con PBS antes de usarse. Se colocaron el dendrímero Starbust PAMA, poli L-lisina y polietilenimina tanto sobre microplacas Maxisorp como microplacas de anhídrido maleico, mientras se colocaron el polibreno y pDADMAC solo en placas Maxisorp.

20 Captura de PrP^{Sc}

1. Se homogeneizaron cerebros de bovino no infectados y de bovino infectados con BSE en agua destilada de acuerdo con los protocolos definidos comercialmente.
2. Se capturaron 0,5 mg del cerebro homogeneizado en pozos recubiertos con ligando en un volumen total de 100 µl de Tris 50 mM pH 8,3, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v), Triton X-100 al 1% (v/v), BSA al 1% (p/v), 0,5 mg/ml de tripsina (páncreas porcino).
- 25 3. Después de captura durante 2 horas a 18-25°C, se lavaron los pozos 3 veces con Tris 50 mM pH 8,3, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v).
4. Se lavaron luego los pozos 3 veces con PBS y se incubaron durante 10 minutos con 100 ml de tiocianato de guanidina 4 M, PEG 8000 al 20% a 4-8°C.
- 30 5. Se lavaron los pozos 3 veces con PBS y luego se incubaron con un conjugado de peroxidasa de rábano picante anticuerpo monoclonal anti-prión.
6. Después de 60 minutos, se lavaron los pozos 5 veces con Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS, y se agregaron 100 µl de sustrato TMB.
7. Después de 30 minutos se midió la DO450 de cada reacción y se registró (ver tabla a continuación).

Resultados

Agente de enlazamiento	Adsorción pasiva		Adsorción activa	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Dendrímero Starbust PAMA	0.938	0.030	0.097	0.026
Polibreno	0.019	0.016	ND	ND
Poli L-lisina	0.070	0.017	0.001	0.001
pDADMAC*	1.828	0.037	ND	ND
polietilenimina	0.118	0.030	0.402	0.055
* Aldrich 40903-0-pm 400.000 - 500.000				

Discusión

5 Los policones dendrímero Starbust pDADMAC y PAMA trabajan bien como ligandos específicos de PrP^{Sc} cuando recubren pasivamente microplacas de poliestireno. El pDADMAC trabaja mejor en esta serie de agentes de enlazamiento. La polietilenimina trabaja en algún grado cuando se inmoviliza en microplacas de anhídrido maleico a través de sus grupos amino.

10 Este experimento demuestra que se pueden usar una variedad de policones para capturar específicamente el PrP^{Sc} de cerebro infectado bajo las condiciones dadas de la solución reguladora de captura usada. Estos agentes pueden inmovilizarse pasiva o activamente en las superficies de poliestireno. Otros experimentos han demostrado que la señal máxima de 20 mg de cerebro positivo puede ser lograda en presencia de N-lauroil sarcosina al 1% (p/v) en la solución reguladora de captura; sin N-lauroil sarcosina se reduce la señal. Esto ilustra que los agentes de captura se comportan mejor bajo condiciones definidas de la solución reguladora.

15 Ejemplo 13: Captura de beta amiloide agregado y tau en cerebro con Alzheimer y controles agrupados por edad normales por el agente de enlazamiento policatiónico

Antecedentes

20 El pDADMAC, bajo condiciones definidas, ha demostrado que es específico para la captura de la proteína priónica patogénica agregada; el prión no agregado normal no es capturado. La proteína priónica agregada tiene una estructura extensiva de lámina beta con pliegues, mientras que el prión normal es principalmente de una estructura de hélice alfa. Se postula que el agente de enlazamiento puede reconocer otras proteínas de lámina beta plegada agregadas tales como agregados beta-amiloide y tau que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer. Los experimentos más adelante se realizaron con el fin de investigar esta hipótesis.

Método

1. Se prepararon homogeneizados al 25% (p/v) de Alzheimer y cerebros de control agrupados por edad en agua destilada.
- 25 2. Se elaboró un homogeneizado de cerebro de 80 µl hasta 100 µl en solución reguladora de captura (Tris 50 mM pH 8,4, Triton X-100 al 1% (v/v), N-lauroil sarcosina al 1% (p/v), BSA al 1% (p/v)) y se lo agregó a micropozos recubiertos con policones (formados recubriendo los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40.903-0).
- 30 3. Después de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con Tris 50 mM pH 8,4, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v) y luego se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-tau en Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
4. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
5. Se detectó el anticuerpo primario inmovilizado con un conjugado de peroxidasa de rábano picante IgG antirratón de acuerdo con procedimientos estándar.

35 Resultados

Cerebro	Clasificación por el banco de cerebros	OD450
67/97	Positivo	1,85
73/97	Positivo	0,80
163/97	Positivo	0,61
149/97	Positivo	0,45

Cerebro	Clasificación por el banco de cerebros	OD450
97/97	Negativo	0,05
98/98	Negativo	0,08

Discusión

5 El agente de enlazamiento policatiónico permite la captura de los agregados tau. Cuando se detecta el tau capturado con el anticuerpo anti-tau, los cerebros con enfermedad de Alzheimer producen toda una señal positiva alta, mientras que los cerebros de control negativos producen una señal negativa baja. En conclusión, la captura con un policatiónico bajo las condiciones especificadas puede permitir la diferenciación de cerebros con enfermedad de Alzheimer de aquellos cerebros sin la enfermedad.

Ejemplo 14: Efecto de diferentes proteasas y ADNasa en la inhibición de la matriz de captura de PrP^{Sc} con pDADMAC

Antecedentes

10 Se investigó el efecto de proteasas diferentes sobre la efectividad de la captura de PrP^{Sc} con placas recubiertas con policatiónico (formadas por el recubrimiento de los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC) (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40.903-0).

Método

- 15 1. Se llevaron 80 µl de homogeneizado de cerebro hasta 100 µl mediante la adición de 20 µl de solución reguladora de captura (Tris 250 mM pH 8,3, Triton X-100 al 5% (v/v), N-lauroil sarcosina al 5% (p/v), BSA al 5% (p/v)) que contiene diferentes proteasas y/o ADNasa.
2. Se añadieron luego los homogeneizados a los micropozos recubiertos con policationes.
3. Después de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron los pozos seis veces con PBS.
4. Se agregaron 100 µl de tiocianato de guanidina 4 M, PEG al 20% (p/v) a cada pozo.
- 20 5. Después de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con PBS.
6. Se agregaron 100 µl de conjugado de peroxidasa de rábano picante proteína anti-prión (diluido 1:1500 en Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS y BSA al 5% (p/v)).
7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pozos cinco veces con Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
8. Se detectó el conjugado inmovilizado con solución TMB de acuerdo con los protocolos estándar.

25 Resultados

Evaluación de los efectos de quimotripsina, tripsina, ADNasa y proteinasa K en la solución reguladora de captura

Proteasa o ADNasa usados	Cerebro de bovino infectado
Sin proteasa o ADNasa	0,122
Quimo/Tripsina (concentración de ambos 6,25 mg/ml)	0,139
ADNasa/Tripsina (concentración 1 mg/ml de ADNasa, 6,25 mg/ml de Tripsina)	0,639
Quimo/ADNasa (concentración 1 mg/ml de ADNasa, 6,25 mg/ml de Quimo)	0,616
Quimo/ADNasa/Tripsina (concentración 1 mg/ml de ADNasa, 6,25 mg/ml de Quimo y Tripsina)	0,460
Tripsina (concentración 6,25 mg/ml)	0,568
Quimo (concentración 6,25 mg/ml)	0,171
ADNasa (concentración 1 mg/ml)	0,180
Proteinasa K (concentración 1 mg/ml)	0,531
Pronasa (concentración 1,25 mg/ml)	0,222
Pronasa (concentración 6,25 mg/ml)	0,178

Titulación de concentraciones de tripsina y quimotripsina en solución reguladora de captura

Proteasa usada	Cerebro de bovino infectado
Tripsina 6,25mg/ml	0,732
Tripsina 1,25mg/ml	0,726
Quimo 3,125mg/ml	0,568
Quimo 0,625 mg/ml	0,433

Discusión

5 Se ha demostrado que el ligando policationico bajo ciertas condiciones es específico para enlazarse a PrP^{Sc}. Sin embargo, la señal se puede reducir por los efectos de la matriz derivados de los constituyentes del homogeneizado de cerebro que pueden interferir con el enlazamiento y reducir la señal. Este efecto de la matriz puede reducirse y aumentar la señal del cerebro infectado mediante el uso de proteasas. Este estudio muestra que la tripsina, la quimotripsina y la proteinasa K son efectivos para remover la inhibición de la matriz; la pronasa (a las concentraciones investigadas) es menos efectiva. 10 La tripsina a una concentración de 6,25-1,15 mg/ml es igualmente efectiva, mientras que la quimotripsina es más efectiva a medida que aumenta la concentración. La ADNasa tiene un efecto más pequeño pero demostrable en la remoción de la inhibición de la matriz.

Ejemplo 15: Efecto del pH y la sal en la captura de proteínas príon con pDADMAC

Antecedentes

15 Se investigaron los efectos de la concentración de sal y pH sobre la efectividad de la captura de PrP^{Sc} en placas recubiertas de polication (formadas por recubrimiento de los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catalogo número 40.903-0).

Método

- 20 1. Se llevaron 80 µl de homogeneizado de cerebro hasta 100 µl por la adición de 20 µl de solución reguladora de captura (Tris 250 mM, véase la Tabla para pH, Triton X-100 al 5% (v/v), N-lauroil sarcosina al 5% (p/v), BSA al 5% (p/v) y 6,25 mg/ml de tripsina) que contenía diferentes concentraciones de sal y se investigó el ajuste a diferentes pH.
2. Se añadieron luego los homogeneizados a micropozos recubiertos con policationes.
3. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron los pozos seis veces con PBS.
4. Se agregaron 100 µl de tiocianato de guanidina 4 M, PEG al 20% (p/v), a cada pozo.
5. Después de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con PBS.
- 25 6. Se agregaron 100 µl de conjugado de peroxidasa de rábano picante proteína anti-príon (diluido 1:1500 en Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS y BSA al 5% (p/v)).
7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pozos cinco veces con Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
8. Se detectó el conjugado inmovilizado con solución TMB de acuerdo con los protocolos estándar y se midió la DO450 de las reacciones.

30 Resultados

Efecto del pH

pH de la solución reguladora de captura	Cerebro de bovino infectado	Cerebro e bovino negativo
5	0,177	0,119
6	0,082	0,1
7	0,093	0,045
8,4	0,226	0,039
9	0,24	0,038
10	0,25	0,037

Efecto de la sal

Solución reguladora de captura	Cerebro de bovino infectado	Cerebro de bovino no infectado
NaCl 20 mM	0,476	0,038
NaCl 100 mM	0,361	0,039
NaCl 250 mM	0,191	0,028
NaCl 1 M	0,06	0,024

Discusión

5 A medida que disminuye el pH de la solución reguladora de captura, aumenta la señal del cerebro no infectado, pero disminuye la señal del cerebro infectado. A pH mayores de 8,0, se logra una relación óptima de señal positiva con respecto a negativa.

10 A medida que aumenta la concentración de sal en la solución reguladora de captura, la señal del cerebro infectado disminuye progresivamente. Esto indica que una concentración baja de sal o sin sal es la condición óptima para la captura de PrP^{Sc}

Ejemplo 16: Efecto de diferentes concentraciones de N-lauroil sarcosina y proteasa en la captura de PrP^{Sc} con pDADMAC

Antecedentes

15 Se investigó el efecto de diferentes concentraciones de N-lauroil sarcosina en presencia o ausencia de tripsina, sobre la efectividad de la captura de PrP^{Sc} con placas recubiertas de policatión (formadas por recubrimiento de los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40.903-0).

Método

1. Se llevaron 80 µl de homogeneizado de cerebro infectado hasta 100 µl por la adición de 20 µl de solución reguladora de captura (Tris 250 mM pH 8,3, Triton X-100 al 5% (v/v), BSA al 5% (p/v)) que contenía diferentes concentraciones de proteasa y N-lauroil sarcosina.
- 20 2. Se añadieron luego los homogeneizados a micropozos recubiertos con policationes.
3. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron los pozos seis veces con PBS.
4. Se agregaron 100 µl de tiocianato de guanidina 4 M, PEG al 20% (p/v), a cada pozo.
5. Después de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con PBS.
- 25 6. Se agregaron 100 µl de conjugado de peroxidasa de rábano picante proteína anti-prión (diluido 1:1500 en Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS y BSA al 5% (p/v)).
7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pozos cinco veces con Tween 20 al 0,1% (v/v) en PBS.
8. Se detectó el conjugado inmovilizado con solución TMB de acuerdo con los protocolos estándar.

Resultados

Detergente y proteasa usados en la solución reguladora de captura usado	Concentraciones del agente	DO450
N-lauroil sarcosina Tripsina	0	0,08
	1,25 mg/ml	
N-lauroil sarcosina Tripsina	2,5%	1,181
	1,25 mg/ml	
N-lauroil sarcosina Tripsina	5%	2,267
	1,25 mg/ml	
N-lauroil sarcosina Tripsina	10,0%	2,628
	1,25 mg/ml	

Detergente y proteasa usados en la solución reguladora de captura usado	Concentraciones del agente	DO450
N-lauroil sarcosina Tripsina	0	0,171
	6,25 mg/ml	
N-lauroil sarcosina Tripsina	2,5%	2,384
	6,25 mg/ml	
N-lauroil sarcosina Tripsina	5%	2,725
	6,25 mg/ml	
N-lauroil sarcosina Tripsina	10.0%	2,883
	6,25 mg/ml	

Discusión

En ausencia de N-lauroil sarcosina, no hay señal del cerebro infectado con bajas concentraciones de tripsina. A concentraciones más altas de tripsina, sin embargo, se restaura alguna señal en ausencia de N-lauroil sarcosina.

- 5 Aunque la invención se ha descrito con referencia particular a realizaciones preferidas de la misma, se apreciará que son posibles muchas modificaciones y variaciones de la misma dentro del alcance de las reivindicaciones. Cualquier variación de la invención como se reivindica explícitamente, que operaría en la misma forma para producir el mismo resultado, está dentro de la protección conferida por la solicitud.
- 10 En esta memoria descriptiva, a menos que se indique expresamente otra cosa, la palabra “o” se usa en el sentido de un operador que regresa un valor verdadero cuando alguna o ambas condiciones establecidas se cumplen, en forma opuesta al operador “exclusivo o” que requiere que sólo una de la condiciones se cumpla. La palabra “que comprende” se usa en el sentido de “incluir” en vez de significar “que consiste de”.

Reivindicaciones

- 5 1. Un procedimiento para el enlazamiento selectivo de una forma anormal de agregación de una proteína en presencia de la forma normal de no agregación de la proteína, que comprende poner en contacto bajo condiciones de enlazamiento selectivo un material que contiene tanto dicha forma anormal como normal con un agente de enlazamiento, que es un poliglicósido polianiónico, una poliamina o una polietilenimina, que tiene una avidez de enlazamiento por dicha forma de agregación de dicha proteína que está presente en la muestra.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas condiciones de enlazamiento selectivas incluyen la presencia de un agente de competición en solución, cuyo agente de competición tiene grupos iónicos que tienen una menor avidez de enlazamiento por la forma anormal de la proteína de lo que lo hace el material polianiónico.
- 10 3. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente de enlazamiento es resistente a la proteasa.
4. Un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en el que una proteasa está presente durante dicho enlazamiento o en el que dicha proteína está expuesta a la acción de una proteasa después de ser enlazada.
- 15 5. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que el poliglicósido polianiónico es un poliglicósido polisulfonado.
6. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que el poliglicósido polianiónico es un derivado de pentosano polianiónico o derivado de dextrano.
- 20 7. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que el poliglicósido polisulfonado es polisulfato de pentosano (PPS) o sulfato de dextrano.
8. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que dicho material polianiónico es bromuro de hexadimetrina, dendrímero PAMAM, poli L-lisina, pDADMAC o polietilenimina.
9. Un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en el que el agente de competición tiene una densidad menor de grupos iónicos que el material polianiónico.
- 25 10. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 9, en el que el agente de competición es aniónico.
11. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 10, en el que el agente de competición es un detergente aniónico.
12. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 10, en el que el agente de competición es una amida de aminoácido de un ácido graso.
- 30 13. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 12, en el que el agente de competición es n-lauroilsarcosina.
14. Un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en el que el pH es tal como para promover dicho enlazamiento del agente de enlazamiento con la forma anormal de la proteína.
15. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 14, en el que el pH es 8-9.
- 35 16. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 15, en el que el pH es 8,2 a 8,6.
17. Un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en el que está presente un detergente que promueve el enlazamiento del agente de enlazamiento con la forma anormal de la proteína.
- 40 18. Un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en el que dicho agente de enlazamiento después del enlazamiento con dicha forma anormal agregada de la proteína es capturado con un agente de captura inmovilizado.
19. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 18, en el que dicho agente de captura es una lectina o un reactivo de anticuerpo reactivo con dicho agente de enlazamiento.

20. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 18, en el que dicho agente de enlazamiento cuenta con una fracción de etiqueta que puede ser enlazada selectivamente y dicho agente de captura se enlaza a dicha fracción de etiqueta.
- 5 21. Un procedimiento como el reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el agente de enlazamiento se inmoviliza en un medio sólido antes de la exposición a dicha forma anormal de la proteína.
22. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 21, en el que el medio es un sustrato que tiene dicho agente de enlazamiento recubierto sobre el mismo.
- 10 23. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 21, en el que el agente de enlazamiento cuenta con una fracción de etiqueta que puede ser enlazada selectivamente y se inmoviliza en dicho medio sólido a través de dicha fracción de etiqueta.
24. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 20 o la reivindicación 23, en el que dicha fracción de etiqueta que puede ser enlazada es biotina, fluoresceína, dinitrofenol, digoxigenina, un secuencia de ácido nucleico o análogo de ácido nucleico o (His)₆.
- 15 25. Un procedimiento de ensayo para detectar la presencia de una forma de agregación anormal de una proteína en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento el enlazamiento de dicha proteína de forma anormal de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, seguido por la determinación de la existencia o la cantidad de enlazamiento de la proteína con el agente de enlazamiento.
26. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 25, en el que dicho enlazamiento se determina cualitativa o cuantitativamente mediante la realización de un inmunoensayo para la forma de agregación de la proteína.
- 20 27. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 25 o la reivindicación 26, en el que el enlazamiento de la forma anormal de agregación de la proteína se lleva a cabo de forma selectiva en presencia de la forma normal de no agregación de la proteína y luego se separa la proteína de forma agregada enlazada de la proteína de forma normal no enlazada y, posteriormente, se realiza dicha determinación de la existencia o cantidad de dicho enlazamiento.
- 25 28. Un procedimiento como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en el que dicha forma anormal de una proteína es PrP^{Sc} y dicha forma normal es PrP^C.
29. Un procedimiento para la separación de PrP^{Sc} de PrP^C que comprende enlazar selectivamente PrP^{Sc} con un agente de enlazamiento, que es un poliglicósido polianiónico, una poliamina o una polietilenimina, en presencia de una amida de aminoácido de un ácido graso.
- 30 30. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 29, en el que la amida de aminoácido de un ácido graso es N-lauroilsarcosina.
31. Un procedimiento como el reivindicado en la reivindicación 29 o la reivindicación 30, llevado a cabo a un pH de 8-9.

