

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 609**

51 Int. Cl.:

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>C07K 14/47</b> | (2006.01) |
| <b>B01F 7/00</b>  | (2006.01) |
| <b>B01F 7/28</b>  | (2006.01) |
| <b>B01F 11/02</b> | (2006.01) |
| <b>B01F 13/08</b> | (2006.01) |
| <b>B01F 15/00</b> | (2006.01) |

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2012 PCT/EP2012/052634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12110570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2012 E 12703832 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2675555**

54 Título: **Método para la producción y análisis de priones**

30 Prioridad:

**16.02.2011 EP 11154710**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.02.2018**

73 Titular/es:

**SENOSTIC GMBH (100.0%)  
Wielandstrasse 8  
38124 Braunschweig, DE**

72 Inventor/es:

**LÜHRS, THORSTEN y  
DELUWEIT, FELIX**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 652 609 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

Método para la producción y análisis de priones

## Descripción

5 La presente invención se refiere a un dispositivo y a un método de uso del dispositivo para la producción de conformaciones específicas de partículas de priones o de otras proteínas, que en una conformación específica están asociadas con los depósitos de tipo amiloide. Además, la invención se refiere a una preparación de péptidos, cuyas secuencias de aminoácidos contienen o consisten en la secuencia de aminoácidos de un prion o de otro péptido que forman depósitos de tipo amiloide, caracterizándose la preparación por una conformación esencialmente uniforme de las proteínas. La secuencia de aminoácidos de la proteína priónica puede tener grupos no aminoácidos, p. ej., sustituyentes sacáridos y/o sustituyentes lípidos. Además, la invención se refiere a un procedimiento para el análisis de compuestos, que comprende la etapa de poner en contacto los péptidos que tienen la secuencia de una proteína priónica o de un péptido que forma depósitos de tipo amiloide en una conformación esencialmente homogénea, preferiblemente producido por un método según la invención, con al menos un compuesto, y detectar una interacción del compuesto con el péptido, cuya interacción puede ser, p. ej., una asociación del compuesto con el péptido. En este método de análisis, los péptidos tienen la misma secuencia de aminoácidos y la misma conformación, p. ej., la conformación del estado agregado. En general, los términos proteína priónica y polipéptido o péptido que forma depósitos de tipo amiloide se pueden usar de forma intercambiable, preferiblemente refiriéndose a péptidos de secuencia de aminoácidos natural, cuya proteína o péptidos pueden cambiar su conformación a una conformación de estado agregado, p. ej., en presencia de un plegamiento erróneo o péptido en estado agregado de la misma o de otra secuencia de aminoácidos de proteína priónica. En la conformación de estado agregado de la proteína priónica, los agregados de tipo amiloide forman placas, p. ej., placas como se encuentran en enfermedades que forman placas de tipo amiloide en el tejido cerebral. La proteína priónica de conformación agregada, p. ej., producida por el procedimiento de la invención, también se puede denominar una semilla proteopática cuando tiene actividad biológica, p. ej. infectividad en una especie de mamífero. Las proteínas priónicas ilustrativas son las proteínas que en su conformación de estado agregado causan o están presentes en la encefalopatía espongiiforme ovina en ovejas (proteína priónica), encefalitis espongiiforme bovina en bovinos (proteína priónica), enfermedad de desgaste crónico de ciervos y alces (proteína priónica) y enfermedad de Creutzfeld-Jacob, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (proteína priónica), insomnio familiar fatal en seres humanos (proteína priónica), Alzheimer (beta-amiloide), Parkinson (alfa-sinucleína), diabetes mellitus tipo 2 (amilina), corea de Huntington (huntingtina), carcinoma medular de tiroides (calcitonina), arritmias cardíacas, amiloidosis auricular aislada (factor natriurético atrial), aterosclerosis (apolipoproteína A), artritis reumatoide (suero amiloide A), amiloide medial aórtico (medina), prolactinomas (prolactina), polineuropatía amiloide familiar (transtiretina), amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria (lisoizima), amiloidosis relacionada con la diálisis (beta-2-microglobulina), amiloidosis finlandesa (gelsolina), distrofia reticular corneal (queratoepitelina), angiopatía amiloide cerebral (beta-amiloide), también de tipo islandés (cistatina), amiloidosis AL sistémica (cadena ligera de inmunoglobulina AL), miositis por cuerpos de inclusión esporádica (S-IBM), tauopatías que implican la aglomeración de la proteína tau. La secuencia de aminoácidos de la proteína priónica usada en el procedimiento de la invención puede tener opcionalmente una sección de aminoácidos sintética o natural añadida, p. ej., un marcador detectable.

## Estado de la técnica

40 Castilla et al. en *Methods in Enzymology* 3 - 21 (2006) describen un procedimiento de amplificación cíclico de plegamiento erróneo de proteína, que incluye poner en contacto proteína priónica de conformación natural con una cantidad muy pequeña de proteína mal plegada, que se supone que representa la conformación anómala asociada con la enfermedad, con fraccionamiento intermitente de los agregados generados por ultrasonidos. El análisis de las muestras se llevó a cabo por digestión de una parte alícuota usando la proteinasa K, seguido de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-proteína priónica en una transferencia Western, en donde la conformación anómala asociada con la enfermedad se detecta como secciones de péptidos resistentes a la proteasa, que no se observan en el péptido natural.

50 Saborio et al. en *Nature* 810 - 813 (2001) describen un procedimiento para la amplificación de una proteína priónica infecciosa en la conformación agregada, en donde la proteína priónica de conformación natural se pone en contacto con la proteína priónica en un estado agregado, lo que da como resultado el crecimiento de agregados que comprenden proteínas priónicas tanto de conformación natural como conformación agregada, seguido del tratamiento con ultrasonidos con el fin de alterar los agregados más grandes y una fase de reposo, cuyo procedimiento se realiza en ciclos. La agregación de la proteína priónica de conformación natural con la proteína priónica de conformación agregada da como resultado un aumento de la proteína de conformación agregada, lo cual es causado por un cambio de conformación de la conformación natural a la conformación agregada. El tratamiento con ultrasonidos da como resultado la fragmentación del agregado en un número mayor de proteínas priónicas de conformación agregada, que en una fase de reposo posterior hace que más proteína priónica de conformación natural cambie su conformación al estado agregado. El análisis de la conversión de la conformación natural a la conformación agregada de la proteína priónica era por digestión con proteinasa K, seguido de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-proteína priónica en una transferencia Western. El tratamiento con ultrasonidos se hizo por inmersión de la punta del dispositivo de ultrasonidos en una muestra con una potencia ajustada a 40%, repitiendo

50-40 ciclos de ultrasonidos (5 pulsos, 1 segundo cada uno), con tiempos de incubación intermitentes durante 1 hora a 37°C, con agitación.

5 Castilla et al. en *Nature Medicine* 982 - 985 (2005) desarrollaron más un método de Saborio et al. y describen la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada poniendo en contacto homogeneizado de cerebro que contiene la proteína priónica de conformación natural con homogeneizado de cerebro que contiene proteína priónica asociada a la encefalopatía espongiforme, usando muestras de 20 µl que se sometieron a múltiples ciclos de ultrasonidos e incubación. La detección de la proteína priónica de conformación agregada se hizo mediante transferencia Western de las muestras de homogeneizado de cerebro después de digestión con proteinasa K.

10 Atarashi et al., *Nature Methods* 211, 212 (2008) describen la amplificación de la conformación agregada poniendo en contacto la proteína priónica de conformación natural con un homogeneizado de cerebro que contiene la proteína priónica de conformación agregada, que se podía detectar en transferencias Western como formas resistentes a proteasa, mediante agitación periódica en lugar de someter las muestras a ultrasonidos periódico. La proteína priónica de conformación natural se podía producir por expresión bacteriana. Para promover la formación de la proteína priónica resistente a la proteinasa K, es decir proteína priónica en estado agregado, se encontró que SDS al 0,05-0,1% y Triton X100 al 0,05-0,1% era lo más eficaz para la amplificación de la conformación agregada de la proteína priónica en la proteína priónica de conformación natural.

El documento US2006/0263767 describe un procedimiento para detectar proteína priónica en una muestra, mezclando la muestra con una proteína no patógena y un compuesto quelante y sometiendo la mezcla a ultrasonidos para amplificar la proteína priónica.

20 El documento EP2280028 A1 describe la amplificación de una proteína priónica derivada de la encefalopatía espongiforme ovina por el tratamiento repetido con ultrasonidos en presencia de la proteína priónica normal, p. ej., procedente de roedor.

El documento US2009/0047696 describe que en la amplificación de la proteína priónica resistente a la proteinasa K de una mezcla de proteína priónica normal con proteína semilla influye la presencia de tensioactivos, en concreto SDS o Sarkosyl.

El documento EP 1510246 A2 describe un cilindro giratorio dentro de un cilindro coaxial exterior para generar una fuerza de cizalladura en un líquido con el fin de emulsionar el líquido.

El documento US 2005/0287670 A1 describe un dispositivo para el cultivo de células, comprendiendo el dispositivo un rotor dispuesto dentro de una carcasa cilíndrica, generando la rotación un solo campo de cizalladura uniforme.

30 El documento US 2008/0021327 A1 describe un generador de ultrasonidos controlado que puede comprender un elemento de colocación para el transductor para la unión a un bracket de ortodoncia en el cuerpo de un paciente, y un elemento de colocación para un sensor para la colocación del transductor y el sensor relativo a un cultivo celular.

El documento US2005/0150830 A1 describe un dispositivo para controlar el campo acústico de ultrasonidos, p. ej., para un transductor centrado esféricamente usando la colocación de la fuente de energía sónica o un sistema de colocación para mover el objetivo respecto a la fuente.

El documento US 2003/0078227 se refiere al uso de un generador de ultrasonidos para inducir la transfección de células de mamífero o plantas.

### Objetos de la invención

40 Un objeto de la invención es proporcionar un método alternativo para producir proteína priónica de conformación agregada a partir de proteína priónica de conformación natural, en donde la proteína priónica de conformación agregada preferiblemente es de una conformación uniforme.

### Descripción general de la invención

La invención logra los objetos mencionados antes proporcionando un método para producir proteína priónica que tiene una conformación agregada como se define en las reivindicaciones, y en especial mediante un dispositivo y método que usa el dispositivo, en cuyo método la proteína priónica de conformación natural se pone en contacto con proteína priónica de conformación agregada en una preparación líquida, y se somete a al menos un ciclo o a una serie de ciclos de aplicación de fuerza de cizalladura para fragmentar los agregados de proteína priónica, en donde la fuerza de cizalladura aplicada se controla de forma precisa, p. ej., en un intervalo de 10%, preferiblemente 2%, más preferiblemente 1%, más preferiblemente en un intervalo de intensidad de 0,5% entorno a un valor de intensidad de fuerza de cizalladura, en donde opcionalmente cada ciclo contiene al menos una segunda fase de incubación sin agitación y/o al menos una fase de agitación a un valor de intensidad de la fuerza de cizalladura que es diferente del primer valor de intensidad de la fuerza de cizalladura, que es, p. ej., cero o de 1 a 50%, preferiblemente cero del primer valor de intensidad de la fuerza de cizalladura. La segunda fase de incubación, también denominada una fase de reposo, se incluye para permitir la agregación de la proteína priónica de

conformación natural con la proteína priónica de conformación agregada. Además de este procedimiento para la amplificación de la proteína priónica en estado agregado a partir de la proteína priónica de conformación natural, la invención se refiere a la proteína priónica en estado agregado obtenida por el procedimiento de amplificación, cuya proteína priónica en estado agregado tiene una conformación, que es, p. ej., idéntica dentro de un lote y reproducible entre lotes, p. ej., detectable por la resistencia a proteinasa en una transferencia Western y/o espectroscopía sensible a la estructura, p. ej., por RMN, en especial <sup>13</sup>C-RMN, o espectroscopía de fluorescencia. Opcionalmente, el producto del procedimiento de la invención se puede usar como proteína en conformación agregada que mezclada con la proteína priónica de conformación natural se somete a un último ciclo o a una serie de ciclos de aplicación de fuerza de cizalladura para la fragmentación de agregados de proteína priónica como se describe en la presente memoria.

La proteína priónica de conformación natural se puede producir, p. ej., por expresión en una célula cultivada que se manipula genéticamente para contener un casete de expresión que codifica la proteína priónica, y aislando la proteína priónica de la célula cultivada y/o del medio de un cultivo de células. Las células para la expresión de proteína priónica pueden ser bacterias, preferiblemente *E. coli*, levaduras, hongos, y células de mamíferos, p. ej., células humanas o células CHO de hámster. La proteína priónica de conformación natural también se puede producir a partir de tejido de mamífero.

Durante la preparación de esta invención, se ha encontrado que la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada a partir de una preparación líquida que contiene la proteína priónica de conformación natural y proteína priónica en la conformación agregada usando agitación por ultrasonidos o por sacudida depende del volumen y los rendimientos de la proteína priónica resistente a proteasa son difícilmente reproducibles.

El análisis detallado ha mostrado que la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada usando agitación por ultrasonidos depende de la posición del recipiente de reacción que contiene la preparación líquida con respecto a la superficie del sonotrodo, y también depende de la separación del recipiente de reacción de la superficie del sonotrodo.

En cambio, cuando de acuerdo con la invención se somete una preparación líquida de proteína priónica de conformación natural en contacto con proteína priónica que tiene la conformación de su estado agregado, a una fuerza de cizalladura que es controlada por limitación a una intensidad con una variación o intervalo de como máximo 10%, preferiblemente de 5%, más preferiblemente de 1%, más preferiblemente de 0,5% de la intensidad, cuya fuerza de cizalladura se aplica a cada elemento de volumen de la preparación líquida, se obtiene una generación reproducible de la proteína priónica que tiene la conformación de un estado agregado, preferiblemente que tiene la conformación de un estado agregado específico, con rendimiento reproducible. Preferiblemente, la fuerza de cizalladura transmitida a la preparación líquida consiste en fuerza de cizalladura de intensidad controlada para aplicar una fuerza de cizalladura de solo un intervalo de intensidad limitado a la preparación líquida. Más preferiblemente, esta fuerza de cizalladura de intensidad controlada es de la máxima intensidad transmitida a cada elemento de volumen de la preparación líquida. Cuando se usa la generación de la fuerza de cizalladura por ultrasonidos, el control del intervalo de intensidad limitado preferiblemente se obtiene situando el volumen entero de la preparación líquida a igual distancia entre nodos de vibración predeterminados del dispositivo de ultrasonidos (también denominado un sonotrodo) y a una distancia del dispositivo de ultrasonidos donde se genera la máxima amplitud para una frecuencia, preferiblemente para la frecuencia de resonancia del dispositivo de ultrasonidos. Además, se ha observado que la conformación de la proteína priónica en su conformación en estado agregado puede diferir de su estado natural dependiendo de la intensidad de la fuerza de cizalladura, detectado, p. ej., por la resistencia a la digestión por la proteinasa K, seguido de PAGE (separación de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida), preferiblemente detectado por transferencia Western usando un anticuerpo específico para la proteína priónica para identificar la proteína priónica que es inmovilizada después de PAGE, p. ej., se pueden detectar conformaciones en estado agregado de la proteína priónica que difieren para diferentes fuerzas de cizalladura aplicadas a la proteína priónica de conformación natural.

En general, para los fines de la invención, la conformación natural de una proteína priónica se refiere a la conformación de tipo natural de la proteína, como se observa p. ej. en mamíferos sanos, cuya conformación natural en general es soluble en solución acuosa fisiológica. En cambio, la conformación mal plegada, que está asociada con enfermedades que forman agregados de tipo amiloide en mamíferos, que en general es insoluble en solución acuosa fisiológica, y es p. ej. al menos parcialmente resistente a la degradación proteolítica por enzimas, p. ej. por la proteinasa K, también se denomina la conformación del estado agregado, la conformación agregada y/o la conformación asociada con enfermedad, cuya conformación es transmisible, p. ej. a la conformación natural, y por lo tanto también se considera que representa una conformación transmisora de la enfermedad o infecciosa, p. ej., para la conformación agregada asociada con la enfermedad natural.

De acuerdo con las peculiaridades de las enfermedades asociadas con agregados de tipo amiloide, que implican la formación de la conformación agregada asociada con la enfermedad de la proteína priónica, cuya conformación asociada con la enfermedad se puede formar a partir de la conformación de tipo natural, la generación in vitro de la proteína priónica en su conformación agregada asociada con la enfermedad por incubación de la proteína priónica de conformación natural con proteína priónica en su conformación agregada, también se denomina amplificación, refiriéndose a la amplificación del estado agregado asociado con la enfermedad en la proteína priónica de

conformación natural originalmente. Además, para los fines de la invención, la conformación del estado agregado además de conformaciones agregadas observables en mamíferos, también incluye una conformación agregada que se genera in vitro, y que puede no ser observable en un mamífero que padece una enfermedad asociada con agregados de tipo amiloide. La razón para incluir opcionalmente conformaciones agregadas no naturales de la proteína priónica, es que se ha observado durante la preparación de la invención que se puede generar más de un estado agregado de un péptido homogéneo, es decir, un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, por una amplificación in vitro, inducida por contacto con una preparación de proteína priónica en su estado agregado, p. ej., como se obtiene originalmente del tejido de un mamífero que padece una enfermedad asociada con agregados de tipo amiloide.

10 En general, el estado de la conformación de un péptido individual se refiere a cada péptido individual, es decir, independientemente de la agregación o presencia como péptidos no asociados individuales de proteína priónica, p. ej., en su conformación natural y/o en su conformación agregada.

Se ha encontrado que la aplicación de un intervalo de intensidad grande de fuerza de cizalladura a los agregados que incluyen proteína priónica de conformación agregada puede dar como resultado la generación de diferentes especies de conformación de la proteína priónica que tienen la misma secuencia de aminoácidos, cuyas diferentes especies de conformación se caracterizan p. ej. por tener una resistencia diferente frente a la degradación proteolítica, p. ej., frente a la digestión por proteinasa K. Por ejemplo, la fragmentación por fuerzas de cizalladura generadas por un elemento de rotación dispuesto en un tubo coaxial a velocidades de rotación entre 20 y 1300 Hz (rotaciones por segundo) daba al menos dos fracciones de proteína priónica de conformación agregada que diferían en su resistencia frente a la proteinasa K, mientras que la aplicación de una intensidad de fuerza de cizalladura de intervalo estrecho, p. ej., limitado a un intervalo máximo de 10% o menos de la fuerza de cizalladura máxima, daba como resultado la producción reproducible de proteína priónica de conformación agregada de una y la misma conformación a partir de la proteína priónica de conformación natural, p. ej., con intensidad de fuerza de cizalladura controlada a un intervalo de 10%, preferiblemente 2%, más preferiblemente 1%, lo más preferiblemente de 0,5 a 0,1%. En el ejemplo de la proteína priónica de hámster, se encontró que la amplificación depende de la intensidad de la fuerza de cizalladura, ya que fuerzas de cizalladura por diferentes velocidades de rotación daban como resultado una generación efectiva de proteína priónica de conformación agregada en distintos intervalos de intensidad, p. ej., en tres velocidades de rotación diferentes, se encontró una amplificación significativamente aumentada. Este resultado muestra que la amplificación depende de la intensidad de la fuerza de cizalladura y que se genera proteína priónica de conformación agregada a diferentes fuerzas de cizalladura. Esto indica que la intensidad de la fuerza de cizalladura controlada usada para la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada da como resultado especies diferentes y homogéneas de proteína priónica de conformación agregada, porque estas conformaciones agregadas son específicas para las intensidades de la fuerza de cizalladura. La homogeneidad de la proteína priónica de conformación agregada producida de acuerdo con la invención, p. ej., en comparación con la proteína priónica sometida a un intervalo amplio de fuerzas de cizalladura, es decir, amplificación no controlada, también se podía mostrar en espectroscopía sensible a la estructura, p. ej., por RMN.

Además, se encontró que la aplicación de una intensidad de la fuerza de cizalladura de intervalo estrecho daba como resultado altas tasas de conversión reproducibles de la proteína priónica de conformación natural a la proteína priónica de conformación agregada, que también se puede mencionar como un alto rendimiento que es reproducible. La invención proporciona el uso de un dispositivo para generar proteína priónica de conformación agregada a partir de una composición líquida de proteína priónica de conformación natural con proteína priónica de conformación agregada, comprendiendo el dispositivo un generador de fuerza de cizalladura que se controla para inducir fuerza de cizalladura que consiste en una intensidad con un intervalo de la intensidad como máximo de 10%, preferiblemente 2%, más preferiblemente 1%, lo más preferiblemente de 0,5 a 0,1%, a cada elemento de volumen de la preparación líquida, y preferiblemente el dispositivo comprende al menos dos paredes de confinamiento del espacio en el que se produce la fuerza de cizalladura de una intensidad, cuyo espacio está en conexión fluida o contiene el volumen de composición líquida total. La invención proporciona un procedimiento para producir proteína priónica de conformación agregada a partir de una composición líquida que comprende proteína priónica de conformación natural y proteína priónica de conformación agregada que es una proteína priónica de conformación agregada inicial o iniciadora, usando el procedimiento la fuerza de cizalladura controlada. Opcionalmente, el procedimiento puede incluir la detección de la cantidad y/o características de la conformación, p. ej., por digestión de proteasa y/o separación por tamaños y/o detección inmunológica y/o métodos de espectroscopía sensibles a la estructura, p. ej., RMN o espectroscopía de fluorescencia, como un procedimiento analítico. En esta realización, se proporciona también un procedimiento analítico para detectar la presencia de proteína priónica de conformación agregada dentro de una muestra, ya que la muestra es la proteína priónica de conformación agregada y la aplicación de fuerza de cizalladura controlada en presencia de la proteína priónica de conformación natural genera la proteína priónica de conformación agregada a partir de la proteína priónica de conformación natural de forma dependiente de la presencia de la proteína priónica de conformación agregada en la muestra. Por consiguiente, en este procedimiento analítico, la detección de la generación de proteína priónica de conformación agregada a partir de la proteína priónica de conformación natural indica la presencia de proteína priónica de conformación agregada en la muestra original.

Además, el procedimiento puede incluir la adición de un compuesto antes de, durante y/o después de la aplicación de la fuerza de cizalladura controlada, p. ej., para detectar la influencia del compuesto en el comportamiento de la

proteína priónica de conformación natural en el procedimiento, es decir, bajo la fuerza de cizalladura controlada.

En general, el dispositivo contiene una unidad de control que se ajusta para controlar el generador de fuerza de cizalladura a al menos una intensidad de fuerza de cizalladura previamente ajustada a un intervalo limitado a un máximo de 10% de un valor de fuerza de cizalladura, p. ej., de la fuerza de cizalladura máxima, p. ej., ajustando o controlando un accionador contenido o acoplado con el generador de fuerza de cizalladura, a un intervalo máximo de 10% de una frecuencia, p. ej., a un máximo de 10%, preferiblemente de 1% o 0,1% de una frecuencia p. ej., de una frecuencia predeterminada o de la frecuencia de resonancia del generador de fuerza de cizalladura.

En una realización, el generador de fuerza de cizalladura puede comprender o consistir en un elemento rotativo dispuesto en un recipiente de muestra que tiene una tapa, en donde el elemento rotativo se hace funcionar sobre puntos de apoyo que están dispuestos coaxialmente dentro del recipiente de muestra, y en donde el elemento rotativo comprende un primer elemento de acoplamiento de un acoplador, p. ej., un imán permanente, que preferiblemente es al menos bipolar o cuadrupolar. El primer elemento de acoplamiento se puede disponer para el acoplamiento con el segundo elemento de acoplamiento del acoplador, p. ej., una disposición de bobina accionadora que se puede disponer rodeando el primer elemento de acoplamiento. Preferiblemente, la superficie externa del elemento rotativo es paralela a la superficie de la pared interior del recipiente, p. ej., el elemento rotativo y una sección coaxial de la superficie de la pared interior del recipiente están separados y son cilíndricos o cónicos. Preferiblemente, el punto de apoyo del elemento rotativo comprende o consiste en un eje, un extremo del cual está dispuesto en contacto con la sección inferior de la superficie interior del recipiente y cuyo otro extremo trabaja en un punto de apoyo unido cerca del borde del recipiente, p. ej., por conexión por rozamiento y/o por ajuste positivo.

Alternativamente, el generador de fuerza de cizalladura puede tener un elemento rotativo dispuesto de forma coaxial en una sección de tubo separada radialmente, la separación radial del elemento rotativo y el tubo y la sección axial en la que se extienden tanto el elemento rotativo como el tubo definen un espacio, p. ej., de sección transversal de forma anular, en cuyo espacio se genera la fuerza de cizalladura por la rotación del elemento rotativo. Preferiblemente, el elemento rotativo a lo largo de su eje longitudinal y rotativo tiene un diámetro exterior constante y está dispuesto con una separación constante de la sección de tubo que lo rodea. El elemento rotativo puede tener cualquier forma externa, preferiblemente de simetría axial, p. ej., una forma plana o una sección transversal rectangular y preferiblemente tiene una superficie exterior cilíndrica. Preferiblemente, el tubo en la sección del mismo que rodea el elemento rotativo tiene una sección transversal interior cilíndrica. A lo largo del eje longitudinal común, el tubo preferiblemente en un extremo de la sección que rodea el elemento rotativo se extiende a lo largo del elemento rotativo, de modo que el elemento rotativo termina a una distancia del extremo del tubo, permitiendo una acción de succión en la rotación del elemento rotativo, y en el extremo opuesto de la sección que rodea el elemento rotativo, el elemento rotativo se extiende a lo largo de al menos una abertura de salida en las paredes del tubo, que permite salir el líquido. Preferiblemente, la al menos una abertura de salida en las paredes del tubo tiene una sección transversal de al menos la sección transversal del área entre el tubo y el elemento rotativo, más preferiblemente, la abertura de salida tiene una sección transversal de o mayor que la sección transversal interior del tubo, y lo más preferiblemente, la abertura de salida tiene la sección transversal del tubo.

El generador de fuerza de cizalladura está dispuesto dentro de un recipiente que contiene una preparación líquida de proteína priónica, de modo que el elemento rotativo además de ejercer una fuerza de cizalladura de una intensidad previamente ajustada, que es controlada en un intervalo estrecho, genera una succión en el extremo que es proyectada por la sección de tubo que lo rodea de modo que todos los elementos de volumen del líquido se mueven a través del espacio entre el elemento rotativo y la sección de tubo que lo rodea, donde los elementos de volumen son sometidos consecutivamente a la fuerza de cizalladura.

El elemento rotativo está dispuesto en un punto de apoyo, que preferiblemente es coaxial al tubo y al elemento rotativo, p. ej., el punto de apoyo se puede disponer en una sección del tubo adyacente a la al menos una abertura de salida y opuesto a la sección que rodea el elemento rotativo. Preferiblemente, el punto de apoyo comprende o consiste en un tubo de polímero de bajo rozamiento, p. ej., de politetrafluoroetileno (PTFE), que tiene opcionalmente al menos 2 o al menos 4 pliegues convexos o cóncavos longitudinales, dispuestos en una sección del tubo adyacente a las aberturas de salida, entre el elemento rotativo y el tubo que lo rodea. El polímero de bajo rozamiento del punto de apoyo preferiblemente está dispuesto entre un hombro circunferencial que se extiende desde el elemento rotatorio y un hombro circunferencial que sobresale de la superficie interior del tubo, p. ej., un hombro en uno de los extremos opuestos del punto de apoyo.

Preferiblemente, el generador de fuerza de cizalladura se controla a una fuerza de cizalladura previamente ajustada que corresponde a una velocidad de rotación entre 10 y 10.000 Hz, preferiblemente entre 50 y 5.000 Hz o de hasta 2.000 Hz o 1.000 Hz, controlada con precisión en un intervalo de como máximo 1% del ajuste de la velocidad de rotación, más preferiblemente a una velocidad de rotación con un intervalo como máximo de +/- 2 Hz, más preferiblemente como máximo +/- 1 Hz, con un diámetro externo del elemento rotativo de 1,95-2,05 mm dispuesto en una sección de tubo con un diámetro interior de 1,55-2,75 mm, en donde el elemento rotativo es un cilindro, que tiene opcionalmente una sección terminal plana cuadrada.

De forma alternativa, el generador de fuerza de cizalladura puede ser un dispositivo de ultrasonidos, también denominado un emisor de ultrasonidos, que tiene un recipiente para recibir la preparación líquida que tiene un

volumen interior que se extiende para un solo elemento de volumen que está dispuesto a una distancia de la superficie del dispositivo de ultrasonidos (o superficie del sonotrodo) y es paralelo solo a la sección de superficie, en el que está situado a al menos de 75% a 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99% de la amplitud máxima. Este elemento de volumen está dispuesto, p. ej., dentro de una distancia de 0,5 mm a 50 mm de la superficie del dispositivo de ultrasonidos y se extiende paralelo al centro de la fracción de superficie entre los nodos de vibración de la superficie del dispositivo de ultrasonidos, p. ej., en un máximo de 10%, preferiblemente máximo de 2% o 1% del área entre los nodos de vibración. La posición del elemento de volumen se puede predeterminar, p. ej., por el cálculo de la fracción de superficie de la superficie del sonotrodo y la distancia desde la superficie del sonotrodo en la que se genera la amplitud máxima, y por lo tanto la fuerza de cizalladura máxima. Debido a la disposición específica del elemento de volumen en la intensidad de vibración máxima, la composición de líquido en el mismo se somete a una fuerza de cizalladura que tiene una intensidad de un intervalo de intensidad limitado. Para una transferencia eficaz de las vibraciones desde la superficie del sonotrodo al elemento de volumen, el recipiente preferiblemente consiste en un material que es permisivo a los ultrasonidos, p. ej., de polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE) u otros tipos de teflón, y un líquido de transferencia, p. ej. agua, está dispuesto entre el recipiente y la superficie del sonotrodo. Preferiblemente, el sonotrodo forma una pared de un baño de líquido de transferencia, p. ej., una pared lateral y preferiblemente la pared inferior, y la altura del líquido de transferencia en la perpendicular de la superficie del sonotrodo se fija a una longitud de onda del ultrasonido, p. ej. a la frecuencia de resonancia del sonotrodo, o a un múltiplo entero de la longitud de onda del ultrasonido, p. ej. a la frecuencia de resonancia del sonotrodo. El baño del líquido de transferencia se puede adaptar o diseñar para prefijar la altura del líquido de transferencia, estando determinada la altura en la perpendicular de la superficie del sonotrodo.

Preferiblemente, los dispositivos se disponen en una matriz de dos o más dispositivos, preferiblemente 7, 14 o 21 dispositivos, dispuestos con sus ejes longitudinales en vertical en una carcasa de temperatura controlada. Todos los dispositivos de la matriz pueden estar conectados a y controlados por un ordenador, que se proporciona para controlar la velocidad de rotación de cada elemento rotativo individualmente. Esta matriz de dispositivos es ventajosa para tratar partes alícuotas de una composición líquida de proteína priónica en paralelo, es decir sin variación de la composición o el estado de la composición líquida, como podría ocurrir p. ej. en procedimientos de tratamiento posteriores durante el almacenamiento de las partes alícuotas y variaciones día a día de las condiciones de tratamiento. Usando la matriz de dispositivos, el procedimiento de la invención comprende el tratamiento de partes alícuotas de una composición líquida de proteína priónica en dispositivos individuales separados simultáneamente, preferiblemente con fuerzas de cizalladura diferentes, que son generadas por diferentes velocidades de rotación aplicadas a los elementos rotativos.

Por consiguiente, un procedimiento que usa el dispositivo comprende la etapa de distribuir proporcionalmente partes alícuotas de una preparación líquida a una serie de recipientes idénticos, cuyas partes alícuotas preferiblemente son fracciones tomadas de una composición líquida homogénea. Opcionalmente, las partes alícuotas se pueden someter a la misma intensidad de fuerza de cizalladura o cada una a una diferente. Además, opcionalmente, las muestras, p. ej., muestras de mamífero, se pueden usar como la proteína priónica de conformación agregada, y/o se pueden añadir compuestos que se sospecha que afectan al proceso de amplificación o agregación a partes alícuotas para comparar el cambio en la conformación de una proteína priónica de conformación natural a su conformación agregada entre partes alícuotas, p. ej., comparando la cantidad de amplificación y/o la calidad de la amplificación, p. ej., por análisis cuantitativo y/o cualitativo de la conformación agregada obtenida, preferiblemente en transferencias Western de partes alícuotas de las muestras procesadas tratadas con proteinasa.

En una realización particular, el recipiente es un tubo conectado con una bomba, cuyo tubo solo atraviesa el elemento de volumen que está dispuesto separado de la superficie del dispositivo de ultrasonidos y solo es paralelo a la sección de la superficie, en la que se encuentra al menos de 75% a 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99% de la amplitud máxima. Este elemento de volumen está dispuesto, p. ej., en una distancia de 0,5 mm a 50 mm de la superficie del dispositivo de ultrasonidos y se extiende paralelo al centro de la fracción de superficie entre los nodos de vibración de la superficie del dispositivo de ultrasonidos, p. ej., como máximo en 10%, preferiblemente como máximo en 2% o 1% del área entre los nodos de vibración.

En una realización preferida, el dispositivo comprende un aparato de colocación controlada que está dispuesto para colocar un recipiente de reacción que contiene la composición líquida que contiene la proteína priónica. Este aparato de colocación se puede controlar de forma mecánica y/o mediante ordenador para colocar el recipiente de reacción en relación con el generador de fuerza de cizalladura. Por ejemplo, el aparato de colocación puede tener un medio de pinzamiento para fijar de forma liberable el recipiente de reacción, preferiblemente en una posición predeterminada, p. ej., adyacente a una cara de apoyo dispuesta dentro del medio de pinzamiento. El medio de pinzamiento se puede disponer en un soporte del aparato de colocación, siendo el soporte separable, p. ej., montado en un brazo mecánico controlado por ordenador. De forma alternativa o adicional, el soporte puede ser guiado para la colocación, p. ej., mediante el encaje del soporte en una rosca de un elemento, p. ej., una tapa, dispuesto a una distancia fija de la superficie del sonotrodo. En esta realización, el recipiente de reacción preferiblemente se puede sellar antes de la disposición en el medio de pinzamiento.

El aparato de colocación controlada permite que el procedimiento comprenda la etapa de colocar el recipiente de reacción en posiciones que varían respecto al generador de fuerza de cizalladura, p. ej., en un procedimiento para determinar la posición del recipiente de reacción en el que el volumen interior recibe la amplitud máxima de

ultrasonidos.

En otra realización alternativa o adicional, el aparato de colocación controlada está adaptado para colocar repetidamente el recipiente de reacción adyacente al generador de fuerza de cizalladura durante la aplicación de la fuerza de cizalladura y para retirar el recipiente de reacción del generador de fuerza de cizalladura durante una fase de reposo, p. ej., depositando el recipiente de reacción a una distancia del generador de fuerza de cizalladura. En la presente memoria, un elemento rotativo dentro de un tubo puede estar montado dentro del recipiente de reacción con un primer elemento de acoplamiento al elemento rotativo que es accesible por un accionador externo, p. ej., por contacto directo o sin contacto directo con el accionador, p. ej., un imán permanente. La colocación del recipiente de reacción por el aparato de colocación en esta realización también coloca el recipiente de reacción funcionalmente adyacente al generador de fuerza de cizalladura proporcionando el acoplamiento del primer elemento de acoplamiento con el segundo elemento de acoplamiento, p. ej., montado en un accionador, p. ej., en una disposición de bobina accionadora. Esta realización permite un uso más eficaz del generador de fuerza de cizalladura y de un accionador, respectivamente adaptando el aparato de colocación controlada para la posterior colocación de al menos dos recipientes de reacción adyacentes al generador de fuerza de cizalladura durante la aplicación de la fuerza de cizalladura, porque el aparato de colocación controlada está adaptado para retirar recipientes de reacción del generador de fuerza de cizalladura durante la fase de reposo. Esto permite la posterior aplicación de fuerza de cizalladura a al menos dos recipientes de reacción, p. ej., un procedimiento de aplicación paralela de fuerza de cizalladura a al menos dos recipientes de reacción usando un generador de fuerza de cizalladura.

Para producir la proteína priónica de conformación agregada usando el dispositivo, una composición líquida que contiene la proteína priónica de conformación natural y una o una mezcla de proteínas priónicas en conformación agregada se coloca o se mueve a través del elemento de volumen, en el que se genera la fuerza de cizalladura que consiste en una intensidad con un intervalo de intensidad de como máximo 10%, preferiblemente 2%, más preferiblemente 1%, lo más preferiblemente de 0,5 a 0,1%, como una fase de fragmentación, p. ej., durante 1 s a 240 s, preferiblemente durante 30 a 120 s, preferiblemente con una fase de reposo posterior, p. ej., durante 10 s a 1080 s, preferiblemente de 60 s a 540 s. Más preferiblemente, la fase de fragmentación y la fase posterior de reposo se realizan en ciclos, p. ej., de 5 a 500 ciclos, preferiblemente de 60 a 280 ciclos, más preferiblemente de 100 a 140 ciclos.

En una realización, el procedimiento para generar proteína priónica de conformación agregada a partir de proteína priónica de conformación agregada es un procedimiento analítico, en donde una muestra, p. ej., fluido corporal de un mamífero, preferiblemente líquido de la médula espinal o suero sanguíneo, se añade a la proteína priónica de conformación natural para formar una composición líquida que contiene la muestra y la proteína priónica de conformación natural, cuya composición líquida se somete a la fuerza de cizalladura previamente ajustada controlada, de un intervalo de intensidad limitado, de la invención, y se detecta un aumento de la proteína priónica de conformación agregada, p. ej., de proteína priónica resistente a proteasa, preferiblemente en PAGE y/o en una transferencia Western. En esta realización, la ventaja del procedimiento, en concreto generar de forma reproducible proteína priónica de conformación agregada con alto rendimiento, debido al control preciso de la intensidad de la fuerza de cizalladura, se usa para determinar que la muestra original contenía proteína priónica de conformación agregada cuando se detecta un aumento de la proteína priónica de conformación agregada.

Opcionalmente, la proteína priónica de conformación agregada generada por el procedimiento de la invención se puede usar como una muestra de control positivo en un procedimiento analítico que contiene la etapa de amplificar la proteína priónica de conformación agregada a partir de un exceso de proteína priónica de conformación natural, ya que la proteína priónica de conformación agregada producida por el procedimiento de la invención tiene una conformación agregada uniforme que se amplifica de forma reproducible bajo la fuerza de cizalladura. La conformación agregada uniforme de la proteína priónica es al menos tan uniforme como se determina por o para el uso en la caracterización por digestión de proteasa, p. ej., en un método de detección de proteína priónica de conformación agregada por digestión de proteasa y detección de los productos de digestión resistentes a proteasa.

Por consiguiente, el procedimiento analítico comprende preferiblemente someter una muestra positiva en paralelo a las muestras obtenidas de un mamífero, a las etapas del procedimiento, cuya muestra positiva contiene la proteína priónica de conformación agregada generada por el procedimiento de la invención.

En una realización adicional, el procedimiento de producción de proteína priónica de conformación agregada incluye la etapa de poner en contacto la proteína priónica de conformación agregada con un compuesto sonda y la etapa de determinar la aparición de una interacción del compuesto sonda con la proteína priónica de conformación agregada. Preferiblemente, la etapa de determinar la aparición de la interacción comprende la determinación de un efecto inhibidor del compuesto sonda en la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada.

## Descripción detallada de la invención

La invención se describe ahora con mayor detalle con referencia a las figuras, en donde

- La figura 1 muestra esquemáticamente un generador de fuerza de cizalladura de la invención,
- La figura 2 muestra esquemáticamente otro generador de fuerza de cizalladura de la invención,

- La figura 3A muestra esquemáticamente un sonotrodo como un generador de fuerza de cizalladura, con las áreas entre nodos de vibración (rayadas) y las intensidades de la fuerza de cizalladura (cuadrados blancos) representados en la vista lateral inferior,
- 5 - La figura 3B muestra una vista superior de un sonotrodo como un generador de fuerza de cizalladura de la invención con amplitudes de vibración dadas en sombreado gris de acuerdo con las escalas del lado derecho,
- La figura 3C muestra una vista superior de un sonotrodo con amplitudes de vibración a una distancia de 0,5 mm por encima de la superficie del sonotrodo,
- 10 - La figura 3D muestra la intensidad de la fuerza de cizalladura a una distancia de 0,5 mm por encima de la superficie del sonotrodo en una sección transversal parcial de la figura 3B como se indica por la línea punteada en sombreado gris de acuerdo con la escala del lado derecho,
- La figura 4 muestra transferencias Western de proteína priónica de conformación agregada digerida por proteínasa K producida de acuerdo con la invención con diferentes fuerzas de cizalladura aplicadas,
- La figura 5 muestra una gráfica de las concentraciones normalizadas del prion de conformación agregada de las transferencias Western de la figura 4,
- 15 - La figura 6 muestra un análisis de transferencia Western de proteína priónica de conformación agregada digerida por proteínasa K producida de acuerdo con la invención con diferentes fuerzas de cizalladura aplicadas,
- La figura 7 muestra secciones de transferencias Western de proteína priónica resistente a la proteínasa K producida con diferentes fuerzas de cizalladura controladas,
- 20 - La figura 8 muestra un análisis gráfico de la cantidad relativa de proteína priónica de conformación agregada de la figura 7,
- La figura 9 muestra la cinética de la amplificación a fuerzas de cizalladura controladas (Hz),
- La figura 10 muestra un SDS-PAGE (tinción con plata) de la mezcla inicial de Sc237 con la proteína priónica de conformación natural (banda izquierda) y del producto de conformación agregada producido,
- 25 - La figura 11 muestra el RMN CP-MAS: correlación  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  de un producto de amplificación espontáneo comparativo,
- La figura 12 muestra el RMN CP-MAS: correlación  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  de un producto de amplificación producido de acuerdo con la invención,
- La figura 13 muestra esquemáticamente una realización de un generador de fuerza de cizalladura en una vista de sección transversal, y
- 30 - La figura 14 muestra una realización de un soporte para la sujeción de un recipiente de reacción.

En los ejemplos, las mismas referencias numéricas se refieren a elementos de funcionamiento idéntico.

La figura 1 representa un dispositivo que contiene un elemento rotativo 1, que está dispuesto en un eje 2 que es coaxial con el recipiente y trabaja sobre un primer punto de apoyo 3 y un segundo punto de apoyo 4. El primer punto de apoyo 3 está formado por un primer extremo del eje 2 que está en contacto con el fondo del recipiente 5, en el que el elemento rotativo 1 está dispuesto, y el segundo punto de apoyo 4 está formado por el segundo extremo del eje 2 opuesto a su primer extremo. Se prefiere, que el segundo punto de apoyo esté formado por una perforación 6 de un soporte 7 que se sujeta, p. ej., mediante una conexión por rozamiento dentro de un rebaje formado dentro de la tapa 8. El elemento rotativo 1 comprende un primer elemento de acoplamiento 10 de un acoplador, p. ej., un imán permanente que tiene dos polos, cuyo acoplador está conectado a un accionador 11. Para accionar el elemento rotativo 1, el dispositivo se dispone en una posición de acoplamiento con el segundo elemento de acoplamiento 12, p. ej., entre bobinas, y el accionador 11 es un generador de campo eléctrico conectado a las bobinas. El accionador 11 está estrechamente controlado por una unidad de control 13, que preferiblemente también está conectada a un sensor 14 que vigila el accionador 11. La unidad de control 13 está equipada para controlar el accionador 11, p. ej., en un circuito cerrado, con una alta precisión para generar una fuerza de cizalladura que tenga un intervalo de intensidad de 2%, preferiblemente de 1% o más estrecho entorno a un valor de intensidad, p. ej., controlando la rotación del elemento rotativo 1 dentro del recipiente 5 a una frecuencia con una variación de 2%, preferiblemente de 1% como máximo.

La superficie del elemento rotativo 1 puede ser paralela a la pared del recipiente 5, formando una fuerza de cizalladura homogénea para un elemento rotativo cilíndrico en un recipiente 5 cilíndrico. En el caso de un recipiente 5 cónico, un elemento rotativo que sea cónico para estar paralelo al recipiente 5 generará un gradiente de fuerza de cizalladura de acuerdo con el cambio de radio. En general, si el gradiente de fuerza de cizalladura causado por el ángulo de la forma cónica del recipiente y la forma cónica paralela del elemento rotativo excede el intervalo estrecho

de una intensidad de fuerza de cizalladura, se prefiere que el ángulo del cono del elemento rotativo sea más pequeño respecto al eje que el cono de la pared interior del recipiente respecto a su eje longitudinal, preferiblemente de modo que la separación entre el recipiente y el elemento rotativo aumenta al aumentar el radio del elemento rotativo y el recipiente, respectivamente.

- 5 Esta realización tiene la ventaja de que se puede realizar usando un recipiente 5 comercial, p. ej., un vial Eppendorf, en el que se coloca el elemento rotativo 1 y se sujeta mediante un segundo punto de apoyo 4 que proporciona una placa que sirve como soporte 7 dispuesto en un receso de una tapa 8.

10 La rotación del elemento rotativo 1 dentro del recipiente 5 a una frecuencia de rotación estrechamente controlada, es decir, en un intervalo estrecho de aproximadamente una frecuencia de rotación prefijada, genera una fuerza de cizalladura de un intervalo estrecho de aproximadamente una fuerza de cizalladura prefijada entre el elemento rotativo 1 y el recipiente 5.

15 La figura 2 muestra una realización preferida del dispositivo de la invención, en donde un elemento rotativo 1 está rodeado por un tubo separado 20 de diámetro interior cilíndrico, formando la pared interior del tubo 20 un espacio de sección transversal anular alrededor del elemento rotativo 1. De forma alternativa, una sección del elemento rotativo 1 que está rodeada por el tubo 20 puede tener una forma planta, p. ej., de sección transversal rectangular que no supere, preferiblemente, que tenga el radio del elemento rotativo 1. Como se prefiere, el tubo 20 supera el primer extremo (inferior) 1a del elemento rotativo 1, y el tubo 20 proporciona una abertura de salida 21 que tiene o supera el diámetro de la sección transversal entre el elemento rotativo 1 y el tubo 20. El elemento rotativo 1 trabaja sobre un primer punto de apoyo 3 que está formado por un tubo de polímero de bajo rozamiento 22 dispuesto entre el eje 2 del elemento rotativo 1 y una camisa 24 que está dispuesta alrededor del eje 2, en donde la camisa 24 tiene un hombro interior 25 contra el que se apoya el tubo de polímero de bajo rozamiento 22, y un segundo punto de apoyo 4 que está formado por el hombro 23 y el tubo de polímero de bajo rozamiento 22 que se apoya contra el hombro. La camisa 24 y el tubo 20 son coaxiales y opcionalmente pueden estar formados de un tubo que tiene la abertura de salida 21, p. ej., al menos una perforación y preferiblemente 2 perforaciones opuestas, dispuesta entre la camisa 24 y el tubo 20. Preferiblemente, la camisa 24 y el tubo 20 están conectados entre sí, p. ej., mediante al menos un conector, preferiblemente mediante al menos una, preferiblemente dos secciones de un tubo, cuyas secciones separan las aberturas de salida 21.

20 Un primer elemento de un acoplador 10, p. ej. un imán permanente, está fijado al eje 2. Preferiblemente, el dispositivo está envuelto con una carcasa sellable 30, y el segundo elemento del acoplador 12 está dispuesto fuera de la carcasa 30, permitiendo que el accionador 11 acoplado con el segundo elemento del acoplador 12 accione el primer elemento de un acoplador 10, y por lo tanto el eje 2 que lleva el elemento rotativo 1.

25 La realización del dispositivo representado en la figura 2 es para la disposición del tubo 20 dentro de un recipiente, que puede ser, p. ej. la carcasa 30, o cuyo recipiente 31 puede estar dispuesto dentro de una carcasa 30. Esta realización tiene la ventaja de que la fuerza de cizalladura es generada sin interacción con el recipiente 31.

30 La figura 3A muestra una superficie de un sonotrodo en vista superior, en donde la zona oscura rayada indica uno de los varios nodos de vibración, y las zonas de superficie adyacente que vibran significativamente. La vista lateral inferior muestra que la zona que vibra ilustrada genera fuerza de cizalladura que está limitada tanto a una sección de la superficie del sonotrodo como a una determinada separación de la superficie del sonotrodo, como se indica por la curva que representa tanto la extensión espacial de la vibración, es decir, fuerza de cizalladura máxima en paralelo al plano de la superficie del sonotrodo, como la distancia desde la superficie del sonotrodo.

35 La figura 3B muestra un sonotrodo en vista superior, en donde la zona oscura muestra esquemáticamente una de varias zonas de formación de nodos y zonas de superficie adyacentes que vibran significativamente. Las líneas oscuras representan nodos de vibración, y el brillo creciente muestra la fuerza de cizalladura creciente. La figura 3C muestra la distribución espacial de la fuerza de cizalladura a una altura de 0,5 mm por encima de la superficie de metal del sonotrodo determinada, p. ej., en agua. La vista lateral dada en la fig. 3D muestra que las zonas de vibración no están limitadas solo a una sección de la superficie del sonotrodo, sino que también están limitadas a una determinada separación desde la superficie del sonotrodo, como se indica por la curva de intensidad de la fuerza de cizalladura entre los nodos de vibración, cuya curva representa tanto la extensión espacial de la energía de vibración máxima en el plano del sonotrodo como la distancia desde la superficie del sonotrodo a la que se extiende la energía de vibración máxima. La fuerza de cizalladura de una intensidad que se usa en la invención se ejerce solo sobre los elementos de volumen de una composición líquida que están situados en el volumen por encima del sonotrodo en el que se genera la energía de vibración máxima. Por consiguiente, en los dispositivos y procedimientos que usan un sonotrodo como el generador de la fuerza de cizalladura, todos los elementos de volumen de la composición líquida están dispuestos a una distancia desde la superficie del sonotrodo y en paralelo a una fracción de superficie de la superficie del sonotrodo entre los nodos de vibración, en la que se genera la energía de vibración máxima, preferiblemente a una frecuencia de resonancia del sonotrodo, p. ej., que permite que sea transmitida solo una fuerza de cizalladura ultrasónica máxima específica de un intervalo de intensidad limitado al volumen interior del recipiente que consiste en los elementos de volumen de la composición líquida, p. ej., con una precisión o limitación de 10%, preferiblemente de 2% o 1% de la fuerza de cizalladura máxima a una frecuencia aplicada. Se ha encontrado que no es necesaria agitación adicional para mezclar la preparación líquida, puesto que

la fuerza de cizalladura aplicada a cada elemento de volumen de la composición líquida consiste en el intervalo de intensidad controlado de la fuerza de cizalladura, lo que produce homogeneidad de la proteína priónica en estado agregado a partir de la proteína priónica de conformación natural mezclada con proteína priónica en estado agregado de la composición líquida.

5 Ejemplo 1: Dispositivo para generar fuerza de cizalladura controlada de un intervalo de intensidad limitado

10 Como un ejemplo, se usó un dispositivo como se muestra esquemáticamente en la figura 2, con las siguientes dimensiones: un elemento rotativo con una sección transversal cuadrada de 1,95 mm en un eje de 1,95 mm de diámetro se dispuso coaxialmente con una separación de 0,3 mm en un tubo cilíndrico. La camisa, el tubo y el elemento rotativo que incluye el eje dispuestos en la camisa y el imán permanente al final del eje opuesto al elemento rotativo cuadrado se obtuvieron de Heidolph, Alemania, y las perforaciones de salida originales se taladraron con un diámetro de 3 mm para formar dos perforaciones de salida enfrentadas de 3 mm de diámetro cada una dispuesta adyacente al tubo.

15 El punto de apoyo era como se muestra en la figura 2, y usaba un tubo de teflón cortado a medida entre el hombro del eje y el hombro interior de la camisa. Para una menor fricción, el tubo de teflón se dobló longitudinalmente aplanándolo dos veces, generando 4 pliegues longitudinales que separaban cuatro secciones convexas longitudinales, como se prefiere en general para este tubo. La camisa estaba formada por una sección de tubo que se conectaba al tubo que rodea el elemento rotativo por las secciones de pared del tubo que forman los bordes de las aberturas de salida. Para el acoplador, se usaron el conjunto de bobinas estáticas disponible en Heidolph, que incluyen parte de su electrónica de control individual.

20 Para formar una matriz de los dispositivos, se dispusieron dos o más dispositivos, preferiblemente 14 o 21, con sus ejes longitudinales en vertical en una carcasa de temperatura controlada. Todos los dispositivos de la matriz se controlaban mediante un ordenador.

La velocidad de cizalladura se controló mediante un potenciómetro y multímetro, regulando las velocidades de rotación entre 20 a 1300 Hz con una variación de 5 Hz, preferiblemente 2 Hz, y más preferiblemente 1 Hz.

25 Se encontró que estos dispositivos podía trabajar durante 136 ciclos de 60 s de rotación de 20 a 1300 Hz y 540 s de fase de reposo sin rotación, con una precisión de la rotación de 1 Hz, para el tratamiento de composiciones líquidas acuosas de 5°C a 40°C en un experimento, y estos dispositivos se podían usar en hasta 10 experimentos. El punto de apoyo era esencialmente estable, mantenía un movimiento de baja resistencia del elemento rotativo que es esencial para la reproducibilidad de las velocidades de rotación, y no mostraba un desgaste excesivo.

30 Como punto de apoyo comparativo, se dispuso una hoja enrollada de lámina de PTFE entre el elemento rotativo y el tubo. Después de rotación durante 10 ciclos de 60 s con 540s de fase de reposo, la hoja enrollada que formaba el punto de apoyo se había calentado y se había destruido parcialmente, mientras que un punto de apoyo que consistía en un tubo de PTFE dispuesto entre el elemento rotativo y una sección del tubo podía funcionar durante al menos 5 min a la misma velocidad, y se podía usar durante una vida útil total de al menos 60 min hasta 24 h.

35 Para comparar con un dispositivo de la invención que tenía dos aberturas de salida con una sección transversal total de la sección transversal que está limitada por el elemento rotativo y la sección de tubo que lo rodea, se usó un dispositivo en el que la abertura de salida era una perforación de 1,5 mm de diámetro, es decir, una sección transversal de 1,767 mm<sup>2</sup>. Se encontró que esta abertura de salida más pequeña daba como resultado productos irreproducibles a partir de composiciones líquidas que contenían proteína priónica de conformación natural con proteína priónica de conformación agregada. Actualmente, se supone que la abertura de salida más pequeña produce fuerzas de cizalladura que son generadas además de las fueras de cizalladura generadas por el elemento rotativo. Además, se observó que en estos dispositivos, la composición líquida era arrastrada al punto de apoyo, permitiendo que el punto de apoyo ejerciera fuerzas de cizalladura adicionales sobre el líquido.

Ejemplo 2: Producción de proteína priónica de conformación agregada

45 Como un primer experimento, la composición líquida de partida contenía 5% en vol/vol de proteína priónica resistente a la proteasa K Sc237 BH, que representa una proteína priónica de conformación agregada que se sabe que induce la amplificación de la conformación agregada en la conformación natural shNBH, y se mezcló con una preparación al 10% en peso/vol de proteína priónica de hámster shNBH (homogeneizado de cerebro normal de hámster sirio) que tenía la conformación natural, que se produjo por homogeneización de tejido cerebral con disoluciones tampón acuosas que contenían detergente. A partir de esta disolución madre, cada una de las partes alícuotas se sometió a diferentes intensidades de fuerza de cizalladura usando una matriz de los dispositivos del ejemplo 1, con ciclos de 60 s de fuerza de cizalladura y 9 min de fase de reposo sin agitación, durante un total de 46 h en un termostato a 37°C a una fuerza de cizalladura por las velocidades de rotación indicadas en la figura 4 con una precisión de 1 Hz. Los elementos rotativos de los dispositivos se introdujeron en viales Eppendorf de 1,5 ml que contenían partes alícuotas de la composición líquida.

55 No se observó deterioro de la fuerza de cizalladura, es decir, desviación del control de la velocidad de rotación a lo largo de la serie de ciclos, indicando la fiabilidad del dispositivo.

5 Para el análisis de las reacciones de amplificación, se tomaron partes alícuotas de cada reacción y se digirieron con proteinasa K añadida en 50 µg/ml o 10 µg/ml, respectivamente. Las muestras se separaron por SDS-PAGE, la detección se hizo en una transferencia Western usando anticuerpo anti-PrP y disolución Western Pico ECL (Pierce) para la generación de la señal. Los resultados se muestran en la figura 4, en donde el número de instrumento  
 10 identifica el dispositivo individual de la matriz, Hz indica la velocidad de rotación usada por el dispositivo individual, neg. indica una dilución al 5% en vol/vol de la proteína priónica Sc237 BH al 10% en peso/vol en shNBH al 10% en peso/vol, que corresponde a la composición líquida de partida, y ScBH, separado de neg. por una banda vacía, indica proteína priónica Sc237 BH al 10% en peso/vol digerida con proteinasa K 50 µg/ml en cada transferencia como un control positivo.

15 Las transferencias Western muestran que la cantidad de proteína priónica resistente a la proteinasa K, generada por la amplificación difiere dependiendo de la intensidad de la fuerza de cizalladura, como se indica por las velocidades de rotación. Además, la comparación de muestras generadas a una intensidad de fuerza de cizalladura pero digeridas con diferentes concentraciones de proteinasa K indica que el cambio en la intensidad de la señal difiere entre muestras según la intensidad de la fuerza de cizalladura. Se muestra un análisis cuantitativo en la fig. 5, en  
 20 donde se muestran las intensidades de las señales después de normalización respecto a la señal de control positivo. En la gráfica, la intensidad de la fuerza de cizalladura se da como la velocidad de rotación (▲), cada pareja de columnas da la proteína priónica resistente a la proteinasa K de la misma velocidad de rotación indicada, indicando la columna de la izquierda la intensidad de la señal con 10 µg/ml de proteinasa K, indicando la columna de la derecha la intensidad de la señal con 50 µg/ml de proteinasa K. Este análisis muestra que en las partes alícuotas de una composición líquida de partida de proteína priónica de conformación natural, la amplificación depende de la intensidad de la fuerza de cizalladura aplicada, p. ej., se producen diferentes concentraciones totales de proteína priónica de conformación agregada cuando se usa una intensidad de la fuerza de cizalladura diferente, p. ej., generada por una velocidad de rotación que difiere, p. ej., en 10 o en 100 Hz.

25 Esto indica que hay una intensidad de fuerza de cizalladura óptima para la amplificación de la conformación agregada de una proteína priónica.

Se puede ver un efecto adicional de las diferentes intensidades de la fuerza de cizalladura durante la amplificación para las diferentes concentraciones de proteinasa K, que muestra que la resistencia relativa frente a la proteólisis difiere entre las intensidades de la fuerza de cizalladura. Este resultado indica que diferentes intensidades de fuerza de cizalladura dan como resultado diferentes conformaciones agregadas de una proteína priónica durante la  
 30 amplificación.

Como un segundo experimento, se añadió 0,001 vol/vol de proteína priónica de conformación agregada Sc237 (hámster) al 10% en peso/vol a proteína priónica de conformación natural de hámster PrP (aminoácidos 23-230) 100 µg/ml, para formar una composición líquida para la amplificación usando un volumen total de 10 ml por reacción. Para el procedimiento se llevaron a cabo 144 ciclos de 60 s de fuerza de cizalladura y 9 min de fase de reposo sin  
 35 agitación a 37°C. Se usó una matriz de 7 dispositivos como antes, con velocidades de rotación controladas a 109 rpm a 406 Hz, controlado a un intervalo de 1 Hz. Se digirieron partes alícuotas de muestras con proteinasa K 0,25 µg/ml a 37°C durante 30 min y se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western. El resultado se muestra en la figura 6A, que muestra la transferencia Western para muestras que incluyen priones de hámster Sc237, que demuestran la amplificación de una forma dependiente de la fuerza de cizalladura. En las figuras 6A y 6B, las velocidades de rotación individuales que generan la intensidad de la fuerza de cizalladura se indican encima de las bandas; las marcas a la derecha de las transferencias Western indican las posiciones esperadas de las bandas para los priones indicados. Como se muestra en la transferencia Western de la figura 6B, en ausencia de los priones de hámster Sc237, no se observa banda de resistencia a la proteinasa K, indicando que no se produce amplificación en esta parte alícuota.

40 La figura 6 demuestra que la amplificación depende fuertemente de la velocidad de cizalladura, mostrando en el presente ejemplo un óptimo de 169 Hz, con la proteína priónica de conformación agregada PrP<sup>C</sup> 0,25 µg/ml como control positivo.

### Ejemplo 3: Análisis de la interacción de compuesto de ensayo en la amplificación

45 El análisis de la interacción de compuestos de ensayo con proteína priónica que influye en la amplificación de la proteína priónica de conformación agregada a partir de proteína priónica de conformación natural se llevó a cabo usando proteína priónica agregada producida según el ejemplo 2 a una intensidad de la fuerza de cizalladura. Se añadió un compuesto en ensayo de 6 µg/ml a 600 µg/ml a una composición líquida de sc237 BH al 5% en vol/vol en proteína priónica de conformación natural de hámster shNBH al 10% en peso/vol. Partes alícuotas de la composición se sometieron a 144 ciclos de 60 s de fuerza de cizalladura y 9 min de fase de reposo sin agitación a 37°C. Se usó  
 50 una matriz de 12 dispositivos como antes, con las velocidades de rotación controladas de 1.000 rpm a 16.000 rpm, controladas en un intervalo de 1 Hz. Se digirieron partes alícuotas de muestras con proteinasa K de 5 a 50 µg/ml a 37°C durante 30 min y se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western.

Ejemplo 4: Producción de distinta proteína priónica de conformación agregada usando diferentes intensidades de la fuerza de cizalladura

Usando una mezcla de proteína priónica de conformación agregada Sc237 y una preparación al 10% de extracto de cerebro de hámster normal, se sometieron partes alícuotas a diferentes fuerzas de cizalladura usando la matriz de dispositivos del ejemplo 1. Las fuerzas de cizalladura se generaron a las velocidades de rotación indicadas en Hz, se tomaron muestras a las 0, 1, 3, 6 12 y 22 h durante la amplificación (ciclos de 5 s de rotación, 5 min de fase de reposo) como se indica.

La figura 7 muestra secciones de la transferencia Western de las cantidades inmunológicamente detectadas de proteína priónica resistente a la proteinasa K, es decir, de conformación agregada. La digestión con proteinasa K con 50 µg/ml durante 1 h a 37°C, se siguió por SDS-PAGE y transferencia Western. El progreso de la amplificación se puede ver como el aumento en las intensidades de la proteína priónica de conformación agregada para cada fuerza de cizalladura (Hz). El análisis gráfico de la cantidad relativa de proteína priónica de conformación agregada derivada del análisis por transferencia Western se muestra en la figura 8 para cada uno de los periodos de toma de muestra. Este análisis muestra que la eficacia de la amplificación depende de la fuerza de cizalladura aplicada, generando en este experimento tres tasas de amplificación máxima. La figura 9 muestra un análisis gráfico de la cinética de la amplificación para aquellas fuerzas de cizalladura (Hz) que dan la amplificación máxima.

Estos resultados muestran que el método produce una proteína priónica de conformación agregada homogénea a fuerzas de cizalladura distintas específicas, porque la eficacia y la tasa de la amplificación dependen de la intensidad de la fuerza de cizalladura aplicada.

Ejemplo 5: Producción de proteína priónica de conformación agregada homogénea usando una intensidad de la fuerza de cizalladura

Para producir una preparación de proteína priónica de conformación agregada, se mezcló Sc237 en relación 1/2500 con 50 µg/ml de proteína priónica de conformación natural producida de forma recombinante y purificada en un volumen de reacción total de 10,0 ml. Para generar la fuerza de cizalladura, un generador de fuerza de cizalladura rotativo como se describe en el ejemplo 1 se rotó a 756 Hz +/-1 Hz durante 60 s con 540 s de fase de reposo, durante 136 ciclos. El producto de amplificación espontáneo comparativo se generó en las mismas condiciones de procesamiento pero sin la proteína priónica agregada añadida a la reacción inicial, es decir, sin Sc237 como proteína priónica de conformación aglomerada de siembra.

La figura 10 muestra un SDS-PAGE (teñido con plata) de la mezcla inicial de Sc237 con la proteína priónica de conformación natural (banda izquierda) y el producto de conformación agregada producido. A la izquierda se dan los tamaños de las proteínas marcadoras, a la derecha se indican los patrones de migración de tres fragmentos diferentes de PrP<sup>C</sup> (proteína priónica de conformación agregada). El aumento de la homogeneidad de la proteína en el volumen de reacción debido a la fuerza de cizalladura aplicada es evidente.

El producto de conformación agregada producido se sedimentó por centrifugación, dando un total de 6 mg de proteína resistente a la proteinasa K cuando se aisló. Esta proteína, que después del procedimiento de producción no se ha perturbado, se usó en RMN de <sup>13</sup>C de estado sólido.

Como muestra comparativa, el producto de la amplificación espontánea (sin proteína priónica agregada inicial) se usó de forma similar para la RMN de <sup>13</sup>C.

RMN CP-MAS: la correlación <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C se muestra en la figura 11 para el producto de amplificación espontánea, y en la figura 12 para el producto de conformación agregada obtenido por el procedimiento de la invención usando fuerza de cizalladura controlada. Las secciones aumentadas de la gráfica de correlación muestran las secciones derecha superior, en concreto la región espectral en la que se pueden observar picos cruzados característicos para la isoleucina. En comparación con el producto de amplificación espontánea, el producto de conformación agregada obtenido por el procedimiento de la invención muestra señales distintas para cuatro de los cuatro restos de isoleucina, indicando que este producto consiste predominantemente en una conformación de proteína priónica agregada, es decir, las distintas señales muestran una alta homogeneidad de la conformación del producto del procedimiento de la invención. Además, la comparación de la sección aumentada del espectro de RMN de la fig. 12 muestra picos aumentados que corresponden a parejas de átomos <sup>13</sup>C<sup>β</sup>/<sup>13</sup>C<sup>δ1</sup> y <sup>13</sup>C<sup>β</sup>/<sup>13</sup>C<sup>δ2</sup> de aminoácidos individuales. Estos resultados muestran que los desplazamientos químicos dependen de la fuerza de cizalladura, ya que el producto obtenido a 756Hz (Sc237-756Hz) muestra cuatro picos de isoleucina emparejados, lo que difiere del producto obtenido a 189Hz (Sc237-189Hz) que muestra tres picos de isoleucina emparejados y del producto de la aglomeración espontánea comparativa (Espont. 189Hz) que muestra al menos once picos de isoleucina emparejados, indicando que no es estructuralmente homogéneo.

Ejemplo 6: Análisis en una muestra de mamífero de la presencia de proteína priónica de conformación agregada.

El análisis de la presencia de conformación agregada, es decir, proteína priónica asociada a la enfermedad en un mamífero se hizo usando diluciones seriadas de Sc237 BH al 5% en vol/vol. La dilución de la muestra se añadió a proteína priónica de conformación natural de hámster al 10% en peso/vol, p. ej., shNBH. Partes alícuotas de la

composición se sometieron a 144 ciclos de 60 s de fuerza de cizalladura y 9 min de fase de reposo sin agitación a 37°C. Se usó una matriz de 12 dispositivos como antes, con las velocidades de rotación controladas de 1.000 rpm a 16.000 rpm, controladas en un intervalo de 1 Hz. Se digirieron partes alícuotas de muestras con proteinasa K de 5 a 50 µg/ml a 37°C durante 30 min y se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western.

5 Ejemplo 6. Dispositivo para la generación de fuerza de cizalladura controlada usando sonotrodo

Este ejemplo muestra una realización actualmente preferida para la aplicación de fuerza de cizalladura controlada al volumen interior de recipientes de reacción usando ultrasonidos.

10 Como se muestra en la figura 13, la superficie 40 de un sonotrodo 40 forma la pared inferior de un baño de líquido de transferencia. Las paredes laterales 42 del baño de líquido de transferencia están dispuestas de una forma a prueba de fluidos para el sonotrodo 41, p. ej., mediante separadores de sellado 43. El baño de líquido de transferencia está adaptado para proporcionar un espesor del líquido de transferencia que corresponde a la longitud de onda de la frecuencia de resonancia del sonotrodo 41 mediante las paredes laterales 42 que se extienden a la longitud de onda de la frecuencia de resonancia del sonotrodo 41 en perpendicular a la superficie del sonotrodo 40. Por consiguiente, el nivel de líquido de transferencia se ajusta previamente mediante las paredes laterales 42 cuando se llena el baño con el líquido de transferencia, usando, p. ej., la tubería de llenado 44. Preferiblemente, el dispositivo tiene una salida 45 para que el líquido de transferencia que sobrepasa el borde de las paredes laterales 42. El sonotrodo 41 está acoplado a un accionador y unidad convertidora 46. Cada uno de los recipientes de reacción 31 se coloca a una distancia de la superficie del sonotrodo 40. Cada uno de los recipientes de reacción es mantenido en un dispositivo de pinzamiento 50 de un soporte 51 que preferiblemente es parte de un dispositivo de colocación controlada, el cual preferiblemente es controlado por ordenador, p. ej., teniendo un servo-accionador para la colocación precisa de los recipientes 31. Como se representa, en una realización sencilla para la colocación de los recipientes 31, los soportes 51 son guiados, p. ej., en un agujero roscado 53 provisto a una distancia sobre el líquido de transferencia y a una separación del sonotrodo 41. El agujero roscado puede estar dispuesto, p. ej., en una cubierta 54 sobre el baño de líquido de transferencia. Preferiblemente la cubierta 54 está vibracionalmente desacoplada del sonotrodo 41 y las paredes 42, p. ej., disponiendo la cubierta 54 sobre un soporte que está separado del sonotrodo 41 y de las paredes laterales 42.

La disposición del soporte 51 en un agujero de guía 53 permite la colocación precisa y de forma repetida del recipiente 31 en relación con el generador de fuerza de cizalladura, en esta realización representada por el sonotrodo 41.

30 La figura 14 muestra con mayor detalle que cada recipiente de reacción 31 es sostenido en un medio de pinzamiento 50 que está montado sobre el soporte 51. El recipiente de reacción 31 contiene una cara de apoyo 52, contra la que el recipiente de reacción 31 se coloca para proporcionar una posición reproducible del recipiente de reacción 31 en cada soporte 50. Preferiblemente el soporte 51 es parte de un dispositivo de colocación controlada por ordenador, p. ej., un brazo robótico.

35 Lista de números de referencia:

1 elemento rotativo

2 eje

3 primer punto de apoyo

4 segundo punto de apoyo

40 5 recipiente

6 perforación

7 soporte

8 tapa

10 primer elemento de acoplamiento

45 11 accionador

12 segundo elemento de acoplamiento

13 unidad de control

14 sensor

20 tubo

- 21 abertura de salida
- 22 tubo polimérico
- 23 hombro
- 24 camisa
- 5 25 hombro interior
- 30 carcasa
- 31 recipiente
- 40 superficie del sonotrodo, superficie del dispositivo de ultrasonidos
- 41 sonotrodo, dispositivo de ultrasonidos
- 10 42 pared lateral
- 43 separador
- 44 tubería de llenado
- 45 salida para el líquido de transferencia
- 46 accionador y unidad convertidora
- 15 50 medio de pinzamiento
- 51 soporte
- 52 cara de apoyo
- 53 agujero roscado
- 54 cubierta
- 20

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la producción de proteína priónica de conformación agregada a partir de proteína priónica de conformación natural poniendo en contacto la proteína priónica de conformación natural con proteína priónica de conformación agregada en una composición líquida, y sometiendo la composición líquida a al menos un ciclo que comprende la generación de fuerza de cizalladura y una fase de reposo, caracterizado porque la fuerza de cizalladura se aplica a cada elemento de volumen de la composición líquida y consiste en una intensidad uniforme de la fuerza de cizalladura que tiene un intervalo de intensidad como máximo de 10% de un valor de fuerza de cizalladura.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuerza de cizalladura se genera por rotación de un elemento rotativo dispuesto dentro de un tubo coaxial separado y cada elemento de volumen pasa entre el elemento rotativo y el tubo mientras la rotación se controla a una velocidad con un intervalo como máximo de 1% de la velocidad.
- 15 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el tubo es una sección de pared de sección transversal circular de un recipiente que contiene la composición líquida, y el elemento rotativo rota sobre un eje que está dispuesto de forma coaxial dentro de la sección de pared del recipiente.
- 20 4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el tubo está fijado a una camisa que contiene un punto de apoyo en el que un eje unido al elemento rotativo rota y cada elemento de volumen pasa entre el elemento rotativo y el tubo mientras la rotación se controla a una velocidad con un intervalo como máximo de 1% de la velocidad, y cada elemento de volumen sale por al menos una abertura de salida dispuesta entre el tubo y la camisa, teniendo la abertura de salida una sección transversal de al menos la sección transversal entre el elemento rotativo y el tubo.
- 25 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuerza de cizalladura se genera mediante un dispositivo de ultrasonidos y un recipiente que tiene un volumen interior que se extiende solo para un elemento de volumen se dispone a la distancia de la superficie del dispositivo de ultrasonidos y en paralelo solo a la sección de la superficie, en la que la fuerza de cizalladura ultrasónica máxima se controla a un intervalo como máximo de 10% del máximo.
- 30 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizada porque el dispositivo de ultrasonidos vibra a su frecuencia de resonancia y el volumen interior entero del recipiente se dispone a una distancia predeterminada del dispositivo de ultrasonidos y de forma equidistante entre dos nodos de vibración del dispositivo de ultrasonidos.
- 35 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes para el análisis de una muestra que procede de un mamífero, caracterizado porque la muestra contiene la proteína priónica de conformación agregada y porque después de aplicar la fuerza de cizalladura se detecta un aumento de la proteína priónica de conformación agregada.
- 40 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque se toman al menos dos partes alícuotas de la composición líquida, a cuyas partes alícuotas se les aplica simultáneamente la misma o diferente fuerza de cizalladura a cada una, de intensidad uniforme.
- 45 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se añade un compuesto a una primera parte alícuota de la composición líquida, una segunda parte alícuota permanece sin adición del compuesto, y porque después de la aplicación de la fuerza de cizalladura, se detecta un cambio de la proteína priónica de conformación agregada en la primera parte alícuota en relación con la proteína priónica de conformación agregada en la segunda parte alícuota.
- 50 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la composición líquida está contenida en un recipiente de reacción (31) y el recipiente de reacción (31) es sostenido de forma liberable mediante un dispositivo de colocación controlada y es colocado en una primera posición durante la generación de la fuerza de cizalladura y es colocado en una segunda posición que está separada de la primera posición durante una fase de reposo, por el dispositivo de colocación controlada.
- 55 11.- Uso de un dispositivo como un generador de fuerza de cizalladura de intensidad controlada en un procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende un generador de fuerza de cizalladura dispuesto para ejercer una fuerza de cizalladura a cada elemento de volumen de una composición líquida que contiene proteína priónica de conformación natural y proteína priónica de conformación agregada, caracterizado porque el generador de fuerza de cizalladura se controla para generar una fuerza de cizalladura que actúa en cada elemento de volumen de la composición líquida solo con una intensidad de la fuerza de cizalladura uniforme que está limitada a un intervalo de intensidad como máximo de 10% de una intensidad.
- 12.- Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque el generador de fuerza de cizalladura comprende un tubo (20) y un elemento rotativo (1) coaxial dispuesto a lo largo del eje longitudinal del tubo (20) a una separación del tubo (20), el elemento rotativo (1) funciona sobre puntos de apoyo (3, 4), y al menos una abertura de salida (21)

dispuesta entre el tubo (1) y los puntos de apoyo (3,4), teniendo la abertura de salida (21) una sección transversal de al menos la sección transversal entre el elemento rotativo (1) y el tubo (20).

5 13.- Uso según la reivindicación 12, caracterizado porque el elemento rotativo (1) está fijado a un extremo de un eje coaxial (2), cuyo eje (2) está dispuesto en un primer punto de apoyo (3) formado por un tubo de polímero de bajo rozamiento (22) dispuesto alrededor de una sección del eje (2) y dispuesto dentro de una camisa (24), en donde el tubo de polímero de bajo rozamiento (22) está dispuesto entre un hombro (23) del eje (2) y un hombro interior (25) de la camisa (24).

10 14.- Uso según la reivindicación 11, caracterizado porque el generador de fuerza de cizalladura comprende un dispositivo de ultrasonidos y un recipiente que tiene un volumen interior que se extiende solo para un elemento de volumen que está dispuesto a una distancia de la superficie del dispositivo de ultrasonidos y en paralelo a la sección de la superficie solo, en el que la fuerza de cizalladura ultrasónica máxima se puede controlar en un intervalo como máximo de 10% de la fuerza de cizalladura máxima.

15 15.- Uso según la reivindicación 14, caracterizado porque el dispositivo de ultrasonidos tiene una superficie del dispositivo de ultrasonidos (40) que forma una pared de un baño de líquido de transferencia, y la altura del baño de líquido de transferencia en perpendicular a la superficie (40) se ajusta previamente a una longitud de onda o un múltiplo entero del ultrasonido.

20 16.- Uso según una de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado porque el dispositivo comprende un aparato de colocación controlada que tiene un medio de pinzamiento (50) para sostener un recipiente de reacción (31), cuyo aparato de colocación está adaptado para la colocación del recipiente de reacción (31) en una posición predeterminada en relación con el generador de fuerza de cizalladura.

25 17.- Uso según la reivindicación 16, caracterizado porque el aparato de colocación controlada está adaptado para la colocación repetida de los recipientes de reacción (31) en una primera posición predeterminada en relación con el generador de fuerza de cizalladura durante una fase en la que se genera la fuerza de cizalladura y para la posterior retirada de los recipientes de reacción (31) de la primera posición y colocación de los recipientes de reacción (31) en una segunda posición separada durante la fase de reposo.

18.- Proteína priónica de conformación agregada que se puede obtener por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque la proteína priónica de conformación agregada es de una secuencia de aminoácidos.

30 19.- Proteína priónica de conformación agregada según la reivindicación 18, caracterizada por tener una conformación en estado agregado homogénea en RMN de <sup>13</sup>C.

20.- Proteína priónica de conformación agregada según una de las reivindicaciones 18 y 19, caracterizada porque la conformación agregada se detecta como una banda de producto en una transferencia Western de la proteína digerida por proteasa.

Fig. 1

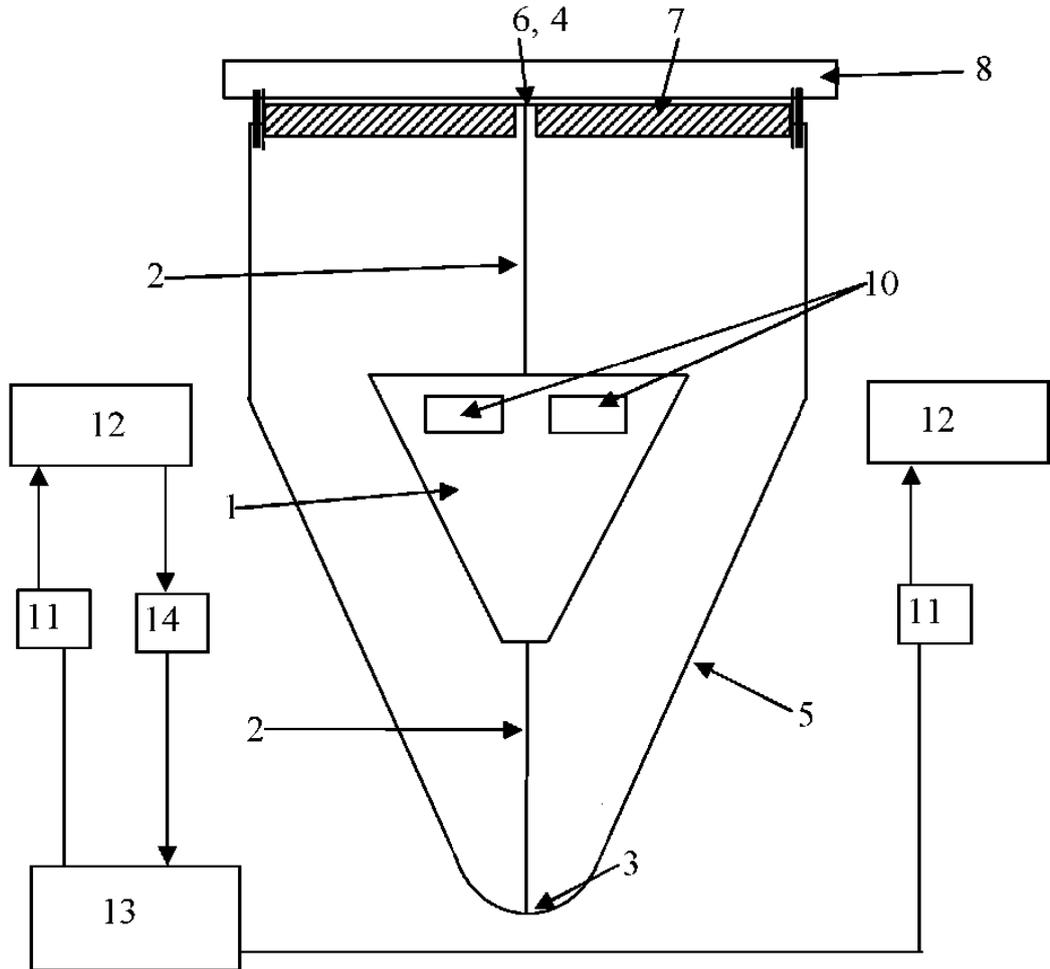


Fig. 2

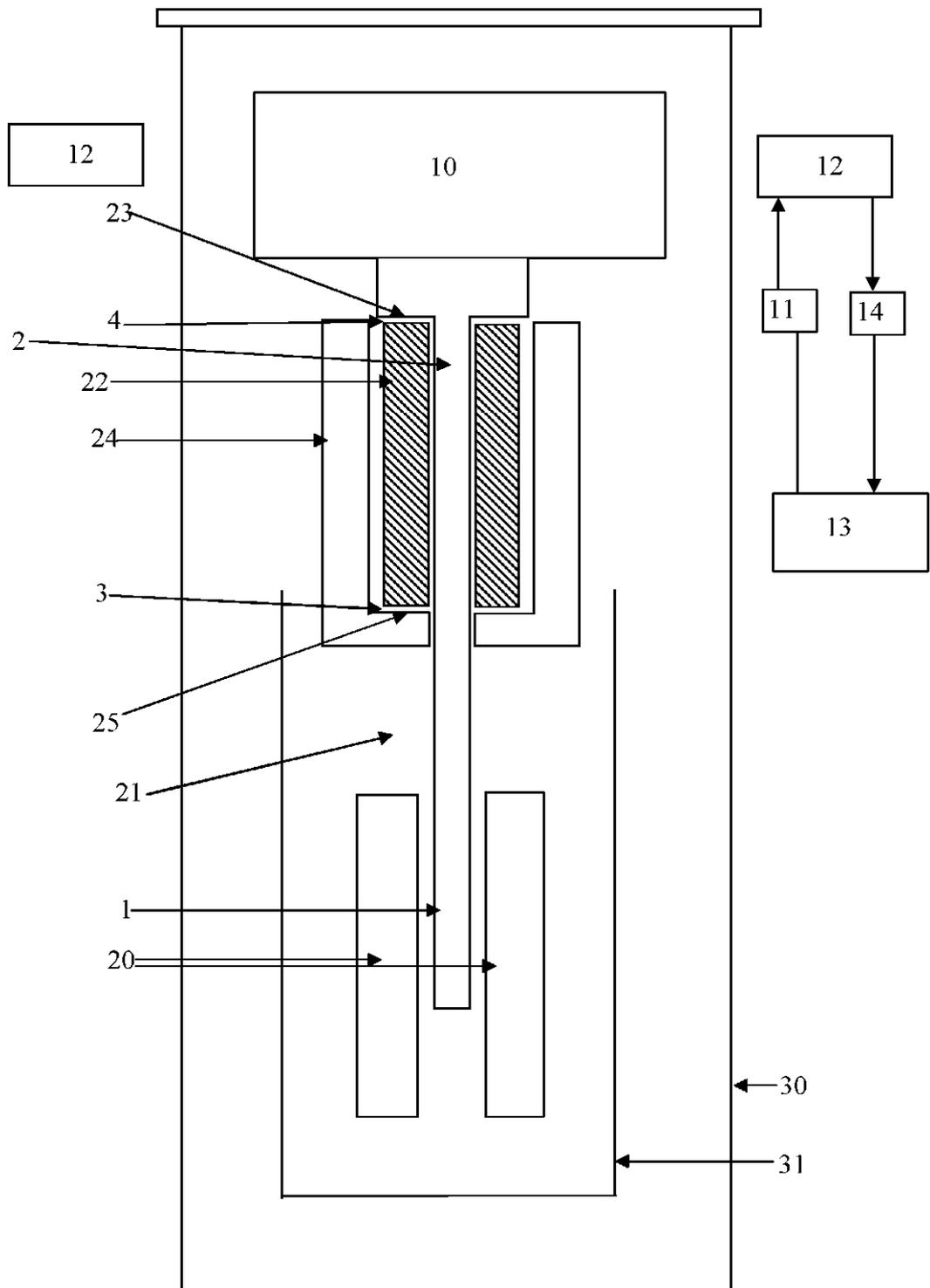


Fig. 3A

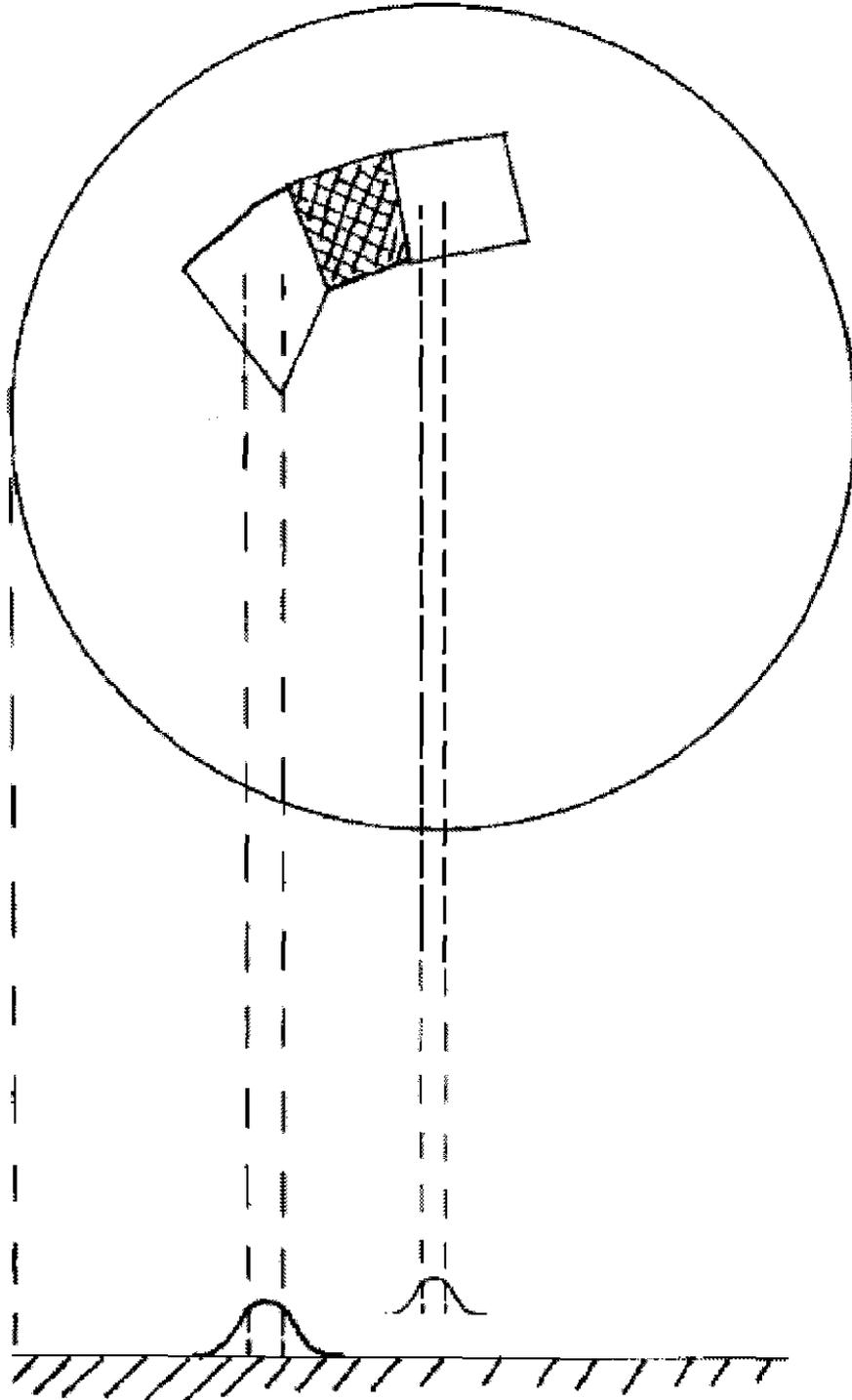


Fig. 3B

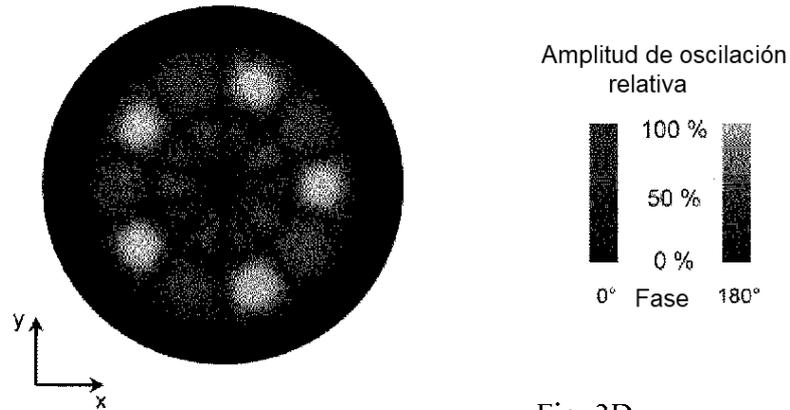


Fig. 3C

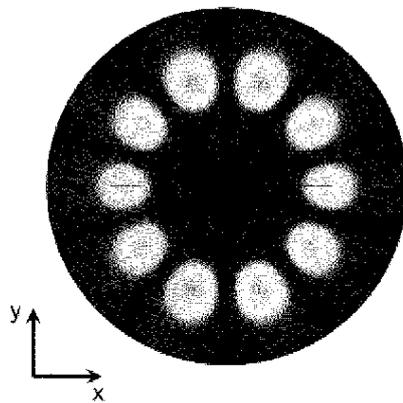


Fig. 3D

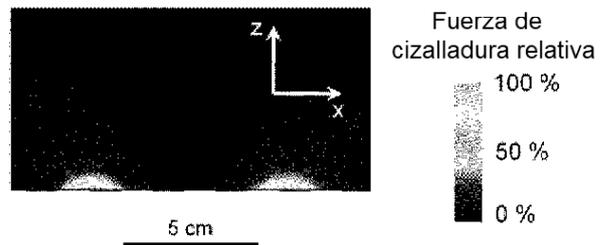


Fig. 4

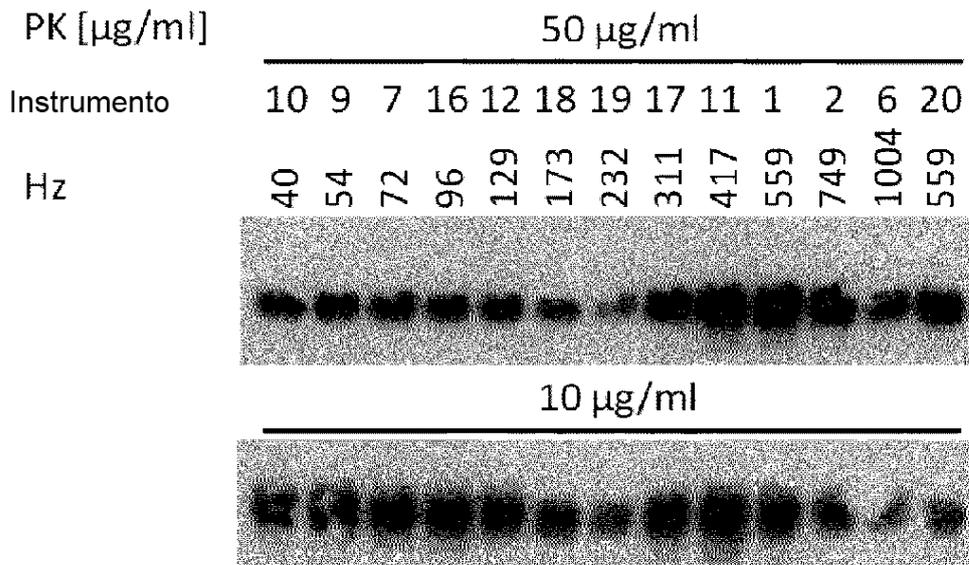


Fig. 5

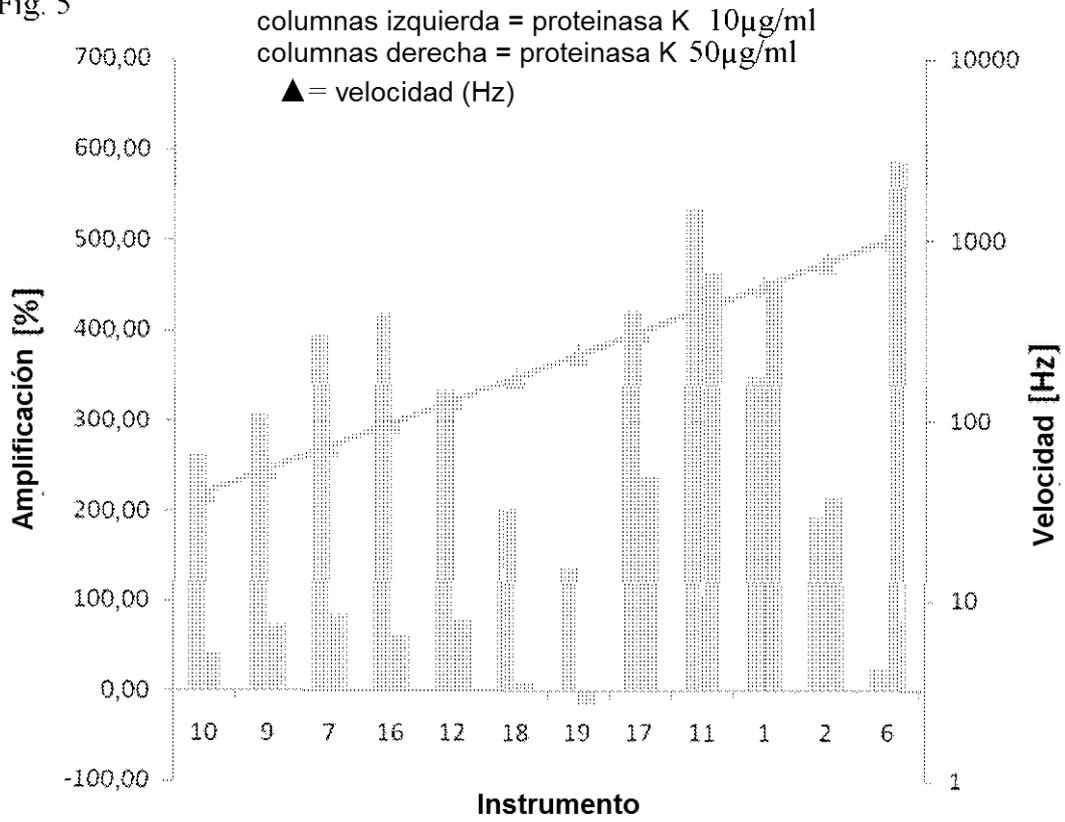


Fig. 6A

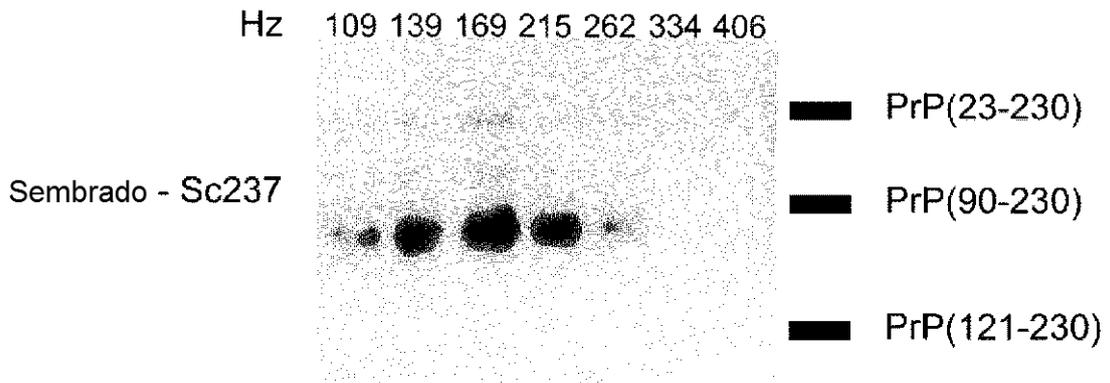


Fig. 6B

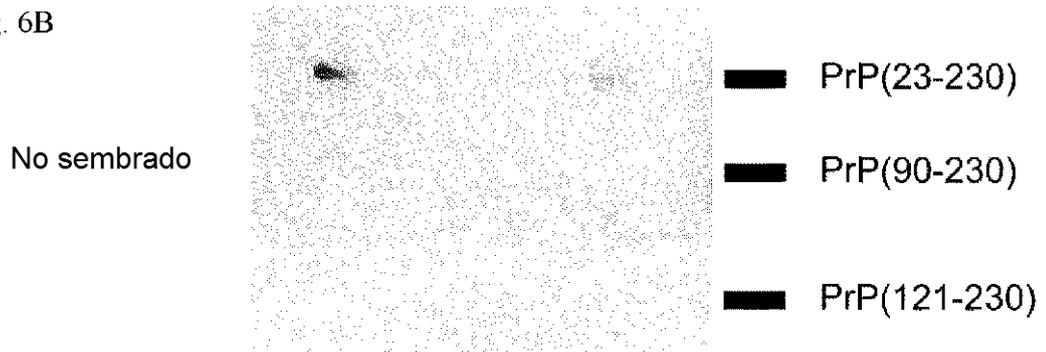


Fig. 8

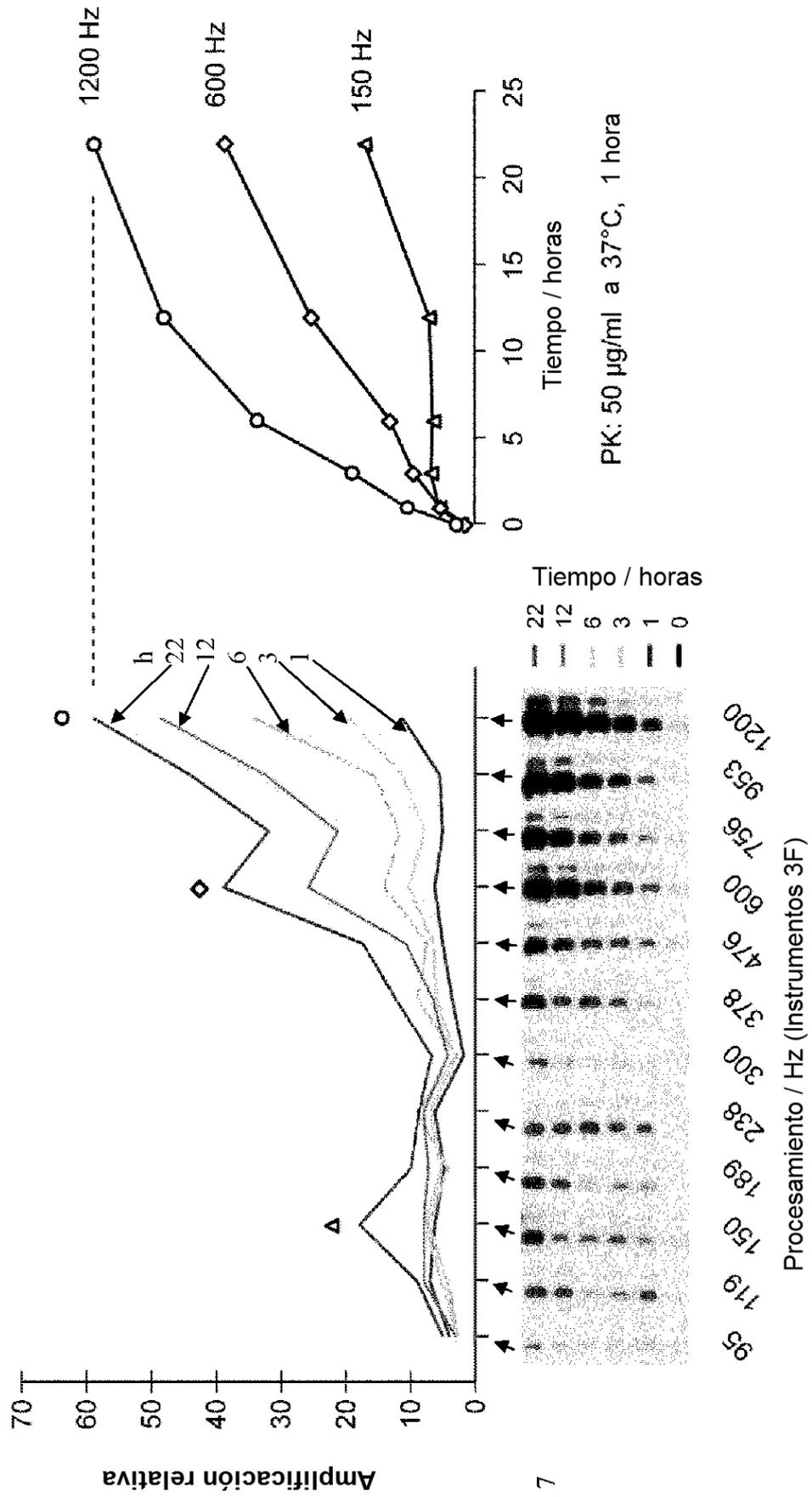


Fig. 9

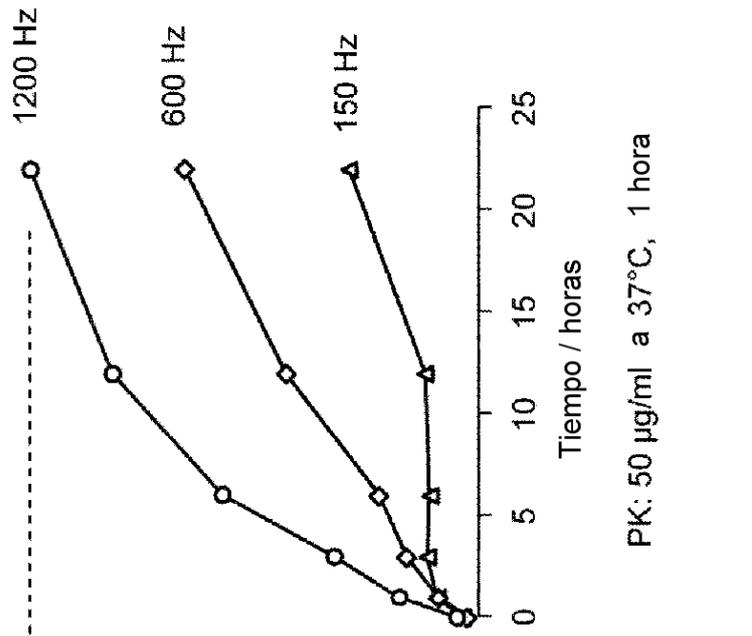


Fig. 7

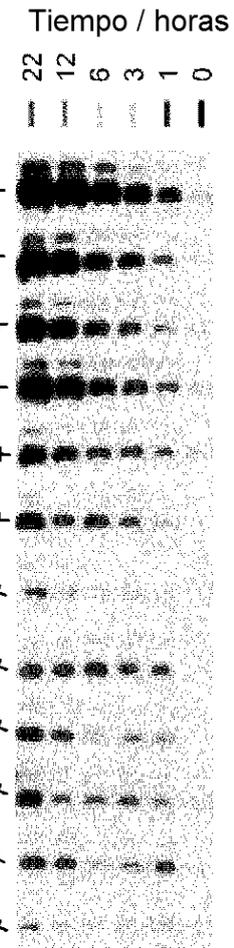
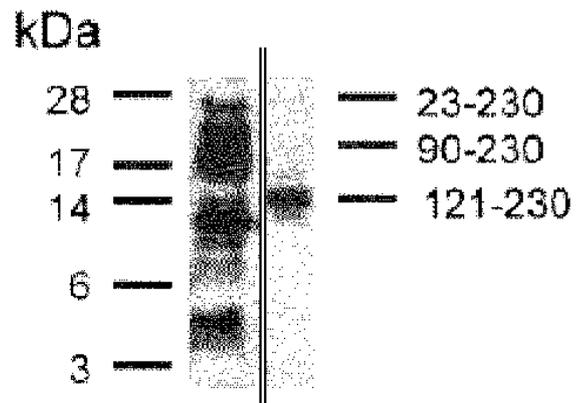


Fig. 10



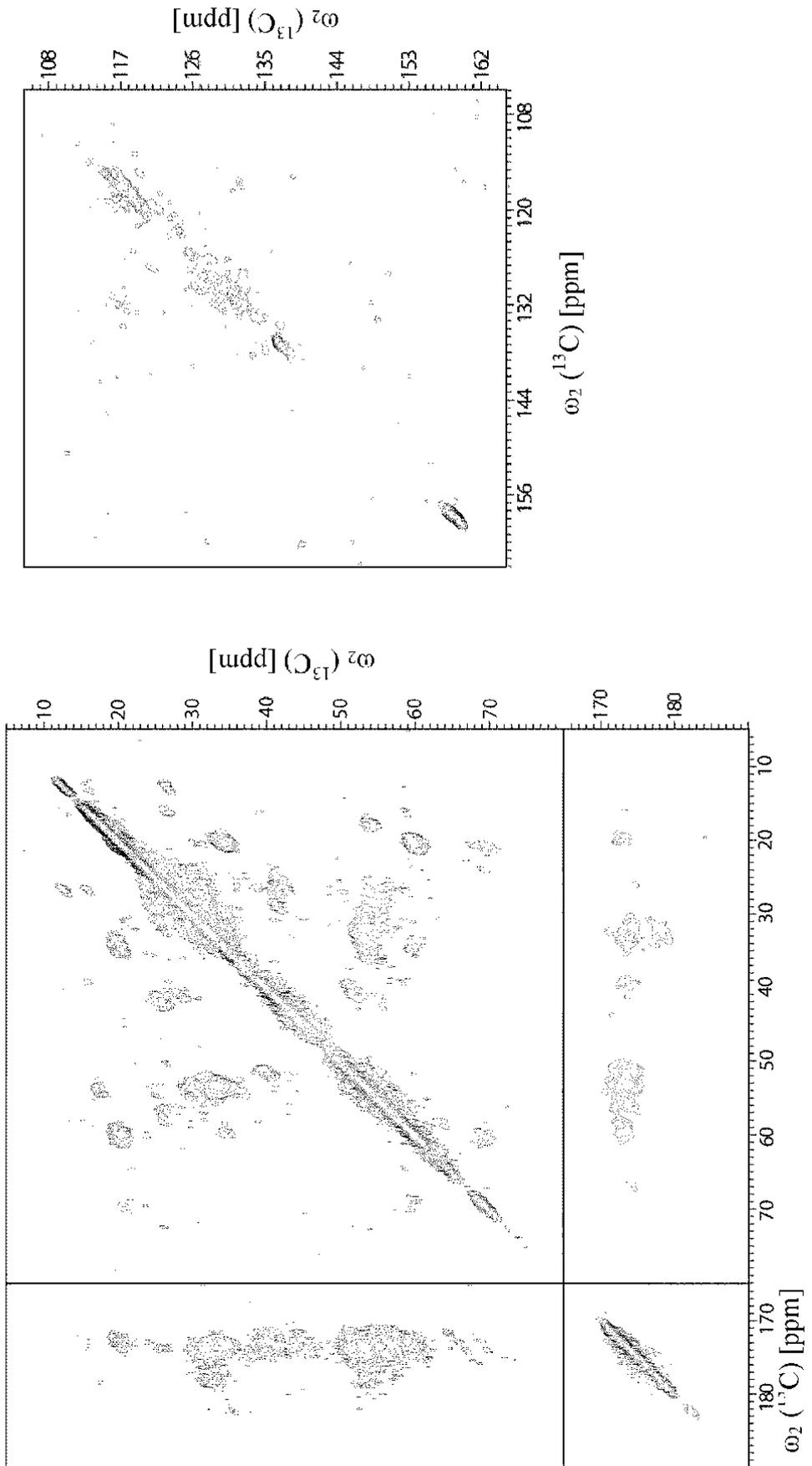


Fig. 11

Fig. 12

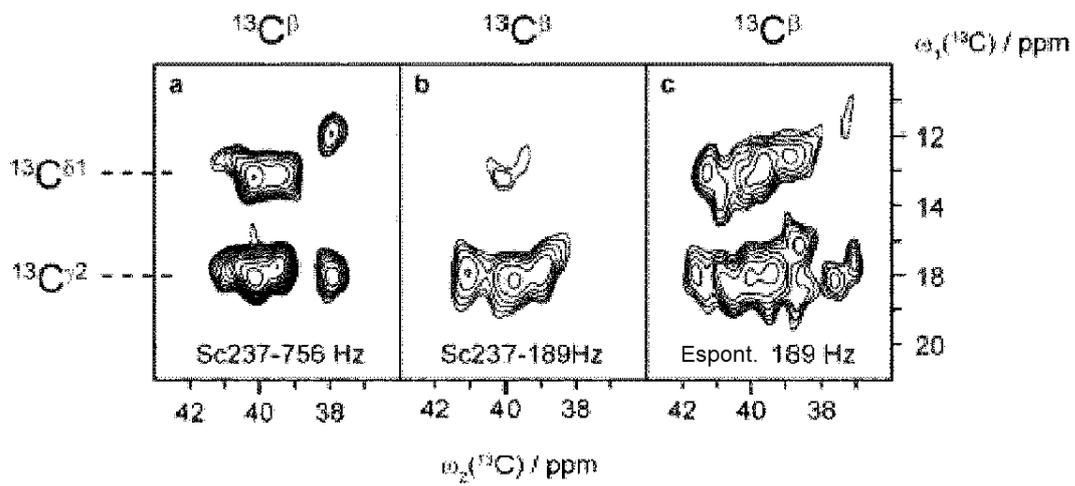
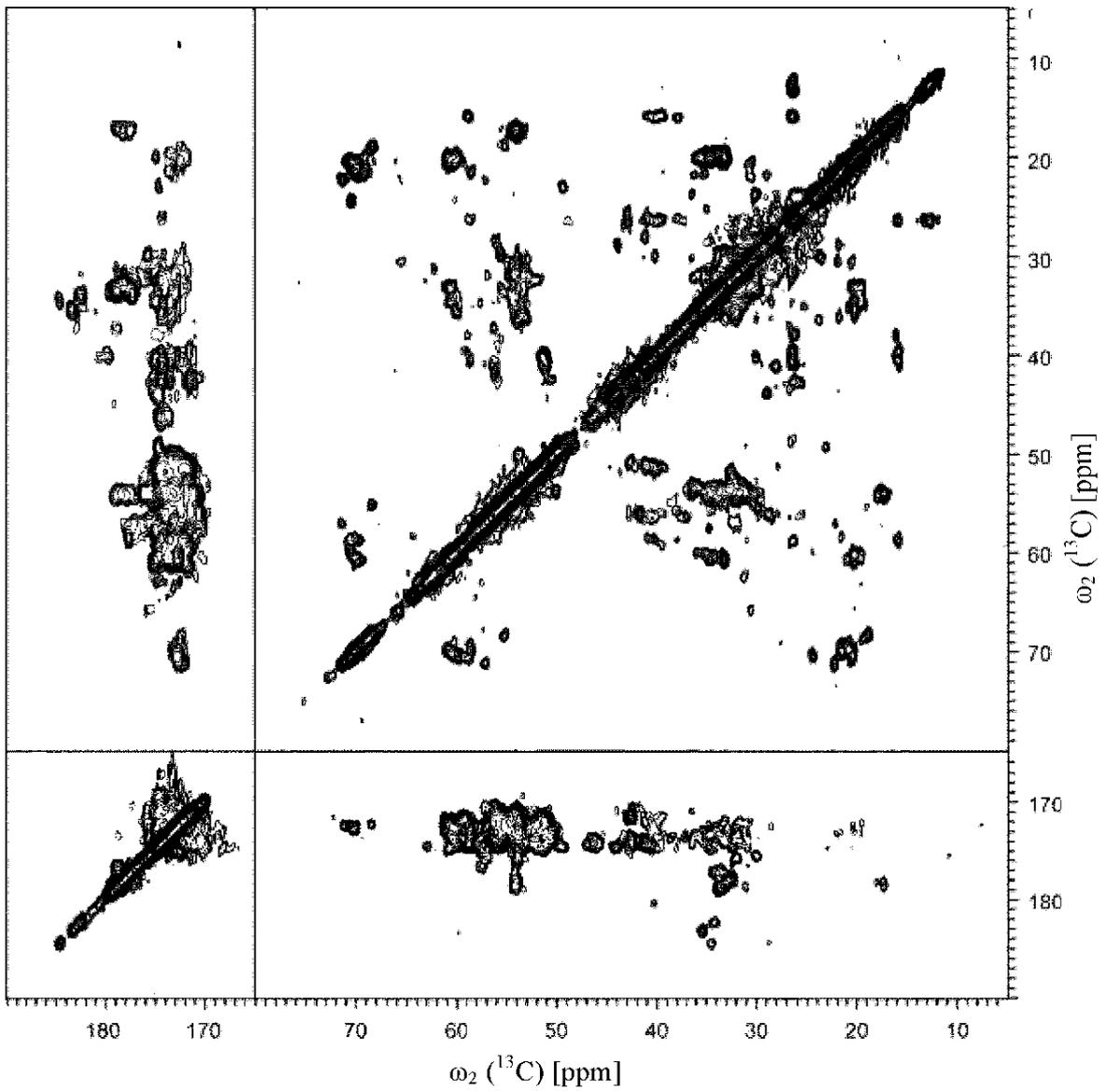


Fig. 13

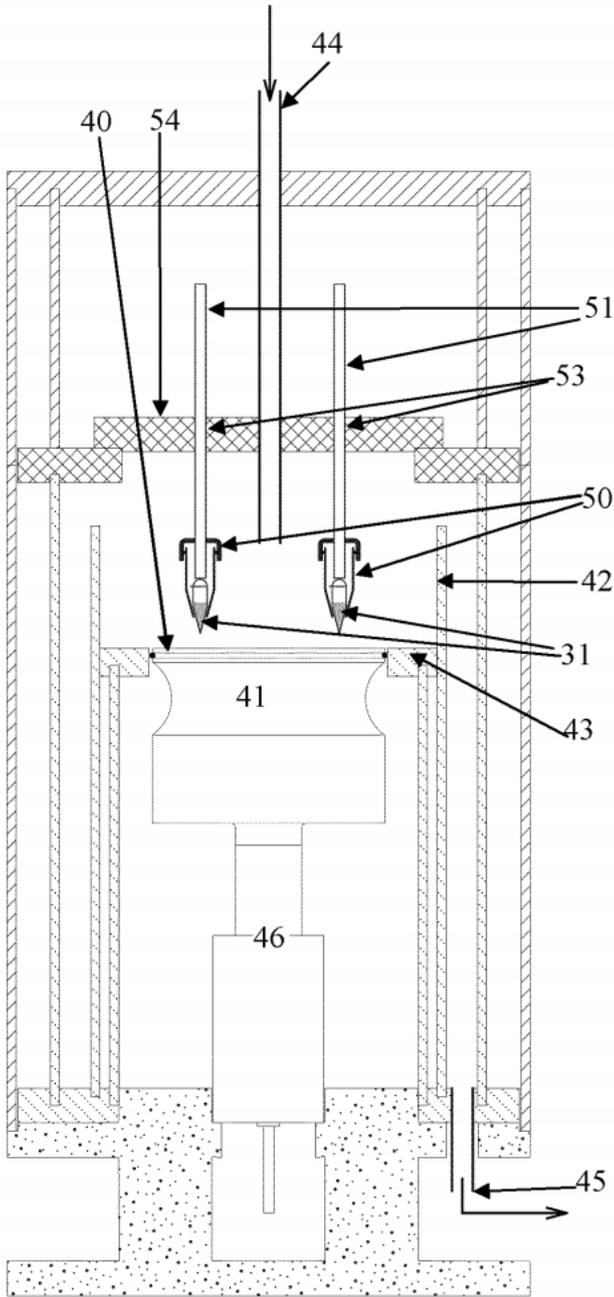


Fig. 14

