

# CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com  
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4 No. 72 - 35  
BOGOTA 8, COLOMBIA

59 57  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicacion : 00229093 00000002  
Fecha REC.: 2000-07-14 17:27:18  
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLEMEN  
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES  
Folios: 62

Señora Jefe de la  
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
E. S. D.

Referencia : Expediente No. 00.029.093  
Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH  
Asunto : Solicitud de patente para: "PROCEDIMIENTO  
PARA EL DIAGNOSTICO DE ENCEFALOPATIAS  
ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES"  
Fecha de solicitud : 19 de abril de 2000

**TRAMITE: 002 - EVENTO: 001 - ACTUACION: 329**

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado de la solicitud en referencia, atentamente presento con este escrito la copia certificada de la solicitud de patente alemana No. 199' 18 141.1 del 21 de abril de 1999, junto con la traducción de su descripción, reivindicaciones y certificaciones de la cual se reclama prioridad en esta solicitud de patente.

2. Ruego a la Señora Jefe se sirva aceptar este escrito con sus anexos, y se continúe con el trámite de la solicitud.

Bogotá, 14 JUL. 2000  
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO  
T.P.A. No. 31.929

COLO 04484-801-006-0  
MRE-54



**Bescheinigung**

Die BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH in Ingelheim am Rhein/  
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Diagnose von übertragbaren Spongiformen  
Enzephalopathien"

am 21. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

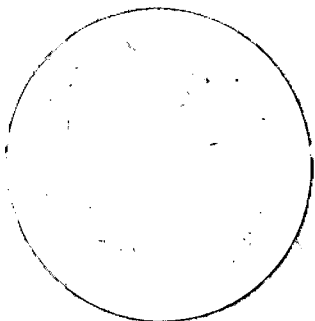
Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-  
chen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
C 12 Q, C 12 N und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 14. März 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**  
Im Auftrag



Aktenzeichen: 199 18 141.1

6/59

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

**Verfahren zur Diagnose von  
Übertragbaren Spongiformen  
Enzephalopathien**

6200

## Verfahren zur Diagnose von Übertragbaren Spongiformen Enzephalopathien

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien sowie ein diagnostisches Testkit unter Verwendung von Prionen-Protein-spezifischen Antikörpern. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung des Verfahrens oder des Testkits zur Diagnose von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien.

Bereits vor 250 Jahren wurde eine Krankheit von Schafen entdeckt, die einherging mit Nervosität, Juckreiz und Ataxie und die schließlich mit Lähmung und dem Tod endete. Die Krankheit ist heute bekannt als „Scrapie“ in englischsprachigen Ländern (da die Tiere sich an Pfosten und Bäumen reiben, um den Juckreiz zu unterdrücken), „la tremblante“ in Frankreich und „Traberkrankheit“ in Deutschland. Diese Namen reflektieren die Bandbreite der Symptome. „Scrapie“ wurde als der Prototyp einer Gruppe von Krankheiten untersucht, die nicht nur Tiere befallen, sondern auch Menschen: die übertragbaren oder Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (engl. transmissible spongiform encephalopathies = TSE). TSEs sind tödlich verlaufende neurodegenerative Krankheiten, die eine Vielzahl von Säugetieren befallen können.

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) ist eine neurodegenerative Krankheit in Rindern und ist verwandt mit „Scrapie“ von Schafen und Ziegen und der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen. Ein wirtskodiertes, membranassoziiertes Glykoprotein von unbekannter Funktion, das sogenannte Prionenprotein PrP, spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Krankheiten. Diese zelluläre Isoform wird besonders stark auf neuronalen Zellen exprimiert, ist jedoch auch mit unterschiedlicher Frequenz auf nicht-neuronalen Zellen detektierbar. Gegenüber Verdau mit spezifischen Enzymen (Proteasen) ist dieses Membranprotein sensitiv (PrP-sen). Protease-resistent dagegen ist die lösliche, maligne Form von PrP (PrP-res), die in den Gehirnen von BSE-infizierten Tieren zu amyloiden Plaques akkumuliert. Diese PrP-res Form ist ausschließlich mit allen TSE-Krankheiten einschließlich BSE assoziiert und kann von TSE/BSE infizierten Hirn-Geweben extrahiert werden.

Die ungewöhnlichen Eigenschaften des Scrapie/BSE Erregers gaben früh Anlaß zu Spekulationen, daß der Erreger ausschließlich aus Nukleinsäure oder aus Proteinen besteht oder weder Nukleinsäure noch Proteine beinhaltet und ein Polysaccharid oder ein

Membranfragment ist. Die augenblicklich am meisten diskutierten Vorstellungen sind die „Nur-Protein“-Hypothese und die Virus/Virino-Hypothese:

Die „Nur-Protein“ Hypothese beruht darauf, daß das infektiöse Prion PrP-res keine Nukleinsäure enthält und selbstreplizierend ist. Es wird spekuliert, daß PrP-res an PrP-sen  
5 bindet und diese dadurch zur malignen Isoform konvertiert. Die Konformation dieser malignen Isoform ist geprägt von Beta-Faltblatt-Strukturen, während bei der zellulären Isoform die Alpha-Helices überwiegen. Die Virus/Virino-Hypothese beruht darauf, daß das infektiöse Agens aus viraler Nukleinsäure besteht (möglicherweise RNS) und daß das Prionenprotein eine Hülle für das Virusgenom ist. Der Wirts-Ursprung der Prionen-Hülle  
10 würde das Fehlen der immunologischen und entzündlichen Reaktionen erklären. Die Existenz einer Nukleinsäure würde zudem die zur Zeit beschriebenen etwa 20 verschiedenen Scrapie-Maus-Stämme erklären.

Die zelluläre Isoform PrP-sen ist an zwei Asparaginpositionen glykosyliert, hat ein Molekulargewicht von 33-35000 Da und ist an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran  
15 durch ein Phosphatidyl-Inositol Glykolipid verankert, welches an seiner Carboxy-terminalen Aminosäure befestigt ist. Die höchste Expressionsrate von PrP-sen wird im Gehirn gemessen, jedoch wird das Gen auch im nicht-neuronalen embryonalen und adulten Gewebe exprimiert. Die biologische Funktion des Proteins ist bis heute unklar. Diskutiert wird u.a., daß PrP Rezeptor für neurotrophe Differenzierungsfaktoren sein könnte. Auch wird dieses  
20 Protein mit dem Schlaf-/Wachrhythmus in Zusammenhang gebracht. PrP könnte aber auch Rezeptor für neurotrophe Viren sein.

Die normale zelluläre Isoform des Proteins wird vollständig durch Proteasen degradiert (PrP-sen). Die maligne Isoform (PrP-res) hingegen wird durch Proteasen zu einem 27-30000 Da Fragment abgebaut, das noch vollständig infektiös ist (PrP-res). Dem PrP-res  
25 fehlen die ersten 67 Aminosäuren des reifen PrP-sen Proteins. Ein post-transkriptioneller Prozeß steht im Zusammenhang mit der Konversion von PrP-sen zu PrP-res, und es wird vermutet, daß der einzige Unterschied zwischen PrP-sen und PrP-res ein Unterschied in der dreidimensionalen Raumstruktur ist. Es scheint kein biochemischer Unterschied zwischen der normalen und der abnormalen Form des Proteins zu existieren. Dies erklärt auch, daß  
30 beide Isoformen keinen antigenen Unterschied zeigen. Weiterhin haben PrP-sen und PrP-res eine gemeinsame Aminosäuresequenz. PrP wird von einer einzelnen Kopie eines chromosomalen Genes kodiert und ist hochkonserviert in Säugetieren. Die vollständige PrP-kodierende Sequenz ist in einem einzigen Exon enthalten.

Im Gegensatz zu PrP-sen, welches an der Oberfläche exprimiert wird, akkumuliert PrP-res in zytoplasmatischen Vesikeln, von welchen viele sekundäre Lysosomen sind.

TSE-Krankheiten sind durch eine lange Inkubationszeit gekennzeichnet, während der keine klinischen Symptome beobachtet werden. Es schließt sich eine kurze klinische Phase an, die unweigerlich zum Tod führt.

„Scrapie“ und BSE wurden bisher mit histopathologischen, klinischen und epidemiologischen Methoden diagnostiziert, da natürlich infizierte Tiere wahrscheinlich nicht serologisch auf PrP-res reagieren und die Diagnose durch Labortierinokulation bis zu 18 Monaten dauern kann. Die klinische Diagnose erfolgt *post mortem* durch histopathologische Untersuchungen des Gehirns. Der BSE Status wird unterteilt in: BSE-positiv, BSE-negativ und BSE-vermutet („suspected“). Tiere, die als BSE-vermutet gelten, zeigen dieselben klinischen Auffälligkeiten wie BSE-positive Tiere. Der histopathologische Nachweis von BSE ist aber zum Zeitpunkt der Untersuchung (noch) negativ. Möglicherweise ist jedoch dieser „BSE-vermutete“ Zustand ein „prä-BSE-positiver“-Zustand.

Die oben erwähnten aufwendigen diagnostischen Methoden beinhalten die mikroskopische Untersuchung von z.B. BSE-spezifischen Vakuolen der Neuronen und des Neuropils, Astrozytose, neuronalem Verlust und der Ablagerung abnormaler Aggregate von PrP-res, auch bekannt als „Scrapie“-assoziierte Fibrillen (SAF). SAF können *in situ* durch Immunohistochemie oder Histoblots und in behandelten Extrakten des befallenen Gehirns durch Western-blotting, Dot-Blots, oder als typische Fibrillen-Aggregate durch negative Färbung in der Transmissionselektronenmikroskopie bestimmt werden.

Ein weiterer Ansatz, um BSE indirekt zu diagnostizieren, ist die Analyse von zerebrospinaler Flüssigkeit. Neurologische Krankheiten gehen mit qualitativen und quantitativen Veränderungen im Protein-Metabolismus innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) einher und diese werden in einer veränderten Zusammensetzung der zerebrospinalen Flüssigkeit (ZSF) widerspiegelt. Unter Verwendung von zweidimensionaler Gel-Elektrophorese ist es möglich, Markerproteine zu finden, welche mit der Krankheit korrelieren. Solche möglichen Marker (nur ein indirekter Nachweis von BSE) wurden erst in einer späten Phase der Inkubationsperiode von experimenteller BSE bestimmt. Aus vergleichenden Experimenten mit Proben von Creutzfeldt-Jakob-Patienten weiß man jedoch, daß dieser Marker auch bei Alzheimer-Patienten zu finden ist. Die Alzheimer Erkrankung gilt als nicht-transmissible spongiforme Enzephalopathie.

Selbst wenn einfachere Methoden für deren Nachweis entwickelt würden, wäre es unwahrscheinlich, daß solche Tests von Vorteil für die Diagnose von präklinischer BSE sind.

Im Stand der Technik werden Verfahren zur Herstellung von synthetischen Polypeptiden mit Antigen determinanten von Prionen-Protein (WO 93/11155, WO93/23432), für natives „Scrapie“-Prionenprotein spezifische Antikörper (WO97/10505), sowie Methoden zum Nachweis von „Scrapie“ in Schafen (WO97/37227) beschrieben. Korth *et al.* (1997, Nature 390: 74-77) beschreiben einen monoklonalen Antikörper aus Mäusen, der zwischen der zellulären (PrP<sup>c</sup>) und der „Scrapie“-Isoform (PrP<sup>sc</sup>) unterscheiden kann.

10

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt darin, ein Verfahren zur Diagnose von präklinischen oder klinischen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung im Rahmen der Beschreibung und der Patentansprüche durch ein Verfahren zur Diagnose von präklinischen oder klinischen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien, gelöst werden.

Das Verfahren beruht erfindungsgemäß darauf, daß

- a) man einem lebenden Säuger eine Blutprobe entnimmt
- b) aus dieser Blutprobe Zellen anreichert
- 20 c) in den angereicherten Zellen die Expression eines Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien bestimmt
- d) den erhaltenen Wert mit einem Kontrollwert vergleicht.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die angereicherten Zellen homogenisiert.

25 Die präklinische Phase übertragbarer spongiformer Enzephalopathien ist die lange Inkubationszeit nach Infektion mit dem Prionen-Protein ohne äußere klinische Symptome. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es insbesondere, übertragbare spongiforme Enzephalopathien während dieser Phase ohne äußere klinische Symptome zu diagnostizieren. Somit erlaubt die vorliegende Erfindung auch die Diagnose bei Säugern, bei denen übertragbare spongiforme Enzephalopathien vermutet werden, bei denen jedoch der  
30 histopathologische Befund zum Zeitpunkt der Untersuchung (noch) negativ ist (TSE-vermutet bzw. TSE-suspected, siehe auch die Beschreibung oben für BSE). Die klinische Phase ist die kurze Phase klinischer Symptome, die sich an die präklinische Phase anschließt

6664

und bisher aufgrund des Fehlens einer Therapie unweigerlich zum Tod des infizierten Säugers führt. Auch während dieser Phase können aufgrund der technischen Lehre der vorliegenden Erfindung übertragbare spongiforme Enzephalopathien diagnostiziert werden.

Zu den übertragbaren (= transmissiblen) spongiformen Enzephalopathien (TSE) zählen vor allem die „Scrapie“ Erkrankung der Schafe, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) der Rinder sowie die Kuru-Kuru Krankheit und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen.

Die Bestimmung der Expression eines Markerproteins bedeutet, daß besagtes Markerprotein gegenüber einem Kontrollwert nachweislich erhöht oder erniedrigt ist. Nachweislich bedeutet z. B., daß das Markerprotein gegenüber dem Kontrollwert um 50 bis 100% höher oder niedriger exprimiert wird oder statistisch signifikant erhöht oder erniedrigt ist. Ein Kontrollwert oder auch Standard kann beispielsweise mit Zellen von nicht-infizierten Säugern bestimmt werden und dient zur Eichung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Verfahren hierzu sind dem Fachmann bekannt.

Markerproteine können jegliche dem Fachmann bekannten Proteine sein, die bei präklinischen oder klinischen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien nachweislich erhöht oder erniedrigt sind. Dies ist z. B. der Fall, wenn das Markerprotein bei der Kontrolle nicht nachweisbar und bei infizierten Säugern oder Säugern, bei denen eine übertragbare spongiforme Enzephalopathie vermutet wird, mit den unten erwähnten Methoden eindeutig zu identifizieren ist.

In einer besonderen Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein das Prionenprotein PrP<sup>sen</sup> ist. Das erfindungsgemäße Prionenprotein PrP<sup>sen</sup> ist die zelluläre Isoform des Prionenproteins, die oft auch als PrP<sup>c</sup> bezeichnet wird. PrP<sup>sen</sup> (sen = sensitiv) wird vollständig durch Proteasen degradiert.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) ist. In noch einer weiteren besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein bovines Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) ist. IFN $\gamma$  (z. B. Vilcek, J. and Oliveira, I.C. Int Arch Allergy Immunol 1994, 104: 311-316) sowie bovines IFN $\gamma$  (Keefe, R.G. et al, Vet Immunol Immunopathol, 1997, 56: 39-51) sind dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein der Laminin-Rezeptor (LR) oder der Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) ist. Der Laminin-Rezeptor (z. B. Grosso, L.E. et al. Biochemistry, 1991, 30: 3346-3350) und der Laminin-Rezeptor Precursor (z. B. Castronovo, V. et al, J Biol Chem 1991, 266: 20440-20446) sind dem Fachmann bekannt.

Besagte Markerproteine können mit jeglichem Verfahren bestimmt werden, die dem Durchschnittsfachmann bekannt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Markerprotein mit einem Immuntest bestimmt. In einem Immuntest werden für das Markerprotein spezifische monoklonale Antikörper oder polyklonale Antiseren verwendet, die im Stand der Technik verfügbar sind. Beispielsweise kann für das Markerprotein PrP<sup>scn</sup> der monoklonale Antikörper 13 oder auch der monoklonale Antikörper 142 eingesetzt werden (Harmeyer S. et al., J Gen Virol 1998, 79, 937-945, siehe auch Abbildung 1). Immuntests umfassen dem Fachmann bekannte Nachweisverfahren wie den ELISA-Test (Englisch: *enzyme-linked immuno-sorbent assay*) oder den sog. *Sandwich-ELISA-Test*, *Dot-Blots*, Immunoblots, Radioimmuntests (*Radioimmunoassay RIA*), Diffusions-basierter Ouchterlony-Test, oder Raketen-Immunofluoreszenz-Tests (*rocket immunofluorescent assays*). Ein weiterer Immuntest ist der sog. Western-blot (auch als Western-Transfer-Prozedur oder Western-blotting bezeichnet). Der Zweck des Western-blots ist es, durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine bzw. Polypeptide auf einen Nitrozellulosefilter oder einen anderen geeigneten Träger zu übertragen und gleichzeitig die aus der Gelelektrophorese erhaltenen relativen Positionen der Proteine bzw. Polypeptide beizubehalten. Der Western-blot wird dann mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch an das Protein bzw. Polypeptid von Interesse bindet. Diese Nachweisverfahren können vom Durchschnittsfachmann für die Ausführung der hier beschriebenen Erfindung verwendet werden. Literaturstellen in denen der Fachmann die vorgenannten sowie weitere Nachweisverfahren findet, werden im folgenden genannt: *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. The Netherlands (1986); Bullock *et al.*, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985).

In einer weiteren, ganz besonderen Ausführungsform werden die angereicherten Zellen mit Antikörpern, die für das Markerprotein spezifisch sind, inkubiert und der sich bildende Antigen/Antikörperkomplex bestimmt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren die veränderte Expression des Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien molekularbiologisch bestimmt. Diese molekularbiologischen Nachweisverfahren umfassen beispielsweise die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Northern- oder Southern-blots sein, die der Fachmann aus Standardwerken entnehmen kann (z. B. Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York und Bertram, S. und Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Markerprotein für übertragbare spongiforme Enzephalopathien mit einer reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt. Bei dieser speziellen Form der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zunächst die Gesamt-RNS isoliert, diese mittels des Enzyms „reverse Transkriptase“ revers in cDNS transkribiert, mit welcher dann die PCR-Reaktion ausgeführt wird. Dieses Nachweisverfahren ist dem Fachmann bekannt und ist in Standardwerken veröffentlicht (z. B. Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York und Bertram, S. und Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991).

Beispiele für „lebende Säuger“ sind dem Fachmann bekannt und beinhalten z. B. den Menschen, weiterhin z. B. Schafe, Ziegen, Schwein, Rinder, Rehe, Kaninchen, Hamster, Ratten und Mäuse.

In einer besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß der lebende Säuger ein Rind ist. Obwohl die Anmeldung sich im speziellen auf Verfahren zur Diagnose von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien in Rindern bezieht, ist die technische Lehre ebenso auf jedes Tier, das von dem Erreger besagter Enzephalopathien befallen werden kann, anwendbar und von der vorliegenden Erfindung umfaßt.

Die in der Blutprobe enthaltenen Zellen umfassen sämtliche aus einer hämatopoietischen Stammzellen hervorgehenden Blutzellen, beispielsweise Lymphozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten.

6967

In einer weiteren besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen Leukozyten sind. Unter Leukozyten sind beispielsweise polymorphnukleare und mononukleare Leukozyten, Mastzellen, B-Zellen bzw. B-Lymphozyten, T-Zellen bzw. T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu verstehen.

In einer weiteren ganz besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen mononukleare Leukozyten sind. Unter mononuklearen Leukozyten sind insbesondere Monozyten und Makrophagen, dendritische Zellen und Langerhans'sche Zellen zu verstehen.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen polymorphnukleare Leukozyten sind. Zu den polymorphnuklearen Leukozyten gehören die eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten.

Die Erfindung betrifft ferner ein diagnostisches Testkit zum Nachweis spongiformer Enzephalopathien, das alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression eines Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien mit einem erfindungsgemäßen Verfahren enthält.

Die Erfindung betrifft ferner insbesondere ein diagnostisches Testkit, das für ein Markerprotein für übertragbare spongiforme Enzephalopathien spezifische Antikörper enthält.

Die Erfindung betrifft ferner insbesondere ein diagnostisches Testkit, dadurch gekennzeichnet, daß die erfindungsgemäßen Antikörper polyklonal sind.

Die Erfindung betrifft ferner insbesondere ein diagnostisches Testkit, dadurch gekennzeichnet, daß die erfindungsgemäßen Antikörper monoklonal sind.

Von der Erfindung wird ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit umfaßt, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins PrP-sen mit einem erfindungsgemäßen Verfahren enthält.

Weiterhin wird von der Erfindung ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit umfaßt, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins IFN $\gamma$  mit einem erfindungsgemäßen Verfahren enthält.

Weiterhin wird von der Erfindung ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit umfaßt, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins bovines IFN $\gamma$  mit einem erfindungsgemäßen Verfahren enthält.

5 Weiterhin wird von der Erfindung ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit umfaßt, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins Laminin-Rezeptor (LR) oder des Markerproteins Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) mit einem erfindungsgemäßen Verfahren enthält.

10 Die Erfindung betrifft ferner insbesondere ein diagnostisches Testkit, welches zur Durchführung eines *in situ* Immuntests geeignet ist.

Ein diagnostisches Testkit ist eine Zusammenstellung sämtlicher Komponenten für ein erfindungsgemäßes Diagnoseverfahren. Nicht erschöpfende Beispiele für weitere Elemente, um ein erfindungsgemäßes Verfahren auszuführen, sind Gefäße wie z. B. 96-Loch-Platten  
15 oder Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäße, weitere geeignete Gefäße, Oberflächen und Substrate, Membranen wie Nitrozellulosefilter, Waschreagenzien und Puffer. Weiterhin kann ein diagnostisches Testkit Reagenzien, die gebundene Antikörper nachweisen können, enthalten wie z. B. markierte Sekundärantikörper, Chromophore, Enzyme (z. B. an Antikörper konjugiert) und deren Substrate oder andere Substanzen, die Antikörper binden  
20 können.

Die Erfindung betrifft ferner ein diagnostisches Testkit zum Nachweis von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien, das Oligonukleotide enthält, welche unter stringenten Bedingungen an die für ein Markerprotein für übertragbare spongiforme Enzephalopathien kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, sowie die notwendigen weiteren Elemente,  
25 um ein erfindungsgemäßes Verfahren auszuführen.

Die Erfindung betrifft ferner ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit, das Oligonukleotide enthält, welche unter stringenten Bedingungen an die für PrP-sen kodierende Nukleinsäure hybridisieren können.

Die Erfindung betrifft ferner ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit, das  
30 Oligonukleotide enthält, welche unter stringenten Bedingungen an die für IFN $\gamma$  kodierende Nukleinsäure hybridisieren können.

Die Erfindung betrifft ferner ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit, das Oligonukleotide enthält, welche unter stringenten Bedingungen an die für bovines IFN $\gamma$  kodierende Nukleinsäure hybridisieren können.

Die Erfindung betrifft ferner ein erfindungsgemäßes diagnostisches Testkit, das Oligonukleotide enthält, welche unter stringenten Bedingungen an die für den Laminin-Rezeptor (LR) oder den Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) kodierende Nukleinsäure hybridisieren können.

Erfindungsgemäße Oligonukleotide sind kurze Nukleinsäuremoleküle mit einer Länge von ca. 15 bis ca. 100 Nukleotiden, die unter stringenten Bedingungen an die zu einem Markerprotein komplementäre Nukleinsäure-Sequenz binden. Unter stringenten Bedingungen versteht der Fachmann Bedingungen, die für mehr als 85 %, bevorzugt mehr als 90 % Homologie selektieren (siehe Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York und Bertram, S. und Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991). Die Hybridisierungen werden in 6x SSC/ 5x Denhardt's Lösung/ 0,1 % SDS (SDS: Natriumdodekylsulfat) bei 65 °C durchgeführt. Der Grad der Stringenz wird im Waschschrift festgelegt. So sind für eine Selektionierung auf DNS-Sequenzen mit ca. 85 % oder mehr Homologie die Bedingungen 0,2 x SSC/ 0,01 % SDS/ 65 °C und für eine Selektionierung auf DNS-Sequenzen mit ca. 90 % oder mehr Homologie die Bedingungen 0,1x SSC/ 0,01 % SDS/ 65 °C geeignet. Die Zusammensetzung der Reagenzien wird in Sambrook et al. (1989, supra) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner insbesondere ein diagnostisches Testkit, welches alle notwendigen Elemente zur Durchführung einer reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) enthält.

Ein die erfindungsgemäßen Oligonukleotide enthaltendes bzw. ein für die erfindungsgemäße RT-PCR geeignetes Testkit kann neben Reaktionsgefäßen oder 96-Loch-Platten oder Mikrotiterplatten, weitere geeignete Gefäße, Oberflächen und Substrate, Membranen wie Nitrozellulosefilter, Waschreagenzien und Puffer, Mineralöl, BSA (bovines Serum Albumin), MgCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, DMSO (Dimethylsulfoxid), Mercaptoäthanol, Nukleotide, Enzyme wie *Taq*-Polymerase und Reverse Transkriptase sowie als DNS-Matrize die DNS-Sequenz des Markerproteins oder Teile hiervon und weitere, dem Fachmann bekannte Komponenten enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für PrP-sen ist, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für IFN $\gamma$  ist, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für bovines IFN $\gamma$  ist, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für den Laminin-Rezeptor (LR) oder den Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) ist, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für PrP-sen kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für IFN $\gamma$  kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für bovines IFN $\gamma$  kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für den Laminin-Rezeptor (LR) oder den Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die erfindungsgemäßen diagnostischen Testkits zum Nachweis von übertragbaren  
25 spongiformen Enzephalopathien eignen sich gut zur Verwendung für die Diagnose von humanen und tierischen spongiformen Enzephalopathien oder zu Seuchenkontrollmaßnahmen von endemischer BSE bzw. Scrapie.

## Legenden zu den Abbildungen

### Abbildung 1: Bestimmung des Markerproteins PrP<sup>scn</sup> in einem „Western-blot“

- Die Abbildung zeigt die Bestimmung des Markerproteins PrP<sup>scn</sup> in mononuklearen (MN) Leukozyten von BSE-infizierten Rindern und BSE-negativen Kontrolltieren in einem „Western-blot“ mittels 142 monoklonaler Antikörper.
- Die Zellen wurden in 2% Sarkosyl homogenisiert. Auf dem Gel ist das Homogenisat in einer Konzentration von 60 µg/Loch aufgetragen.

10

Spur 1: Molekulargewichtsmarker

Spur 2: BSE-Gehirn (BSE-positiv, Positivkontrolle)

Spur 3: Rind Nr. 058193 (BSE-positiv)

Spur 4: Rind Nr. 5061 (BSE-positiv)

15 Spur 5: Rind Nr. 2819 (BSE-positiv)

Spur 6: Rind Nr. 279046 (BSE-negativ, Negativkontrolle)

Spur 7: Rind Nr. 4751 (BSE-positiv)

Alle MN-Proben stammen von BSE-infizierten Rindern, ausgenommen Rind Nr. 279046.

- 20 Die Expression von PrP<sup>scn</sup> ist in allen BSE-infizierten Rindern im Vergleich zur Negativkontrolle positiv. Rind Nr. 5061 (Spur 4), exprimiert hierbei weniger stark PrP<sup>scn</sup>, jedoch deutlich über der Negativkontrolle.

### Abbildung 2: Bestimmung des Markerproteins IFN-γ mit RT-PCR

25

Die Abbildung zeigt die Bestimmung des Markerproteins IFN-γ mit RT-PCR in BSE-infizierten Rindern und BSE-negativen Kontrolltieren.

Spur 1: GAPDH-Kontrolle, Rind Nr. 4372 (BSE-positiv)

30 Spur 2: IFN-γ, Rind Nr. 4372 (BSE-positiv)

Spur 3: GAPDH-Kontrolle, Rind Nr. 441 (BSE-negativ)

Spur 4: , IFN-γ, Rind Nr. 441 (BSE-negativ)

### Abbildung 3: Bestimmung des Markerproteins Laminin-Rezeptor mit RT-PCR

Die Abbildung zeigt die Bestimmung des Markerproteins Laminin-Rezeptor (LR) mit RT-PCR in BSE-infizierten Rindern, Rindern, bei denen BSE vermutet wurde sowie in BSE-negativen Kontrolltieren.

#### *Teil A)*

Spur 1: Rind Nr. 4471 (BSE-positiv)

Spur 2: Rind Nr. 58193 (BSE-positiv)

10 Spur 3: Rind Nr. 462 (Negativkontrolle)

Spur 4: Rind Nr. 5621 (BSE vermutet)

Spur 5: Rind Nr. 5054 (BSE vermutet)

Spur 6: Ziel-DNS Kontrolle

Spur 7: Leer

15 Spur 8: Molekulargewichtsmarker

#### *Teil B)*

Zu jeder Spur in *Teil A)* läuft korrespondierend die RT-PCR von D-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), als Kontrolle für die differentielle Aktivität der reversen Transkriptase.

Die Erfindung wird anhand des folgenden Beispiels näher beschrieben.

### Beispiel 1: BSE-Diagnostik mittels der erhöhten Expression von spezifischen Markerproteinen in isolierten Leukozyten

Das nachfolgende Beispiel beschreibt die BSE-Diagnostik in Rindern durch die Bestimmung der erhöhten Expression der Markerproteine PrP<sup>sen</sup> bzw. IFN- $\gamma$  bzw. des Laminin-(Precursor)-Rezeptors (L(P)R) an isolierten mononuklearen (MN) bzw. polymorphnuklearen (PMN) Leukozyten.

75 73

## Isolierung von mononuklearen (MN) und polymorphnuklearen (PMN) Leukozyten aus bovinem Voll-Blut

Die Isolierung dieser speziellen Blutzellen wird über zwei Zentrifugationsschritte erreicht, wobei der letzte eine Dichtegradienten-Zentrifugation ist, um den sog. Leukozyten-‘buffy’ Coat zu erhalten, gefolgt von der Lyse der Erythrozyten.

### Schritt 1: Blutproben

Die Blutproben (Volumen ca. 400 ml) werden den Tieren entnommen und direkt in einen speziellen Container aufgefangen. Als Vorlage enthält dieses Gefäß als Antikoagulans eine Mischung aus Glukose und Citrat: 68mM Glukose, 37,4 mM Tri-Natriumcitrat, 17,4 mM Zitronensäure, eingestellt auf pH 7,3. Blut und Antikoagulans stehen im Verhältnis 6:1.

Die Blutproben werden umgehend ins Labor zur Zellisolierung geschickt.

### Schritt 2: Leukozyten-Anreicherung

#### 1. Zentrifugation

Genau 20 ml des mit Antikoagulans behandelten Blutes werden auf ebenfalls 20 ml Volumen des Dichtegradienten-Mediums geschichtet. Als Gefäß wird ein verschließbares steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen verwendet. Die Vermischung der Probe mit dem Medium vor der Zentrifugation muß vermieden werden.

Die Blutproben können so bis zu 10 Stunden bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden.

Zentrifugation: 800 x g/ 20 min/ (RT) in einem Ausschwing-Rotor, ohne Bremse.

Die Zentrifugation sollte um jeweils 5 Minuten verlängert werden, für jede Stunde, die die Blutproben seit Entnahme gelagert wurden.

Diese 1. Zentrifugation führt zu der Bildung von 3 abgrenzbaren Banden:

Oberes Band – Serum

Mittleres Band – Leukozyten (sog. ‘buffy’)

Unteres Band – Erythrozyten

Dichtezentrifugations-Medium:

Zur Isolierung der Leukozyten können handelsübliche Medium herangezogen werden. Wir haben verwendet: NYCOMED Lymphoprep<sup>TM</sup> Dichte 1,077 g/ml.

- 5 Das Serum wird vorsichtig abgehoben und für weitere Analysen bei -20°C tiefgefroren. Die Leukozytenschicht wird abgehoben und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben.

## 2. Zentrifugation

- 10 Genau 15 ml der Leukozyten aus der 1. Zentrifugation werden auf 35 ml von NYCOMED Lymphoprep<sup>TM</sup> Dichte 1,077 g/ml in einem verschließbaren sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet.

Zentrifugation: 800 x g/ 20 min/ (RT) in einem Ausschwing-Rotor, ohne Bremse.

- Die Zentrifugation sollte um jeweils 5 Minuten verlängert werden, für jede Stunde, die die  
15 Blutproben seit Entnahme gelagert wurden.

Diese 2. Zentrifugation führt zur Bildung von vier abgrenzbaren Banden:

Von oben nach unten:

1. Band – (Rest)-Serum
- 20 2. Band – Mononukleare Leukozyten (Monozyten und Lymphozyten = buffy)
3. Band – Medium Interface
4. Band - Polymorphnukleare Leukozyten und (Rest)-Erythrozyten

Schritt 3: Trennung der Mononuklearen (MN) Leukozyten

25

- Band 2 enthält Monozyten und Lymphozyten und wird mittels einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Mit einem gleichen Volumen von sterilem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung - *phosphate-buffered saline*) werden die Zellen zweimal gewaschen/ zentrifugiert bei 600 x g/ 15 min/ 10°C. Die  
30 pelletierten Zellen werden resuspendiert in HBSS (*Hanks balanced salt solution* mit NaHCO<sub>3</sub>, ohne Phenolrot). Die Vitalität und Zellzahl werden mit Trypan-Blau bestimmt.

27  
75

Schritt 4: Trennung der Polymorphnuklearen (PMN) Leukozyten

Nachdem Band 2 abgesaugt wurde, wird auch Band 1 und Band 3 durch Absaugen entfernt. Die PMN/ Erythrozyten Mischung wird dann dreifach verdünnt mit sterilem Erythrozyten-  
5 Lyse-Puffer (ELB, aus 8,9 mM  $\text{KHCO}_3$ , 154,9 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und 0,01 mM EDTA), vorsichtig vermischt und 10 min bei RT inkubiert.

Zentrifugation: 800 x g/ 10 min/ 10°C

Der Überstand wird verworfen und das Pellet resuspendiert in 20 ml ELB-Puffer, gemischt,  
10 inkubiert und wiederum zentrifugiert.

Zentrifugation: 800 x g/ 10 min/ 10°C

Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 20 ml HBSS (wie oben, jedoch mit 1mM  
15  $\text{MgCl}_2$  ergänzt) gewaschen.

Zentrifugation: 800 x g/ 8 min/ 10°C

Der Überstand wird verworfen und die Zellen resuspendiert in HBSS. Die Vitalität und  
20 Zellzahl werden mit Trypan-Blau bestimmt.

*Ergebnisse: Zellzahlen*

| Zelltyp  | Zellzahl/ml Blut   | Vitalität    |
|----------|--------------------|--------------|
| 25 1. MN | $2,25 \times 10^6$ | $\geq 93 \%$ |
| 2. PMN   | $4,03 \times 10^6$ | $\geq 98 \%$ |

Folgende Nachweise werden mit den isolierten MN- und PMN-Leukozyten von BSE-infizierten Tieren durchgeführt:

- I. Erhöhte Expression der zellulären Isoform des Prion-Proteins, PrP<sup>scn</sup>
- II. Erhöhte Expression des Interferon Gamma Proteins, IFN- $\gamma$
- III. Erhöhte Expression des Laminin-(Precursor)-Receptors, L(P)R

#### **I. Erhöhte Expression der zellulären Isoform PrP<sup>scn</sup>**

Die Expressionrate von PrP<sup>scn</sup> in isolierten Leukozyten von Kontrolltieren und BSE-infizierten Tieren wird durch eine Western-blot-Analyse (Harmeyer S. et al., J Gen Virol 1998, 79, 937-945) gemessen. Zur Entwicklung wird Chemilumineszenz benutzt. Aufschluß der Zellen:

Die isolierten Leukozyten werden in 2% Sarkosyl-Lösung (Sigma, St. Louis, USA) homogenisiert: 10 min/ 4°C. Das so erhaltene Homogenat wird anschließend mit 15.000 x g/ 40 min/ 4°C pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und bei -20°C gelagert.

Von dem so erhaltenen Homogenat werden 60 µg/Loch pipettiert.

Zur Detektion wird entweder der monoklonale Antikörper 13 oder der monoklonale Antikörper 142 eingesetzt. Die Antikörper sind in der o.g. Publikation ausführlich beschrieben. Die Verdünnung des Antikörpers ist jeweils 1:10.

Als Zweitantikörper dient ein HRP-konjugierter Antikörper in der Verdünnung von 1:3000 (HRP, horse raddish peroxidase; goat anti-mouse IgG-HRP).

#### *Ergebnisse:*

Es wurde gezeigt, daß die Proteinexpression von PrP<sup>scn</sup> sowohl in MN- als auch PMN-Leukozyten von BSE-infizierten Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren deutlich erhöht ist (siehe auch den Western-blot von Abbildung 1 mit Proben von weiteren Rindern).

| Fall Nr./ Probe: | BSE Status | Erhöhte Expression PrP <sup>sen</sup> |
|------------------|------------|---------------------------------------|
| 4372             | positiv    | ja                                    |
| 4471             | positiv    | ja                                    |
| 4401             | vermutet   | ja                                    |
| Kontrolle        | negativ    | nein                                  |

## II. Erhöhte Expression von IFN- $\gamma$

Die erhöhte Expression wird auf zwei Arten gemessen:

- Messung des Proteins mittels ELISA
- Messung der spezifischen mRNS mittels RT-PCR

### 1. IFN- $\gamma$ Messung mittels ELISA

Es wird ein kommerzieller ELISA der Firma CSL Veterinary Ltd., Melbourne, Australien, eingesetzt. Die Anwendung entspricht der Herstellerempfehlung.

#### *Ergebnis:*

| BSE-Status   | Anzahl Tiere | IFN- $\gamma$ (pg/ml) |
|--------------|--------------|-----------------------|
| BSE-positiv  | 9            | 314,0 $\pm$ 78,2      |
| BSE-vermutet | 9            | 504,0 $\pm$ 109,7     |
| BSE-negativ  | 13           | 0,0 $\pm$ 0,0         |

### 2. IFN- $\gamma$ mRNS-Messung mittels RT-PCR

Die RNS Isolierung (aus der Gesamt-Leukozytenfraktion) und die nachfolgende RT-PCR werden nach Standardprotokollen (Yi-Jun Shi and Jing-Zhong Liu, Genet. Anal. Tech. Appl., 1992, 9, 149-150; Izraeli S. et al., Nucl. Acid. Res. 1991, 21, 6051; Michel U. et al.,

Anal.Biochem. 1997, 249, 246-247) mit den unten beschriebenen Modifikationen durchgeführt.

#### RNS-Isolierung:

5 Zur Isolierung der Gesamt-RNS wird das Promega System (Katalog Nr. G3191) benutzt.

#### cDNS (RT-Reaktion):

Isolierte RNS-Proben werden revers transkribiert unter Benutzung des 'Reverse Transcription System' von Promega (Katalog Nr. A3500)

10

#### PCR-Reaktion:

Zur Bestimmung der spezifischen mRNS wird eine doppelte Polymerase Kettenreaktion („nested PCR“) eingesetzt.

15 Dazu benutzte IFN- $\gamma$  Primers:

FW1 (IFNF1) 5'GGAGTATTTTAATGCAAGTAGCCC 3'

FW2 (IFNF2) 5'GTAGCTAAGGGTGGGCCTCT 3'

RV (IFNR1) 5'GCTCTCCGGGCCTCGAAAGAGATT 3'

20 Das dazu zu erwartende PCR-Produkt sollte 357 Basenpaare (bp) lang sein.

#### Ergebnisse:

Der IFN $\gamma$  ELISA wird eindeutig durch diese RT-PCR bestätigt, d.h., in BSE-infizierten  
25 Tieren ist IFN $\gamma$  deutlich erhöht.

In Abbildung 2 ist die RT-PCR von mRNS aus Vollblut mit den Proben der Rinder Nr. 4372 und 441 dargestellt.

21  
79

### III. Erhöhte Expression des Laminin-(Precursor)-Receptors, L(P)R

Die Expression wurde über RT-PCR gemessen. Diese Reaktion schließt die Detektion von LPR als auch LR mit ein.

Die bovine Sequenz von LPR oder LR ist noch nicht beschrieben. Jedoch ist dieses Protein in Säugern hochkonserviert. Die publizierten Sequenzdaten des humanen, wie auch des murinen LR wurden deshalb verglichen. Aufgrund dieser Datenanalyse wurde folgende Primersequenz festgelegt:

#### Primers

Vorwärts 5' AAGAGGACCTGGGAGAAGCT 3'

Rückwärts 5' CCTTCTCAGCAGCAGCCCTGC 3'

Erwartetes Produkt: 517 bp

15

#### RNS-Isolierung

Wie unter Punkt II.2 beschrieben.

#### cDNS (RT-Reaktion)

Wie unter Punkt II.2 beschrieben.

20

#### PCR-Reaktion

Einfache Reaktion den Standardprotokollen entsprechend.

#### Ergebnisse:

25

30

| Fall Nr./ Probe: | BSE Status | Erhöhte Expression LPR/LR |
|------------------|------------|---------------------------|
| 4471             | positiv    | ja                        |
| 58193            | positiv    | ja                        |
| 5621             | vermutet   | (ja)                      |
| 5054             | vermutet   | ja                        |
| Kontrolle (462)  | negativ    | nein                      |

020

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose von präklinischen oder klinischen übertragbaren spongiformen Enzephalopathien dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) man einem lebenden Säuger eine Blutprobe entnimmt
  - b) aus dieser Blutprobe Zellen anreichert
  - c) in den angereicherten Zellen die Expression eines Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien bestimmt
  - d) den erhaltenen Wert mit einem Kontrollwert vergleicht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen homogenisiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein das Prionenprotein PrP-sen ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein bovines Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein der Laminin-Rezeptor (LR) oder der Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein mit einem Immuntest bestimmt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen mit Antikörpern, die für das Markerprotein spezifisch sind, inkubiert werden und der sich bildende Antigen/Antikörperkomplex bestimmt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die veränderte Expression des Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien molekularbiologisch bestimmt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die veränderte Expression des Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien mit einer reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der lebende Säuger ein Rind ist.

8482

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen Leukozyten sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen mononukleare Leukozyten sind.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die angereicherten Zellen polymorphnukleare Leukozyten sind.
15. Diagnostisches Testkit zum Nachweis von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien, dadurch gekennzeichnet, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression eines Markerproteins für übertragbare spongiforme Enzephalopathien mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.
16. Diagnostisches Testkit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es für ein Markerprotein für übertragbare spongiforme Enzephalopathien spezifische Antikörper enthält.
17. Diagnostisches Testkit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper polyklonal sind.
18. Diagnostisches Testkit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper monoklonal sind.
19. Diagnostisches Testkit nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins PrP-sen mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.
20. Diagnostisches Testkit nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins IFN $\gamma$  mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.
21. Diagnostisches Testkit nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins bovines IFN $\gamma$  mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.
22. Diagnostisches Testkit nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß es alle notwendigen Elemente zum Nachweis der veränderten Expression des Markerproteins Laminin-Rezeptor (LR) oder des Markerproteins Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 enthält.

8503

23. Diagnostisches Testkit nach einem Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Testkit zur Durchführung eines *in situ* Immuntests geeignet ist.
24. Diagnostisches Testkit zum Nachweis von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien, dadurch gekennzeichnet, daß es Oligonukleotide enthält, welche  
5 unter stringenten Bedingungen an die für ein Markerprotein für übertragbare spongiforme Enzephalopathien kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, sowie die notwendigen weiteren Elemente, um ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 auszuführen.
25. Diagnostisches Testkit nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Testkit alle  
10 notwendigen Elemente zur Durchführung einer reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) enthält ist.
26. Diagnostisches Testkit nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein PrP-sen ist.
27. Diagnostischer Testkit nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet,  
15 daß das Markerprotein IFN $\gamma$  ist.
28. Diagnostisches Testkit einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein bovines IFN $\gamma$  ist.
29. Diagnostisches Testkit nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Markerprotein der Laminin-Rezeptor (LR) oder der Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) ist.  
20
30. Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für PrP-sen ist, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
31. Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für IFN $\gamma$  ist, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
- 25 32. Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für bovines IFN $\gamma$  ist, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
33. Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch für den Laminin-Rezeptor (LR) oder den Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) ist, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
- 30 34. Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für PrP-sen kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.

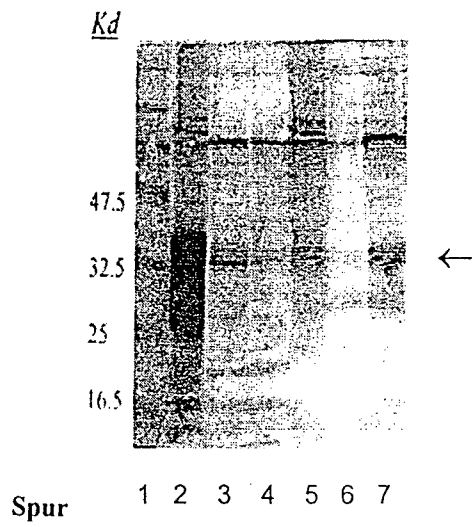
8684

35. Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für IFN $\gamma$  kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
36. Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für bovines IFN $\gamma$  kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
37. Verwendung von Oligonukleotiden, welche unter stringenten Bedingungen an die für den Laminin-Rezeptor (LR) oder den Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) kodierende Nukleinsäure hybridisieren können, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.
38. Die Verwendung des Testkits zum Nachweis von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien nach einem der Ansprüche 15 bis 37 für die Diagnose von humanen und tierischen spongiformen Enzephalopathien oder zu Seuchenkontrollmaßnahmen von endemischer BSE bzw. Scrapie.

07.05

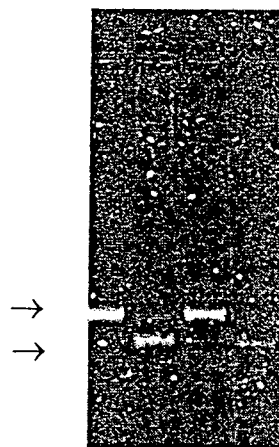
# Abbildungen

Abbildung 1



8806

Abbildung 2



Spur 1 2 3 4

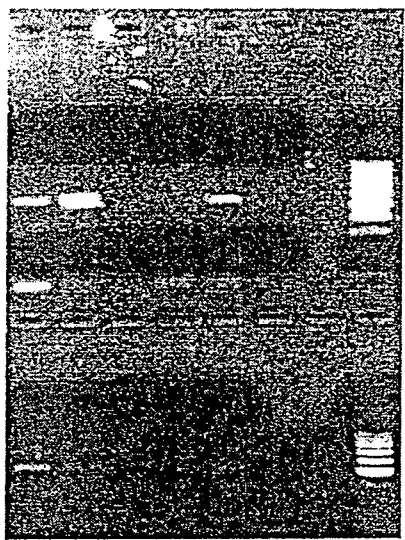
89 87

Abbildung 3: A

→

B

Spur 1 2 3 4 5 6 7 8



### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur präklinischer und klinischer Diagnose von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien dadurch gekennzeichnet, daß die veränderte Expression eines Markerproteins bestimmt wird. In besonderen Ausführungsformen werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren als Markerprotein das Prionenprotein PrP-sen bzw. Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) bzw. Laminin-Rezeptor (LR) oder der Laminin-Rezeptor-Precursor (LPR) bestimmt. Die Erfindung betrifft ferner ein Testkit unter Verwendung von Antikörpern, die für das erfindungsgemäße Markerprotein spezifisch sind. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Testkit unter Verwendung von Oligonukleotiden, die unter stringenten Bedingungen an die für das erfindungsgemäße Markerprotein kodierende Nukleinsäure hybridisieren können. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Antikörpern oder Oligonukleotiden, die spezifisch für die vorgenannten Markerproteine sind, in einem erfindungsgemäßen Verfahren. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung des Testkits zur Diagnose von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien.

# REPÚBLICA FEDERAL ALEMANA



## Certificación

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH en Ingelheim am Rhein/Alemania, ha presentado en la Oficina de Patentes y Marcas Alemana el 21 de Abril de 1999 una solicitud de Patente de Invención con el título:

"Procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles"

Los documentos anejos son reproducción fiel y exacta de los originales de esta solicitud de Patente.

A la solicitud le ha asignado temporalmente la Oficina de Patentes y Marcas Alemana los símbolos C 12 Q, C 12 N y G 01 N de la Clasificación Internacional de Patentes.

München, 14 de Marzo de 2000

El Presidente de la  
Oficina de Patentes y Marcas Alemana  
Por Autorización

Fdo.: Nietiedt

Nº de Expediente: 199 18 141.1

9022

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNOSTICO DE  
ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES  
TRANSMISIBLES

9/13

## Procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles

5 El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles, así como a un estuche de ensayo para diagnóstico mediando utilización de anticuerpos específicos para proteínas de priones. El invento se refiere además a la utilización del procedimiento o del estuche de ensayo para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles.

10 Ya hace más de 250 años se descubrió una enfermedad de corderos, que iba acompañada por nerviosismo, prurito y ataxia y que finalmente terminaba con entumecimiento, parálisis y muerte. La enfermedad es conocida hoy en día como "*scrapie* (rascazón)" en países de lengua inglesa (puesto que los animales se frotan en postes y árboles, con el fin de reprimir el prurito), "*la trembrante* (la tembladera)" en Francia y "*Traberkrankheit* (enfermedad de trotones)" en Alemania. Estos nombres reflejan la amplitud de banda de los síntomas. La rascazón fue investigada como el

15 prototipo de un grupo de enfermedades, que atacan no solamente a los animales sino también a los seres humanos: las encefalopatías espongiformes transmisibles (del inglés *transmissible spongiform encephalopathies* = TSE). Las TSE's son enfermedades neurodegenerativas que evolucionan hasta la muerte, que pueden atacar a un gran número de animales mamíferos.

20 La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) es una enfermedad neurodegenerativa de animales bovinos y está emparentada con la rascazón de corderos y cabras y con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos. Una glicoproteína asociada con membranas, codificada por el hospedante, de función desconocida, la denominada proteína de priones PrP, desempeña un papel de importancia primordial

25 en la patogénesis de estas enfermedades. Esta isoforma celular es expresada de modo especialmente fuerte en células neuronales, pero también es detectable con diversa frecuencia en células no neuronales. Frente a la digestión con enzimas (proteasas) específicas, esta proteína membranal es sensible (PrP-sen). Por el contrario, es resistente a proteasas la forma maligna soluble de la PrP (PrP-res), que

30 se acumula en los cerebros de animales infectados por BSE para formar placas amiloides. Esta forma PrP-res está asociada exclusivamente con todas las enfermedades del tipo de TSE, inclusive la BSE, y puede ser extraída a partir de tejidos de cerebros infectados con TSE/BSE.

Las desacostumbradas propiedades del patógeno de rascazón/BSE dieron lugar

tempranamente a especulaciones de que el patógeno consistiese exclusivamente en un ácido nucleico o en proteínas o que no contuviese ni ácido nucleico ni proteínas y fuese un polisacárido o un fragmento membranal. Los conceptos discutidos en máximo grado en el momento actual son la hipótesis de "sólo-proteína" y la hipótesis de virus/virino.

La hipótesis de "sólo-proteína" se basa en que el príon infeccioso PrP-res no contiene ningún ácido nucleico y es autorreplicante. Se especula sobre que una PrP-res se fija a una PrP-sen y convierte a ésta con ello en la forma maligna. La conformación de esta isoforma maligna está determinada por estructuras de hojas plegadas beta, mientras que en el caso de la isoforma celular predominan las hélices alfa. La hipótesis de virus/virino se basa en que el agente infeccioso consta de un ácido nucleico vírico (posiblemente ácido ribonucleico = ARN) y de que la proteína de priones es una envoltura para el genoma del virus. El origen en un hospedante de la envoltura de priones explicaría la ausencia de reacciones inmunológicas e inflamatorias. La existencia de un ácido nucleico explicaría además de ello las aproximadamente 20 diferentes cepas de rascazón de ratones que se han descrito hasta el momento actual.

La isoforma celular PrP-sen está glicosilada en dos posiciones con asparagina, tiene un peso molecular de 33-35.000 Da y está anclada en la superficie externa de la membrana plasmática por un glicolípido del tipo de fosfatidil-inositol, que está fijado a su aminoácido terminal de carboxi. El máximo régimen de expresión de la PrP-sen se mide en el cerebro, pero el gen es expresado también en un tejido embrional y adulto no neuronal. La función biológica de la proteína es hasta hoy en día confusa. Se discute entre otras cosas que la PrP podría ser receptora de factores de diferenciación neurotróficos. También esta proteína es puesta en relación con el ritmo de sueño y vigilia. El PrP podría ser también un receptor para virus neurotróficos.

La isoforma celular normal de la proteína es degradada completamente por proteasas (PrP-sen). Por el contrario, la isoforma maligna (PrP-res) es descompuesta por proteasas para dar un fragmento de 27-30.000 Da, que todavía es completamente infeccioso (PrP-res). A la PrP-res le faltan los primeros 67 aminoácidos de la proteína madura PrP-sen. Un proceso posterior a la transcripción está en conexión con la conversión de la PrP-sen en la PrP-res, y se supone que la única diferencia entre la PrP-sen y la PrP-res es una diferencia en la estructura espacial tridimensional.

Parece no existir ninguna diferencia bioquímica entre las formas normal y anormal de la proteína. Esto explica también que ambas isoformas no muestren ninguna diferencia antigénica. Además la PrP-sen y la PrP-res tienen una secuencia común de aminoácidos. La PrP es codificada por una copia individual de un gen cromosomal y está conservada en alto grado en animales mamíferos. La secuencia completa que codifica la PrP está contenida en un único exón.

Al contrario que la PrP-sen, que es expresada en la superficie, la PrP-res se acumula en vesículas citoplasmáticas, de las que muchas son lisosomas secundarios.

Las enfermedades del tipo de TSE se caracterizan por un largo tiempo de incubación, durante el cual no se observa ningún síntoma clínico. Le sigue una corta fase clínica, que conduce inevitablemente a la muerte.

La rascazón y la BSE fueron diagnosticadas hasta ahora con métodos histopatológicos, clínicos y epidemiológicos, puesto que los animales infectados de un modo natural no reaccionan probablemente de modo serológico a la PrP-res y el diagnóstico por inoculación de animales de laboratorio puede durar hasta 18 meses. El diagnóstico clínico se efectúa *post mortem* por investigaciones histopatológicas del cerebro. El estado de la BSE es clasificado en: positivo para BSE, negativo para BSE y supuesto ("sospechoso") de BSE. Los animales que se consideran como sospechosos de BSE muestran los mismos detalles clínicos llamativos que los animales positivos con BSE. La detección histopatológica de la BSE es sin embargo (todavía) negativa en el momento de la investigación. Posiblemente este estado "sospechoso de BSE" es un estado "pre-positivo para BSE".

Los métodos de diagnóstico costosos, que antes se han mencionado, implican la investigación con microscopio de p.ej. vacuolos específicos para BSE de las neuronas y del neurópilo, astrocitosis, pérdida neuronal y la deposición de agregados anormales de PrP-res, también conocidos como fibrillas asociadas con rascazón (SAF, de Scrapie-assozierte Fibrillen). Las SAF se pueden determinar in situ por inmunohistoquímica o histo-borrones (*histoblots*) y en extractos tratados del cerebro atacado mediante transferencia de borrones Western (*Western blotting*), motas-borrones (*dot-blots*), o como agregados típicos de fibrillas por coloración negativa en la microscopía con electrones y transmisión.

Otro punto de principio, para diagnosticar indirectamente la BSE, es el análisis del líquido cefalorraquídeo o cerebroespinal. Las enfermedades neurológicas van acompañadas por modificaciones cualitativas y cuantitativas en el metabolismo de

9694

proteínas dentro del sistema nervioso central (SNC o ZNS de *zentrale Nervensystem*) y éstos se reflejan en una composición modificada del líquido cerebroespinal (LCE = ZSF de *zerebrospinalen Flüssigkeit*). Mediando utilización de la electroforesis en gel bidimensional es posible encontrar proteínas marcadoras que se correlacionen con la enfermedad. Tales posibles marcadores (sólo una detección indirecta de la BSE) fueron determinados por primera vez en una fase tardía del período de incubación de una BSE experimental. A partir de experimentos comparativos con muestras obtenidas de pacientes de Creutzfeldt-Jakob se sabe sin embargo que este marcador se puede encontrar también en pacientes de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer se considera como una encefalopatía espongiforme no transmisible.

Incluso aunque se hubieran desarrollado métodos más sencillos para su detección, sería improbable que tales ensayos fuesen ventajosos para el diagnóstico de una BSE preclínica.

En el estado de la técnica se describen procedimientos para la preparación de polipéptidos sintéticos con determinantes antigénicos de la proteína de priones (WO 93/11155, WO93/23432), anticuerpos específicos para la proteína de priones de rascazón nativa (WO97/10505), así como métodos para la detección de rascazón en corderos (WO97/37227). Korth y colaboradores (1997, Nature 390: 74-77) describen un anticuerpo monoclonal procedente de ratones, que puede diferenciar entre la isoforma celular (PrP<sup>c</sup>) y la isoforma de rascazón (PrP<sup>sc</sup>).

La misión del presente invento se encuentra en poner a disposición un procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas.

El problema planteado por esta misión se pudo resolver con el presente invento dentro del marco de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, mediante un procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas.

El procedimiento se basa conforme al invento en que

- a) se extrae una muestra de sangre de un mamífero vivo
- b) se enriquecen las células a partir de esta muestra de sangre
- c) en las células enriquecidas se determina la expresión de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles
- d) el valor obtenido se compara con un valor testigo.

En una forma especial de realización del procedimiento conforme al invento,

97.95

se homogeneizan las células enriquecidas.

La fase preclínica de las encefalopatías espongiformes transmisibles es el largo período de tiempo de incubación después de la infección con la proteína de priones sin síntomas clínicos externos. El presente invento hace posible especialmente diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles durante esta fase sin síntomas clínicos externos. Por consiguiente, el presente invento permite también el diagnóstico en mamíferos, en los que se sospechan encefalopatías espongiformes transmisibles, pero en los que sin embargo el hallazgo histopatológico en el momento de la investigación es (todavía) negativo (supuesto con TSE o sospechoso de TSE, véase también la descripción anterior para la BSE). La fase clínica es la fase corta de síntomas clínicos, que sigue a la fase preclínica y que hasta ahora, por causa de la falta de una terapia, conduce inevitablemente a la muerte del mamífero infectado. También durante esta fase, basándose en la enseñanza técnica del presente invento, se pueden diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles. Entre las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, de *transmissible spongiforme Enzephalopathie*) se cuentan sobre todo la enfermedad de rascazón de los corderos, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, de *bovine spongiforme Enzephalopathie*), de animales bovinos así como la enfermedad de Kuru-Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

La determinación de la expresión de una proteína marcadora significa que la mencionada proteína marcadora aumenta o disminuye detectablemente frente a un valor testigo. La expresión "detectablemente" significa p.ej. que la proteína marcadora es expresada en mayor o menor grado, en un 50 hasta 100 % con respecto al valor testigo, o es aumentada o disminuida de modo estadísticamente significativo. Un valor testigo o también un patrón se puede determinar por ejemplo con células de mamíferos no infectados y sirve para la calibración del procedimiento conforme al invento. Son conocidos por un experto en la materia procedimientos para ello.

Las proteínas marcadoras pueden ser cualesquiera de las proteínas conocidas por un experto en la materia, que se hayan aumentado o disminuido detectablemente en el caso de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas. Se da p.ej. este caso cuando la proteína marcadora no es detectable en el testigo y puede ser identificada inequívocamente con los métodos seguidamente mencionados en mamíferos infectados o mamíferos en los que se sospeche una encefalopatía

9896

espongiforme transmisible.

En una forma especial de realización, el procedimiento conforme al invento está caracterizado porque la proteína marcadora es la proteína de priones PrP<sup>sen</sup>. La proteína de priones PrP<sup>sen</sup> conforme al invento es la isoforma celular de la proteína de priones, que es designada frecuentemente también como PrP<sup>c</sup>. La PrP<sup>sen</sup> (sen = sensible) es degradada totalmente por proteasas.

En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el interferón gamma (IFN $\gamma$ ). En todavía otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN $\gamma$ ) bovino. El IFN $\gamma$  (p.ej. compárese Vilcek, J. y Oliveira, I.C. Int. Arch. Allergy Immunol., 1994, 104:311-316) así como el IFN $\gamma$  bovino (Keefe R.G. y colaboradores, Vet. Immunol. Immunopathol., 1997, 56: 39-51) son conocidos por un experto en la materia.

En otra forma especial adicional de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR de *Laminin-Rezeptor*) o el precursor del receptor de laminina (LPR de *Laminin-Rezeptor-Precursor*). El receptor de laminina (p.ej. compárese Grosso, L.E., y colaboradores Biochemistry, 1991, 30: 3.346-3.350) y el precursor del receptor de laminina (p.ej. compárese Castronovo, V. y colaboradores J. Biol. Chem., 1991, 266: 20.440-20.446) son conocidos por un experto en la materia.

Las mencionadas proteínas marcadoras se pueden determinar con cualquier procedimiento que sea conocido para un técnico experto con conocimientos medios.

En una forma preferida de realización, la proteína marcadora se determina con un ensayo inmunitario. En un ensayo inmunitario, se utilizan anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales que son específicos para la proteína marcadora, que están disponibles en el estado de la técnica. Por ejemplo, para la proteína marcadora PrP<sup>sen</sup> se pueden emplear el anticuerpo monoclonal /3 o también el anticuerpo monoclonal /42 (Harmeyer S. y colaboradores, véase también la Figura 1). Los ensayos inmunitarios abarcan procedimientos de detección conocidos por un experto en la materia tales como el ensayo ELISA (en inglés: *enzyme-linked immuno-sorbent assay* = análisis de inmuno-sorbente enlazado a enzima) o el denominado ensayo de *Sandwich-ELISA*, = ELISA en emparedado, *Dot-Blots*, *Immunoblots* (borrones inmunes), ensayos radioinmunológicos (*Radioimmunoassay*, RIA), ensayo de Ouchterlony basado en la difusión, o ensayo de inmunofluorescencia con proyectiles

9997

(rocket immunofluorescent assays). Otro ensayo inmunitario es el denominado borrón de Western (también designado como proceso de transferencia de Western o emborronamiento de Western). La misión del borrón de Western es transferir proteínas o polipéptidos que se han separado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida a un filtro de nitrocelulosa u otro soporte apropiado, y al mismo tiempo mantener las posiciones relativas de las proteínas o polipéptidos que se han obtenido por la electroforesis en gel. El borrón de Western es luego incubado con un anticuerpo, que se fija específicamente a la proteína o al polipéptido que interesa. Estos procedimientos de detección pueden ser utilizados por un técnico con experiencia media para la realización del invento aquí descrito. Se mencionan a continuación citas bibliográficas, en las que un experto en la materia podrá encontrar los procedimientos de detección antes mencionados así como otros: *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1986); Bullock y colaboradores, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL (Florida) Volumen 1 (1982), Volumen 2 (1983), Volumen 3 (1985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1985).

En otra forma de realización, muy especial, las células enriquecidas se incuban con anticuerpos, que son específicos para la proteína marcadora, y se determina el complejo de antígeno y anticuerpo que se ha formado.

En una forma especialmente preferida de realización, se determina en el procedimiento conforme al invento por métodos de biología molecular la expresión modificada de la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles. Estos procedimientos biológicos moleculares de detección comprenden por ejemplo la reacción en cadena de polimerasa (PCR), borrones de transferencia de Northern o Southern, que puede sacar un experto en la materia a partir de obras clásicas (p.ej. Sambrook y colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. *Gentechnische Methoden*, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

En otra forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles se determina con una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR de

Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain Reaction). En esta forma especial de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se aísla en primer término el ARN total, éste se transcribe inversamente a ADNc mediante la enzima "transcriptasa inversa", con la que se realiza luego la reacción PCR. Este procedimiento de detección es conocido por un experto en la materia y se ha publicado en obras clásicas (p.ej. Sambrook y colaboradores (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

Ejemplos de "mamíferos vivos" son conocidos por un experto en la materia y comprenden p.ej. seres humanos, y además p.ej. corderos, cabras, cerdos, bovinos, corzos, conejos, hámster, ratas y ratones.

En una forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque el mamífero vivo es un animal bovino. Aunque la solicitud se refiere en especial a procedimientos para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles en animales bovinos, la enseñanza técnica es aplicable también a cualquier animal que pueda ser atacado por el patógeno de las mencionadas encefalopatías, y es abarcado por el presente invento.

Las células contenidas en la muestra de sangre abarcan todas las células sanguíneas que proceden de células tronco hematopoyéticas, por ejemplo linfocitos, trombocitos o eritrocitos.

En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células enriquecidas son leucocitos. Por leucocitos han de entenderse por ejemplo leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, células cebadas, células B o linfocitos B, células T o linfocitos T y células asesinas naturales (células NK = *native killer*).

En otra forma muy especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células enriquecidas son leucocitos mononucleares. Por leucocitos mononucleares han de entenderse especialmente monocitos y macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans.

En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células enriquecidas son leucocitos polimorfonucleares. A los leucocitos polimorfonucleares pertenecen los granulocitos eosinófilos, neutrófilos y basófilos.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico con el

fin de detectar encefalopatías espongiformes, que contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles con un procedimiento conforme al invento.

5 El invento concierne además especialmente a un estuche de ensayo para diagnóstico, que contiene anticuerpos específicos para una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.

10 El invento concierne además especialmente a un estuche de ensayo para diagnóstico, caracterizado porque los anticuerpos conformes al invento son policlonales.

El invento concierne además especialmente a un estuche de ensayo para diagnóstico, caracterizado porque los anticuerpos conformes al invento son monoclonales.

15 Por el invento se abarca un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora PrP-sen con un procedimiento conforme al invento.

20 Además, se abarca por el invento un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora IFNy con un procedimiento conforme al invento.

25 Además, se abarca por el invento un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora IFNy bovino con un procedimiento conforme al invento.

30 Además, se abarca por el invento un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora receptor de laminina (LR) o de la proteína marcadora precursor del receptor de laminina (LPR) con un procedimiento conforme al invento.

El invento concierne además especialmente a un estuche de ensayo para diagnóstico que es apropiado para la realización de un ensayo inmunitario *in situ*.

Un estuche de ensayo para diagnóstico es una combinación de todos los componentes para un procedimiento de diagnóstico conforme al invento. Ejemplos

no exhaustivos de otros elementos, con el fin de realizar un procedimiento conforme al invento, son recipientes tales como p.ej. placas de 96 pocillos o placas de microtitulación, recipientes de reacción, otros apropiados recipientes, superficies y sustratos, membranas tales como filtros de nitrocelulosa, reactivos para lavar y tampones. Además, un estuche de ensayo para diagnóstico puede contener reactivos que pueden detectar los anticuerpos fijados, tales como p.ej. anticuerpos secundarios marcados, cromóforos, enzimas (p.ej. conjugadas con anticuerpos) y sus sustratos u otras sustancias, que pueden fijar a los anticuerpos.

El invento concierne además a un estuche de ensayo para diagnóstico destinado a la detección de encefalopatías espongiformes transmisibles, que contiene oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles, así como los demás elementos necesarios para ejecutar un procedimiento conforme al invento.

El invento concierne además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la PrP-sen.

El invento concierne además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN $\gamma$ .

El invento concierne además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN $\gamma$  bovino.

El invento concierne además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR).

Los oligonucleótidos conformes al invento son cortas moléculas de ácido nucleico con una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos, que se fijan en condiciones rigurosas a la secuencia de ácido nucleico que es complementaria con una proteína marcadora. Por condiciones rigurosas, un experto en la materia entiende condiciones que seleccionan más de un 85 %, preferiblemente más de 90 % de homología (véanse Sambrook y colaboradores (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991). Las hibridaciones se llevan a cabo a 65°C en 6x SSC/ 5x solución de Denhardt/ SDS al 0,1 % (SDS, de *Sodium Dodecyl Sulfate* = dodecil-sulfato de sodio). El grado de la rigurosidad es establecido en la etapa de lavado. Así, para una selección en cuanto a secuencias de ADN con una homología de aproximadamente 85 % o más, son apropiadas las condiciones 0,2 x SSC/ SDS al 0,1 %/ 65°C y para una selección en cuanto a secuencias de ADN con una homología de aproximadamente 90 % o más son apropiadas las condiciones 0,1 x SSC/ SDS al 0,01 %/ 65°C. La composición de los reactivos se describe en la obra de Sambrook y colaboradores (1989, supra).

El invento concierne además especialmente a un estuche de ensayo para diagnóstico que contiene los elementos necesarios para la realización de una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Un estuche de ensayo que contiene los oligonucleótidos conformes al invento, o que es apropiado para una RT-PCR conforme al invento, puede contener, junto con recipientes de reacción o placas de 96 pocillos o placas de microtitulación, otros apropiados recipientes, superficies y substratos, membranas tales como filtros de celulosa, reactivos para lavar y tampones, un aceite mineral, BSA (albúmina de suero bovino, de *Bovine Serum Albumin*),  $MgCl_2$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , DMSO (dimetil-sulfóxido), mercaptoetanol, nucleótidos, enzimas tales como la polimerasa de *Taq*, y transcriptasa inversa así como en calidad de matriz de ADN, la secuencia de ADN de la proteína marcadora o partes de ellas, y otros componentes conocidos por un experto en la materia.

En otra forma de realización adicional, el presente invento se refiere a la utilización de un anticuerpo, que es específico para PrP-sen, en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización adicional, el presente invento concierne a la utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN $\gamma$ , en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización adicional, el presente invento concierne a la utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN $\gamma$  bovino, en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización adicional, el presente invento concierne a la utilización de un anticuerpo, que es específico para el receptor de laminina (LR) o el

precursor del receptor de laminina (LPR), en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma preferida de realización, el presente invento concierne a la utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la PrP<sup>sen</sup>, en un procedimiento conforme al invento.

5 En otra forma preferida de realización, el presente invento concierne a la utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN $\gamma$ , en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma preferida de realización, el presente invento concierne a la utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN $\gamma$  bovino, en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma preferida de realización, el presente invento concierne a la utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR), en un procedimiento conforme al invento.

Los estuches de ensayo para diagnóstico conformes al invento para la detección de encefalopatías espongiformes transmisibles se adecuan bien para la utilización en el diagnóstico de encefalopatías espongiformes humanas y animales o para medidas de control de epidemias de BSE o rascazón endémica.

20

#### **Leyendas y explicaciones acerca de las figuras**

##### Figura 1: Determinación de la proteína marcadora PrP<sup>sen</sup> en un "borrón de Western"

La figura muestra la determinación de la proteína marcadora PrP<sup>sen</sup> en leucocitos mononucleares (MN) de animales bovinos infectados con BSE y animales testigos negativos para BSE en un "borrón Western" mediante 142 anticuerpos monoclonales.

Las células fueron homogeneizadas en Sarcosilo al 2 %. Sobre el gel se ha aplicado el material homogeneizado en una concentración de 60  $\mu$ g/pocillo.

30

Pista 1: marcador del peso molecular

Pista 2: cerebro con BSE (testigo positivo que es positivo para BSE),

Pista 3: animal bovino n° 058193 (positivo para BSE)

Pista 4: animal bovino n° 5061 (positivo para BSE)

Pista 5: animal bovino n° 2819 (positivo para BSE)

Pista 6: animal bovino n° 279046 (testigo negativo, que es negativo para BSE)

Pista 7: animal bovino n° 4751 (positivo para BSE)

5            Todas las muestras de MN proceden de animales bovinos infectados con BSE, exclusive el animal bovino n° 279046. La expresión de la PrP<sup>sen</sup> es positiva en todos los animales bovinos infectados con BSE en comparación con el testigo negativo. El animal bovino n° 5061 (pista 4), expresa en este caso la PrP<sup>sen</sup> con menos intensidad, pero claramente por encima del testigo negativo.

10

Figura 2: Determinación de la proteína marcadora IFN $\gamma$  con RT-PCR

La figura muestra la determinación de la proteína marcadora IFN $\gamma$  con RT-PCR en animales bovinos infectados con BSE y animales testigos negativos para BSE.

15            Pista 1: testigo con GAPDH, animal bovino n° 4372 (positivo para BSE)  
Pista 2: IFN $\gamma$ , animal bovino n° 4372 (positivo para BSE)  
Pista 3: testigo con GAPDH, animal bovino n° 441 (negativo para BSE)  
Pista 4: IFN $\gamma$ , animal bovino n° 441 (negativo para BSE)

20            Figura 3: Determinación de la proteína marcadora receptor de laminina con RT-PCR

La figura muestra la determinación de la proteína marcadora receptor de laminina (LR) con una RT-PCR en animales bovinos infectados con BSE, animales bovinos en los que se sospechaba la BSE, así como animales testigos negativos para BSE.

25

*Parte A)*

Pista 1: animal bovino n° 4471 (positivo para BSE)  
Pista 2: animal bovino n° 58193 (positivo para BSE)  
Pista 3: animal bovino n° 462 (testigo negativo)  
30            Pista 4: animal bovino n° 5621 (sospechoso de BSE)  
Pista 5: animal bovino n° 5054 (sospechoso de BSE)  
Pista 6: testigo con ADN diana  
Pista 7: vacía  
Pista 8: marcador del peso molecular

101  
106

Parte B)

Correspondientemente a cada pista en la *Parte A)* se desarrolla la RT-PCR de D-gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), como testigo para la actividad diferencial de la transcriptasa inversa.

5

El invento se describe con mayor detalle con ayuda del siguiente Ejemplo.

**Ejemplo 1: Diagnóstico de BSE mediante la expresión aumentada de proteínas marcadoras específicas en leucocitos aislados**

10

El siguiente Ejemplo describe el diagnóstico de la BSE en animales bovinos mediante la determinación de la expresión aumentada de las proteínas marcadoras PrP<sup>sen</sup> o IFN $\gamma$  o del (precursor del) receptor de laminina (L(P)R) en leucocitos mononucleares (MN) o polimorfonucleares (PMN) aislados.

15

**Aislamiento de leucocitos mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) procedentes de sangre entera de bovino**

20

El aislamiento de estas células especiales de la sangre se consigue a través de dos etapas de centrifugación, siendo la última una centrifugación en gradiente de densidad, con el fin de obtener el denominado "buffy coat" = (revestimiento anteoado), seguido por la lisis de los eritrocitos.

**Etapas 1: Muestras de sangre**

25

Las muestras de sangre (en un volumen de aproximadamente 400 ml) se extraen de los animales y se recogen directamente en un recipiente especial. En calidad de carga previa, este recipiente contiene como anticoagulante una mezcla de glucosa y citrato: glucosa 68 mM, citrato de tri-sodio 37,4 mM, ácido cítrico 17,4 mM, ajustado a pH 7,3. La sangre y el anticoagulante están en la relación 6:1. Las muestras de sangre se envían rápidamente al laboratorio para aislar las células.

30

**Etapas 2: Enriquecimiento con leucocitos**

**1ª centrifugación**

Exactamente 20 ml de la sangre tratada con anticoagulante se extienden sobre un volumen también de 20 ml del medio con gradiente de densidad. Como recipiente se utiliza un tubito de centrífuga estéril cerrable de 50 ml de capacidad.

Debe de evitarse el mezclamiento de la muestra con el medio antes de la centrifugación.

Las muestras de sangre se pueden almacenar de este modo durante hasta 10 horas a la temperatura ambiente (TA).

5 Centrifugación: 800 x g/ 20 min/ (TA) en un rotor vibratorio, sin freno.

La centrifugación debería prolongarse en cada caso en 5 minutos, por cada hora, en la que se hubieron almacenado las muestras de sangre desde su extracción.

Esta 1ª centrifugación conduce a la formación de 3 bandas delimitables:

banda superior - suero

10 banda intermedia - leucocitos (los denominados "anteados")

banda inferior - eritrocitos

#### Medio para centrifugación por densidad

15 Con el fin de aislar los leucocitos se pueden aprovechar medios usuales en el comercio. Los autores del invento hemos utilizado: NYCOMED Lymphoprep® densidad 1,077 g/ml.

El suero es cuidadosamente desprendido y congelado profundamente a -20°C para otros análisis adicionales. La capa de leucocitos es desprendida y vertida en un nuevo tubito de centrífuga.

20

#### 2ª centrifugación

Exactamente 15 ml de los leucocitos procedentes de la 1ª centrifugación se extienden sobre 35 ml de NYCOMED Lymphoprep®, densidad 1,077 g/ml en un tubo de centrífuga estéril cerrable de 50 ml de capacidad.

25 Centrifugación: 800 x g/ 20 min/ (TA) en un rotor vibratorio, sin freno.

La centrifugación se debería prolongar en cada caso durante 5 minutos, por cada hora, en la que se hubieron almacenado las muestras de sangre desde su extracción.

Esta 2ª centrifugación conduce a la formación de cuatro bandas delimitables.

30 De arriba hacia abajo

1ª banda - suero (restante)

2ª banda - leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos = anteados)

3ª banda - interfase con medio

4ª banda - leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos (restantes)

Etapa 3: Separación de los leucocitos mononucleares (MN)

La banda 2 contiene monocitos y linfocitos, y es succionada cuidadosamente mediante una pipeta estéril de Pasteur y vertida en un tubito de centrífuga estéril de 50 ml de capacidad. Con un volumen igual de PBS estéril (solución tamponada con fosfato - *phosphate-buffered saline*) las células se lavan dos veces/ se centrifugan a 600 x g/ durante 15 min/ a 10°C. Las células sedimentadas se vuelven a suspender en HBSS (*Hanks balanced salt solution* solución salina equilibrada de Hanks con NaHCO<sub>3</sub>, sin rojo de fenol). La vitalidad y el número de células se determinan con azul de Trypan.

10

Etapa 4: Separación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Después de que hubo sido succionada la banda 2, se retiran mediante succión también la banda 1 y la banda 3. La mezcla de PMN y eritrocitos se diluye luego a tres veces con el tampón para lisis de eritrocitos estéril (ELB, de *Erythrocyte Lyse Buffer*, a base de KHCO<sub>3</sub> 8,9 mM, NH<sub>4</sub>Cl 154,9 mM y EDTA 0,01 mM), se mezcla cuidadosamente y se incuba durante 10 min a TA.

15

Centrifugación: 800 x g/ 10 min/ 10°C

El material sobrenadante se desecha y el sedimento se vuelve a suspender en 20 ml de tampón para LB, se mezcla, se incuba y se centrifuga de nuevo.

20

Centrifugación: 800 x g/ 10 min/ 10°C

El material sobrenadante se desecha y el sedimento se lava con 20 ml de HBSS (como antes, pero complementado con MgCl<sub>2</sub> 1 mM).

Centrifugación: 800 x g/ 8 min/ 10°C.

25

El material sobrenadante se desecha y las células se vuelven a suspender en HBSS. La vitalidad y el número de células se determinan con azul de Trypan.

Resultados: Números de células

30

| Tipo de células | Número de células/ml de sangre | Vitalidad |
|-----------------|--------------------------------|-----------|
| 1. MN           | 2,25 x 10 <sup>6</sup>         | ≥ 93 %    |
| 2. PMN          | 4,03 x 10 <sup>6</sup>         | ≥ 98 %    |

Las siguientes detecciones se llevan a cabo con los leucocitos MN y PMN aislados de animales infectados con BSE:

107  
109

- I. Expresión aumentada de la isoforma celular de la proteína de priones PrP<sup>sen</sup>
- II. Expresión aumentada de la proteína interferón-gamma, IFN $\gamma$
- III. Expresión aumentada del (precursor del) receptor de laminina, L(P)R)

5 I. Expresión aumentada de la isoforma celular PrP<sup>sen</sup>

El régimen de expresión de PrP<sup>sen</sup> en leucocitos aislados de animales testigos y de animales infectados con BSE se mide mediante un análisis por bórñon de Western (Harmeyer S. y colaboradores, J. Gen Virol 1998, 79, 937-945). Para el revelado se utiliza la quimio-luminiscencia.

10 Disgregación de las células:

Los leucocitos aislados se homogeneizan en una solución de Sarcosilo al 2 % (Sigma, St. Louis, EE. UU.): 10 min/ 4°C. El material homogeneizado así obtenido se sedimenta a continuación con 15.000 x g/ 40 min/ 4°C. El material sobrenadante se succiona y se almacena a -20°C.

15 Del material homogeneizado así obtenido se pipetea 60  $\mu$ g por pocillo.

Para la detección se emplea o bien el anticuerpo monoclonal /3 o el anticuerpo monoclonal /42. Los anticuerpos se describen detalladamente en la publicación antes mencionada. La dilución del anticuerpo es en cada caso de 1:10.

20 Como segundo anticuerpo sirve un anticuerpo conjugado con HRP en la dilución de 1:3.000 (HRP, *horse raddish peroxidase* = peroxidasa de rábano rusticano, IgG de cabra anti-ratón-HRP).

*Resultados:*

25 Se mostró que la expresión de la proteína PrP<sup>sen</sup> está aumentada manifiestamente en leucocitos tanto MN como también TMN de animales infectados con BSE en comparación con animales testigos sanos (véase también el bórñon de Western de la Figura 1 con muestras de otros animales bovinos).

30

| Caso nº/ muestra | Estado de BSE | Expresión aumentada de PrP <sup>sen</sup> |
|------------------|---------------|-------------------------------------------|
| 4372             | positivo      | si                                        |
| 4471             | positivo      | si                                        |
| 4401             | sospechoso    | si                                        |
| Testigo          | negativo      | no                                        |

II. Expresión aumentada de IFN $\gamma$

La expresión aumentada es medida de dos maneras:

- medición de la proteína mediante ELISA
- medición del ARNm específico mediante RT-PCR

5

1. Medición del IFN $\gamma$  mediante ELISA

Se emplea un ELISA comercial de la entidad CSL Veterinary Ltd, Melbourne, Australia. La utilización corresponde a las recomendaciones del fabricante.

10

*Resultado:*

| Estado de BSE     | Número de los animales | IFN $\gamma$ (pg/ml) |
|-------------------|------------------------|----------------------|
| Positivo para BSE | 9                      | 314,0 $\pm$ 78,2     |
| Sospechoso de BSE | 9                      | 504,0 $\pm$ 109,7    |
| Negativo para BSE | 13                     | 0,0 $\pm$ 0,0        |

15

2. Medición del ARNm de IFN $\gamma$  mediante RT-PCR

El aislamiento del ARN (procedente de la fracción total de leucocitos) y la subsiguiente RT-PCR se llevan a cabo de acuerdo con protocolos clásicos (Yi-Jun Shi y Jing-Zhong Liu, Genet. Anal. Tech. Appl., 1992, 9, 149-150; Izraeli S. y colaboradores, Nucl. Acid. Res. 1991, 21, 6.051; Michel U. y colaboradores, Anal. Biochem. 1997, 249, 246-247) se lleva a cabo con las modificaciones descritas seguidamente.

20

Aislamiento del ARN:

25

Para el aislamiento del ARN total se usa el sistema Promega (nº de catálogo G3191).

ADNc (reacción con RT)

Muestras aisladas de ARN se transcriben inversamente mediando utilización del sistema de transcripción inversa = "Reverse Transcription System" de Promega (nº de catálogo A3500).

30

Reacción de PCR:

Para la determinación del ARNm específico se emplea una doble reacción en cadena de polimerasa ("*nested PCR*" = PCR anidada").

5 Para ello se utilizaron los siguientes cebadores de IFN $\gamma$ :

FW1 (IFNF1) 5'GGAGTATTTTAATGCAAGTAGCCC 3'  
FW2 (IFNF2) 5'GTAGCTAAGGGTGGGCCTCT 3'  
RV (IFNR1) 5'GCTCTCCGGGCCTCGAAAGAGATT 3'

El producto de PCR que es de esperar de ello debería tener una longitud de 357 pares de bases (pb).

10 *Resultados:*

El ELISA del IFN $\gamma$  es confirmado inequívocamente por esta RT-PCR, es decir que en los animales infectados con BSE el IFN $\gamma$  ha sido aumentado claramente.

15 En la Figura 2 se representa la RT-PCR de un ARNm procedente de sangre entera con las muestras de los animales bovinos 4372 y 441.

III. Expresión aumentada del (precursor del) receptor de laminina, L(P)R

La expresión se midió a través de una RT-PCR. Esta reacción incluye consigo la detección de LPR así como también de LR.

20 La secuencia bovina de LPR o LR no ha sido todavía descrita. Sin embargo, está proteína está altamente conservada en mamíferos. Se compararon por lo tanto los datos publicados de secuencias de la LR humana así como también de la LR murina. Basándose en este análisis de los datos se estableció la siguiente secuencia de cebador:

25

Cebadores

Hacia adelante 5'AAGAGGACCTGGGAGAAGCT3'

Hacia atrás 5' CTTTCTCAGCAGCAGCCCTGC3'

Producto esperado: 517 pb

Aislamiento del ARN  
Como se ha descrito en el punto II.2

ADNc (reacción con RT)  
5 Como se ha descrito en el punto II.2

Reacción PCR  
Reacción sencilla correspondiendo a los protocolos clásicos

10 *Resultados:*

| Caso nº/ muestra | Estado de BSE | Expresión aumentada de LPR/LR |
|------------------|---------------|-------------------------------|
| 4471             | positivo      | si                            |
| 58193            | positivo      | si                            |
| 15 5621          | sospechoso    | (si)                          |
| 5054             | sospechoso    | si                            |
| Testigo (462)    | negativo      | no                            |

Estos resultados se representan en la Figura 3.  
20

111  
113

## REIVINDICACIONES

- 5           1.-     Procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas, caracterizado porque
- a)     se extrae una muestra de sangre de un mamífero vivo
- b)     se enriquecen las células a partir de esta muestra de sangre
- c)     en las células enriquecidas se determina la expresión de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles
- 10          d)     el valor obtenido se compara con un valor testigo.
- 2.-     Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células enriquecidas son homogeneizadas.
- 3.-     Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la marcadora es la proteína de priones PrP-sen.
- 15          4.-     Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN $\gamma$ ).
- 5.-     Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN $\gamma$ ) bovino.
- 6.-     Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque
- 20          la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR).
- 7.-     Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la proteína marcadora se determina con un ensayo inmunitario.
- 8.-     Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado
- 25          porque las células enriquecidas se incuban con anticuerpos, que son específicos para la proteína marcadora, y se determina el complejo de antígeno y anticuerpo que se ha formado.
- 9.-     Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se determina por métodos de biología molecular la expresión modificada de
- 30          la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.
- 10.-    Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la expresión modificada de la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles se determina con una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el mamífero vivo es un animal bovino.

12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque las células enriquecidas son leucocitos.

5 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque las células enriquecidas son leucocitos mononucleares.

14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque las células enriquecidas son leucocitos polimorfonucleares.

10 15.- Estuche de ensayo para diagnóstico con el fin de detectar encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

15 16.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 15, caracterizado porque contiene anticuerpos específicos para una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.

17.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 16, caracterizado porque los anticuerpos son policlonales.

20 18.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 16, caracterizado porque los anticuerpos son monoclonales.

19.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 15 a 18, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora PrP-sen con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

25 20.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora IFN $\gamma$  con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

30 21.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 20, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora IFN $\gamma$  bovino con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

22.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 15 a 21, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la

detección de la expresión modificada de la proteína marcadora receptor de laminina (LR) o de la proteína marcadora precursor del receptor de laminina (LPR), con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

5           23.-   Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 15 a 22, caracterizado porque el estuche de ensayo es apropiado para la realización de un ensayo inmunitario *in situ*.

10           24.-   Estuche de ensayo para diagnóstico destinado a la detección de encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque contiene oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles, así como los demás elementos necesarios, a fin de realizar un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

15           25.-   Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 24, caracterizado porque el estuche de ensayo contiene todos los elementos necesarios para la realización de una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

          26.-   Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 24 ó 25, caracterizado porque la proteína marcadora es PrP-sen.

20           27.-   Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 24 a 26, caracterizado porque la proteína marcadora es IFN $\gamma$ .

          28.-   Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 24 a 27, caracterizado porque la proteína marcadora es IFN $\gamma$  bovino.

25           29.-   Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 24 a 28, caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR).

          30.-   Utilización de un anticuerpo, que es específico para PrP-sen, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

          31.-   Utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN $\gamma$ , en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

30           32.-   Utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN $\gamma$  bovino, según una de las reivindicaciones 1 a 14.

          33.-   Utilización de un anticuerpo, que es específico para el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR), en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

114  
H6

34.- Utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la PrP-sen, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

5 35.- Utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN $\gamma$ , en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

36.- Utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la IFN $\gamma$ , en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

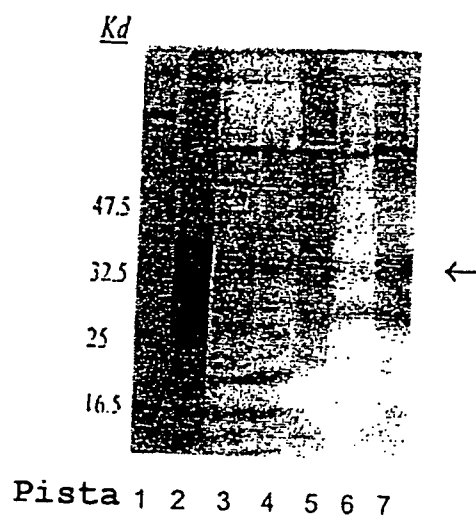
10 37.- Utilización de oligonucleótidos, que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR), en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14.

15 38.- La utilización del estuche de ensayo para la detección de encefalopatías espongiformes transmisibles según una de las reivindicaciones 15 a 37 para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes humanas y animales o para medidas de control de epidemias de BSE o rascazón endémica.

115.12

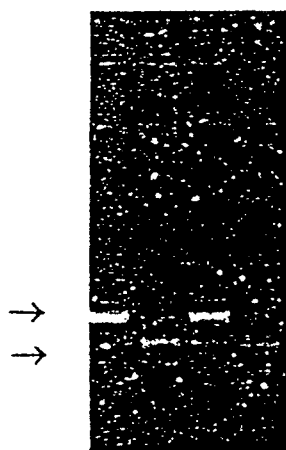
Figuras

Figura 1



116  
118

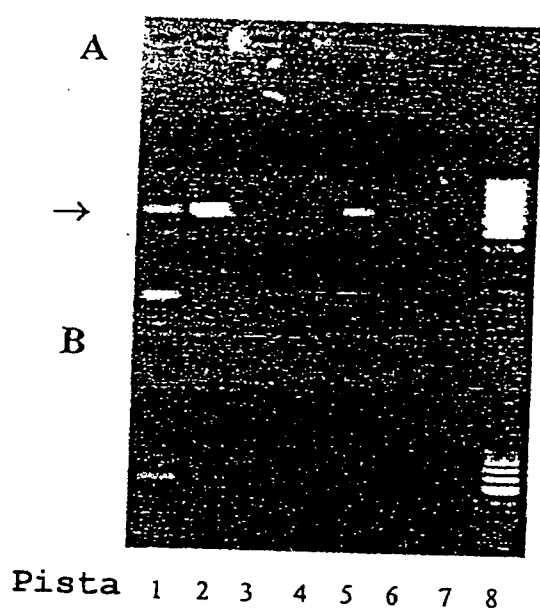
Figura 2



Pista 1 2 3 4

117  
119

Figura 3



119  
120

## RESUMEN

El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico preclínico y clínico de encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque se determina la expresión modificada de una proteína marcadora. En formas especiales de realización, se determinan en el procedimiento conforme al invento como proteínas marcadoras la proteína de priones PrP-sen o interferón gamma (IFNy) o el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LPR). El invento se refiere además a un estuche de ensayo con utilización de anticuerpos que son específicos para la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a un estuche de ensayo mediando utilización de oligonucleótidos que se pueden hibridar en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización de anticuerpos u oligonucleótidos, que son específicos para las proteínas marcadoras antes mencionadas, en un procedimiento conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización del estuche de ensayo para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles.

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO: 1418  
EXPEDIENTE: 00029093  
IPC: G01N 33/53, C12Q 1/68, A61K 49/00

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. El título de la invención hace referencia a "Procedimiento..." Teniendo en cuenta que las reivindicaciones se refieren a un estuche de diagnóstico, se recomienda modificar el título de manera que se mencionen tanto el procedimiento como el estuche.
2. Las figuras 1 a 14 descritas en los Folios 48-50 no están presentes en la solicitud por lo cual deben ser anexadas. Sin ellas la descripción no está completa y no es clara.
3. Las unidades g significa gramos en el Sistema Internacional de Unidades, así que no es posible emplear esta sigla para expresar la frecuencia de rotación que es la magnitud que aquí nos concierne. Sírvase hacer las correspondientes conversiones y cambiar el valor de las cantidades expresadas en gravedades (g) por revoluciones por minuto, rpm.
4. Las figuras contenidas en los folios 31 a 33 no son lo suficientemente nítidas para permitir una buena copia a través de Offset o Scanner. Sírvase presentar una nueva copia que tenga mejor resolución.
5. La reivindicación 16 no es clara puesto que ella se refiere a un estuche de ensayo para diagnóstico definido en función de un procedimiento, en lugar de precisar los compuestos o composiciones que lo conforman ó caracterizan. En pro de establecer exactamente el objeto de la invención se requiere que se modifique esta reivindicación para que en ella se indique que el estuche... se caracteriza por comprender ... tales elementos.
6. Las reivindicaciones 17 a 19 no son claras. Lo anterior se afirma con base en el hecho de que el estuche es caracterizado por un compuesto que no ha sido definido exactamente puesto que los anticuerpos a los que se refieren estas reivindicaciones no han sido precisados. Decir que el estuche para diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas se caracteriza por contener anticuerpos específicos para una proteína (no definida) marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles no permite establecer ni de qué proteína marcadora se está hablando, ni que anticuerpo es el que se enlaza a dicha proteína y menos saber cual es el estuche para diagnóstico que comprende dicho anticuerpo. Por consiguiente se requiere mencione que la proteína marcadora es...
7. Las reivindicaciones 20 a 23 y 26 y por ende las reivindicaciones 27 a 31 no son claras puesto que en ellas se dice que "se caracteriza porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de una proteína marcadora determinada" y esta no es suficiente información para saber exactamente cual es el objeto sobre el cual se reclama protección. Sírvase definir el objeto de manera precisa, es decir, mediante la mención exacta de los elementos que constituyen el estuche y no mediante la indicación del objetivo que se logra mediante el empleo en conjunto de dichos elementos.
8. La reivindicación 25 no es clara puesto que los oligonucleótidos que caracterizan el estuche no han sido definidos. Decir que dichos nucleótidos son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles no es suficiente información para establecer cual es el estuche para

120  
122

el cual se solicita protección. Sírvase indicar de manera exacta cuáles son los oligonucleótidos que caracterizan el estuche reivindicado.

9. En consecuencia a lo anterior, sírvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá,

/202016

**COPIA PARA EL SOLICITANTE**