

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT.
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No

04-95972

54 TITULO

ENLACE

FORMAS

ATOLOGICAS

DE

PROTEINAS

PRION

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL

G01N33/68

71 SOLICITANTE

MICROSENS BIOPHAGE LIMITED

DOMICILIO

Londres Reino Unido

74 APODERADO

EMILI FERRERO

22. BOGOTA D C

38

Usaquén

27/09/2004


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 84893972 88888888

Folios: 176.46n

Fecha (AMD): 2004-09-27 17:09:18

Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 8828 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: **MICROSENS BIOPHAGE
LIMITED**

 sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Reino Unido.

 Dirección: London Bioscience Innovation
Centre, 2 Royal College Street,
Londres NW1 0TU,
Reino Unido.

 Domicilio: Londres,
Reino Unido

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☐ NIT ☐

 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

 Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 38 11

Fax: 217 92 11

 E-mail: clientes@camyp.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☒ NIT ☐

 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

 Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. Amln Reza LANE
Ground Floor Flat, 72 Avondale Road,
Croydon, Surrey CR2 6JA,
Reino Unido.

 3.-Stuart Mark WILSON
167 Ross Road, South Norwood,
Londres SE25 6TW.
Reino Unido.

 2. Christopher J. STANLEY
Harradine House, Church Street,
Woodhurst,
Huntingdon, Cambridgeshire PE28 3BN, L
Reino Unido.

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/GB2003/000858

 Fecha: 28 de febrero de 2003

 Publicación Internacional No. WO 2003/073106 A3

 Fecha: 4 de septiembre de 2003

6

Título (54)
ENLACE DE FORMAS PATOLÓGICAS DE PROTEINAS PRIÓN

7

Clasificación Internacional (51) G01N 33/68
C08 B37/02.

8

Prioridad

 SI ☒ NO ☐
(33) País de Origen
GB.
GB.
GB.
(32) Fecha
28 de febrero de 2002
18 de julio de 2002
19 de diciembre de 2002
(31) Número de Solicitud
0204797.5
0216808.6
0229614.3

9

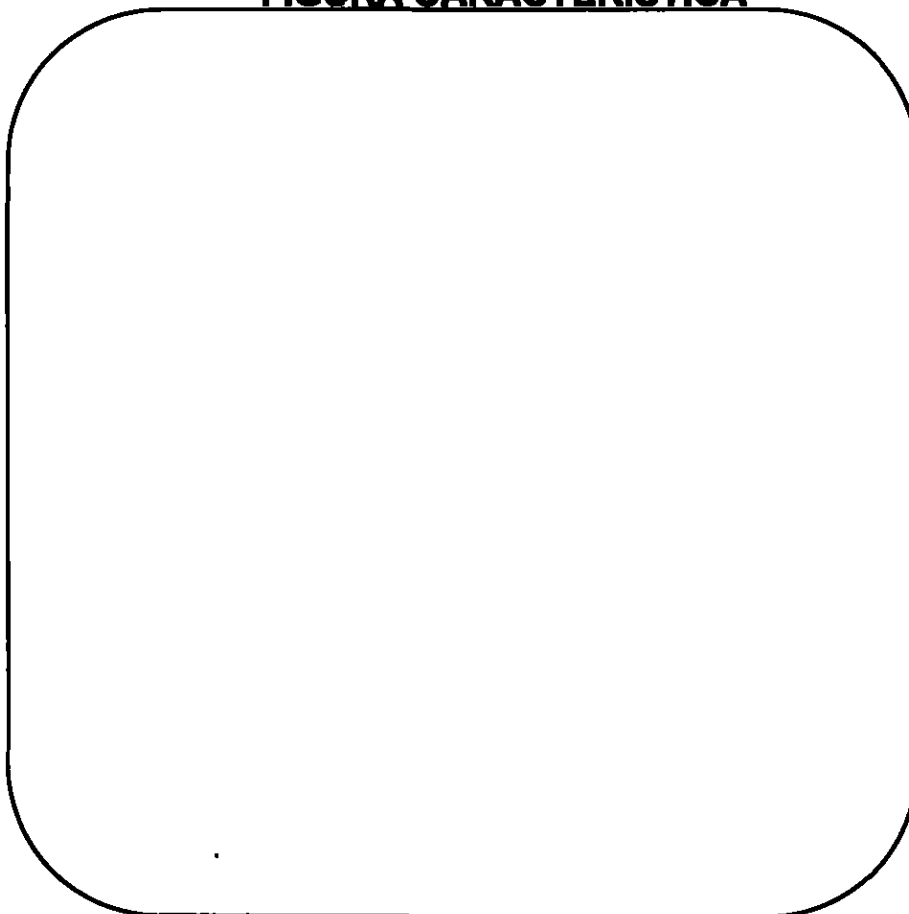
Comprobante de pago N .: 04 - 74.341
Fecha: 20 de septiembre de 2004

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/073106 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/68, C08B 37/02

(74) Agent: SMART, Peter, J.; W.H. Beck, Greener & Co., 7 Stone Buildings, Lincoln's Inn, London WC2A 3SZ (GB).

(21) International Application Number:
PCT/GB2003/000858

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 28 February 2003 (28.02.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0204797.5 28 February 2002 (28.02.2002) GB
0216808.6 18 July 2002 (18.07.2002) GB
0229614.3 19 December 2002 (19.12.2002) GB

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(71) Applicant (for all designated States except US): MICROSSENS BIOPHAGE LIMITED (GB/GB); London Bioscience Innovation Centre, 2 Royal College Street, London NW1 0TU (GB).

(72) Inventors; and

(73) Inventors/Applicants (for US only): LANE, Amin, Reza (GB/GB); Ground Floor Flat, 72 Avondale Road, Croydon, Surrey CR2 6IA (GB). STANLEY, Christopher, J. (GB/GB); Harradine House, Church Street, Woodhurst, Huntingdon, Cambridgeshire PE28 3BN (GB). WILSON, Stuart, Mark (GB/GB); 167 Rom Road, South Norwood, London SE25 6TW (GB).

(88) Date of publication of the international search report:
8 January 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/073106 A3

(54) Title: BINDING OF PATHOLOGICAL FORMS OF PRION PROTEINS

(57) Abstract: Infective aggregating forms of proteins such as PrP, amyloid, and tau are bound selectively in the presence of the normal form protein using a polyanionic binding agent such as dextran sulphate or pentosan (anionic), or polyamine compounds such as pDADMAC (cationic) under selective binding conditions including the use of n-tetroylsarcosine at mildly alkaline pH, and may then be assayed.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interns Application No
PCT/GB 03/00858A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 C08B37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUPATTAPONE SURACHAI ET AL: "Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 25, 7 December 1999 (1999-12-07), pages 14529-14534, XP002258982 Dec. 7, 1999 ISSN: 0027-8424	38-41
A	abstract page 14531, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1 page 14532, left-hand column, paragraph 2 -page 14533, left-hand column, paragraph 2 --- -/--	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2003

Date of mailing of the international search report

10/11/2003

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luís Alves, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT, GB 03/00858

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRIMACOMBE DEBBIE B ET AL: "Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein" BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, vol. 342, no. 3, 1999, pages 605-613, XP002214909 ISSN: 0264-6021	38-40
A	abstract page 611, left-hand column, paragraph 2 page 612, left-hand column, last paragraph -right-hand column, last paragraph	1-37
X	WONG CAI'NE ET AL: "Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrPSc-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 3, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 377-386, XP002258983 ISSN: 0261-4189	38-40
A	abstract	1-37
A	XIONG LIANG-WEN ET AL: "Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 79, no. 3, November 2001 (2001-11), pages 669-678, XP002252786 ISSN: 0022-3042	1-37
A	abstract	
A	GRATHWOHL KAI-UWE D ET AL: "Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of PrP-Sc in crude tissue extracts from scrapie-affected mice" JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 64, no. 2, 1997, pages 205-216, XP002258984 ISSN: 0166-0934	1-37
	abstract	

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/00858

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SHAKED YUVAL ET AL: "The binding of prion proteins to serum components is affected by detergent extraction conditions." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY. ENGLAND JUL 2002, vol. 82, no. 1, July 2002 (2002-07), pages 1-5, XP002258985 ISSN: 0022-3042 abstract page 2, right-hand column, paragraph 2 -page 5, left-hand column, paragraph 2	34-37
P,A	WARNER RICHARD G ET AL: "Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 21, 24 May 2002 (2002-05-24), pages 18421-18430, XP002258986 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-33
A	WO 02 00713 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 3 January 2002 (2002-01-03) abstract; claims	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l application No.
T/GB 03/00858

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-14 (completely), 15-16 (partially),
35-37 (partially), 38-41

Methods of separating aggregating from non-aggregating forms of a protein based on the use of polyionic materials and such polyionic materials.

2. Claims: 15-16 (partially), 34 (completely),
35-37 (partially)

Methods of separating PrPsc from PrPc based on the use of a binding agent for PrPsc in the presence of an amino acid amide of a fatty acid.

The only concept common to independent claims 1 and 34 is the use of a binding agent specific for the aggregating form of a protein in a method of separating the aggregating from the non-aggregating forms of said protein.

Said common concept is however not novel (see for example WO-A-02/00713 which discloses the selective binding of the aggregating form of prion protein to plasminogen).

Thus, a technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features in the sense of Rule 13.2 PCT is lacking and the requirements for unity of invention referred to in Rule 13.1 PCT is not fulfilled.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP 03/00858

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200713	A	03-01-2002	AU 5040601 A	08-01-2002
			AU 5241100 A	30-04-2001
			BR 0111975 A	01-07-2003
			CA 2385743 A1	05-04-2001
			CA 2413742 A1	03-01-2002
			WO 0200713 A1	03-01-2002
			EP 1216258 A1	26-06-2002
			EP 1294759 A1	26-03-2003
			JP 2003514773 T	22-04-2003
			US 2002004586 A1	10-01-2002

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/073106 A2

- (51) International Patent Classification⁷: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/GB03/00058
- (22) International Filing Date: 28 February 2003 (28.02.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0204797.5 28 February 2002 (28.02.2002) GB
0216808.6 18 July 2002 (18.07.2002) GB
0229614.3 19 December 2002 (19.12.2002) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): MLCROSENS BIOPHAGE LIMITED [GB/GB]; London Bioscience Innovation Centre, 2 Royal College Street, London NW1 0TU (GB).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): LANE, Anna, Rose [GB/GB]; Ground Floor Flat, 72 Avondale Road, Croydon, Surrey CR2 6JA (GB). STANLEY, Christopher, J. [GB/GB]; Harradine House, Church Street, Woodhurst, Huntingdon, Cambridgeshire PE28 3BN (GB). WILSON, Stuart, Mark [GB/GB]; 167 Ross Road, South Norwood, London SE25 6TW (GB).
- (74) Agent: SMART, Peter, J.; W.H. Beck, Greener & Co., 7 Stone Buildings, Lincoln's Inn, London WC2A 3SZ (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/073106 A2

(54) Title: BINDING OF PATHOLOGICAL FORMS OF PRION PROTEINS

(57) Abstract: Infective aggregating forms of proteins such as PrP, amyloid, and tau are bound selectively in the presence of the normal form protein using a polyionic binding agent such as dextran sulphate or pentosan (anionic), or polyamine compounds such as pDADMAC (cationic) under selective binding conditions including the use of n-laurylsarcosine at mildly alkaline pH, and may then be assayed.

BINDING OF PATHOLOGICAL FORMS OF PRION PROTEINS

The present invention relates to the use of protease
5 resistant binding agents, typically polyionic materials such
as polyanionic materials including pentosan polysulphate,
dextran sulphate or other polyanionic polyglycosides or
polycationic materials including polybrene, polyamidoamine
dendrimer or poly(diallyldimethylammonium chloride), option-
10 ally under selective conditions to capture the pathological
or rogue form of the prion protein PrP^c and proteins which
are similarly aggregating abnormal forms of proteins which in
their normal form are not aggregated.

Prion diseases, also referred to as transmissible
15 spongiform encephalopathies or TSEs, have only been
recognised recently. Bovine spongiform encephalopathy (BSE)
was first reported in 1985. The first cases of variant
Creutzfeldt Jakob disease (vCJD) were reported in 1996. vCJD
is a fatal neurodegenerative disease in humans believed to be
20 caused by the consumption of BSE contaminated meat. The
incubation time between infection to clinical symptoms in the
human may be many years.

The only identified component of the prion, the agent
causing prion diseases, is PrP^{Sc}, an abnormal isoform of PrP^c
25 (PrP^{Sc} is also referred to as PrP^{res} and PrP^c also referred to
as PrP^{sen}). PrP^{Sc} has previously been regarded as being
distinguished from PrP^c in that it is comparatively protease
resistant. Recently however, it has been published that
there is a protease sensitive form of PrP^{Sc}, i.e. that there
30 is an infective form of PrP that is protease sensitive.

It may be that the infective but protease sensitive PrP^{Sc} is able to aggregate (i.e. is aggregating in nature) but not yet aggregated or at least only partially aggregated.

Both protease insensitive and protease sensitive forms of PrP^{Sc} and core portions of PrP^{Sc} left after partial protease digestion (often referred to in the art as PrP²⁷⁻³⁰) are referred to herein as PrP^{Sc} except where the context indicates that a specific one of these is meant. Also, the term 'aggregating proteins' is used to include both aggregated protease resistant PrP^{Sc} and similar forms of other proteins as well as infective non-aggregated or partially aggregated forms of PrP^{Sc} or other proteins, which may include the newly observed protease sensitive infective PrP^{Sc}.

PrP^C is a GPI anchored glycoprotein of unknown function. Although some other markers for prion diseases have been suggested PrP^{Sc} remains not only an obligatory prion component, but also the only reliable and universally accepted marker for this family of diseases.

The currently favoured methodology for assaying for the presence of PrP^{Sc} is to subject a sample to proteolysis with Proteinase K for a period sufficient to destroy PrP^C and then to determine the presence of surviving PrP^{Sc} by an immunoassay using an antibody which is not selective for PrP^{Sc} in the presence of PrP^C (Serban et al., Neurology, Vol. 40, No. 1, Jan 1990). The use of the protease naturally excludes the presence of an antibody as a capture agent or as a detection agent during the proteolysis step. The protease must be removed or deactivated before the antibody can be introduced. It would be desirable to avoid this limitation on the procedure.

13

The assay depends on the complete removal of PrP^C to avoid false positives and upon the conditions not being such as also to degrade PrP^{Sc} to avoid false negatives. Such conditions of selective proteolysis need to be developed for each type of sample to be assayed. The sensitivity of the resulting assay is limited. For instance, in assays of bovine brain tissue, the sensitivity may only be such that a reliable positive result is obtainable at about the time that the animal would have been likely to show clinically observable symptoms of BSE. Thus, the assay has a sensitivity limit in the region of 1 µg/ml, corresponding to 10⁴-10⁵ prion infectious units.

There is a need for more sensitive and specific diagnostic tests for prion diseases. In particular, an ante-mortem test using blood or other sample types is required to assess the disease status of a particular animal. In the absence of such a method extensive slaughtering of cattle is required once an affected animal is identified within a herd. It is again vital that a diagnostic test is developed to screen the human population and to protect individuals from potential infection from donated blood, surgical procedures and organ and tissue transplants.

US5977324 and US6221614 both describe methods of binding PrP^{Sc} using phosphotungstic acid (PTA). PTA is a non-specific protein precipitant that will also bind to, and precipitate, a wide range of proteins other than PrP^{Sc}. The concentration of the proteins in the sample will also greatly affect the recovery using PTA.

Plasminogen has been reported to bind PrP^{Sc} selectively with respect to PrP^C and was proposed for use in diagnostic

assays (Fischer et al. Nature, 2000, Nov 23, 408 (6811): 479-83). However, this method has not proved sufficiently useful in practice. Plasminogen is also identified in a related disclosure, US 2002/0004586, as being a factor which
5 selectively binds PrP^{Sc}.

According to US 6419916 and related disclosures, the polyamine compound Superfect[™] (a branched polyamine mixture produced by heat induced degradation of a PAMAM dendrimer) and other similar branched polyamines are capable of clearing
10 PrP^{Sc} from cells in vitro. The mechanism is unclear. It is speculated that such compounds may bind directly to PrP^{Sc} arranged as an amyloid with exposed negatively charged moieties and induce a conformational change under acidic conditions. It is said that the effect cannot simply involve
15 binding of PrP^C and inhibiting synthesis of PrP^{Sc} because existing PrP^{Sc} is cleared. The polyamine is found to make PrP^{Sc} protease sensitive provided the pH is below 4. It is deduced that the polyamines act in an acidic cell compartment in the *in vitro* PrP^{Sc} clearance experiments.

20 It would appear from this work that it would be speculative to conclude that such polyamines bind PrP^{Sc}. A number of other possibilities are advanced. No selectivity for the binding of PrP^{Sc} over PrP^C is shown or suggested. Furthermore, it cannot be deduced that any binding that
25 occurs is more than transitory, just serving to alter the conformation of PrP^{Sc} so as to allow protease attack. Also, the action of the polyamines appears to require a low pH. Our own investigations in fact show that such dendrimer polyamines do not bind PrP^{Sc} at such low pH.

30 Pentosan polysulphate (poly-b-xylose-2,3-disulphonate, PPS) is one of a range of large polysulphonated polyglyco-

sides (PGs) (MW 8,000-12,000). Made from beechwood, it is an inexpensive compound that has been used for many years as an anticoagulant similar to heparin, also a PG. PGs including PPS and other polyanions are known to bind both PrP^C and recombinant PrP (recPrP), see for instance Brimacombe DB et al, Biochem J, 1999 Sep 15; 342 pt 3, 605-13. PPS has accordingly been proposed as a potential therapeutic agent for preventing or treating TSE diseases. It has not however been shown to remove existing PrP^{Sc} in vivo or in vitro.

10 In manufacture, sawdust from beechwood is extracted to produce the soluble sugar polymer of xylose (a five member ring sugar) called pentosan. This polymer is then subjected to a sulphation reaction using a mixture of chlorosulphonic acid and pyridine, which results in 3 out of 4 of all the
15 sugar ring hydroxyls having a sulphate ester added to them. The total sulphate content is then about 50-55% by weight which is more than in heparin, in which it is about 30-35%. The only other similar molecule that approaches this high degree of sulphation is dextran sulphate (40-45%). Pentosan
20 has quite a low MW of 3.5-7.0 K.

No selectivity for binding by polyanions or polycations of PrP^{Sc} with respect to binding of PrP^C has been reported. Surprisingly, we have now established conditions under which polyionic materials bind aggregated altered proteins like
25 PrP^{Sc} and further have established conditions under which such polyanions bind these abnormal forms but do not bind their non-aggregated normal forms like PrP^C, the binding
being sufficiently strong and under preferred conditions sufficiently selective to be useful in assays for the
30 presence of the aggregated altered protein (e.g. PrP^{Sc}).

Accordingly, there is now provided in a first aspect of the invention, a process for the selective binding of an aggregating abnormal form of a protein in the presence of the non-aggregating normal form of the protein, comprising

5 contacting under selective binding conditions a material containing both said abnormal and normal forms with a polyionic material having a binding avidity for said aggregating form of the protein as present in the sample. The binding conditions may include the presence of a

10 competition agent in solution, which competition agent has a lesser binding avidity for the abnormal form of the protein than does the polyionic material.

The polyionic material may be in solution or may provide a surface presenting ionic surface groups. In the latter

15 case, the surface may be that of a polymer having said ionic groups covalently bonded within the structure of the polymer or produced by modification of surface groups of the polymer. An example of a suitable polyanionic polymer is Nafion, a perfluorinated sulphonated hydrocarbon polymer available as

20 beads or as sheets. Polycationic polymers may also be used.

Alternatively, the surface is that of a substrate having coated thereon or bonded thereto a substance presenting said ionic groups. An example of a suitable polymer having such surface groups is a non-charged plastics surface activated

25 with maleic anhydride and derivatised with TRIS to produce surface carboxyl groups or with a polycationic material. Polycations or polyanions may instead be passively coated on polymers such as polystyrene.

In the case of a polyanionic material, whether used in

30 solution or coated on a solid surface, the polyanionic material may preferably be a polyanionic polyglycoside.

Generally, the competition agent has a lesser density of ionic groups than the polyionic material. Without being bound by theory, it is likely that the findings described in detail herein are due to aggregating abnormal forms of protein having more binding sites for interaction with ionic groups than the non-aggregating normal form of the same protein. A competition agent having one or a few ionic groups is able to interact with a certain avidity with either the aggregating or non-aggregating forms of the protein but a polyionic material is able to bind the aggregated form of the protein simultaneously through many ionic groups, leading to it having a higher avidity for the aggregating than for the non-aggregating form.

Our experimental results with infected bovine brains indicate that both immobilised polyanions (such as dextran sulphate) and polycations (such as polyethyleneimine) are able to capture the abnormal form of the prion protein PrP^{Sc} in brain homogenates. The signal obtained using an anti-prion protein antibody/enzyme conjugate is approximately 3 to 5 times higher for the best polycationic capture surface than for the best polyanionic capture surface.

In both cases the detergent Sarkosyl (N-lauroyl-sarcosine) can act as a competition agent helpful for improving the specificity of capture of the abnormal protein and avoiding a signal from the normal prion protein, when using a non-specific anti-prion protein antibody. Also, partially digesting the sample with trypsin substantially increases the signal from PrP^{Sc} when using either polycationic or polyanionic compounds, but has no effect on specificity (indicating that, under the conditions employed, trypsin is removing an inhibitor of polyion binding of PrP^{Sc},

rather than preferentially digesting PrP^C, as has been observed for proteinase K).

It is reported in the scientific literature that PrP^{Sc} is natively associated with polyanions such as heparans. It is likely that these negatively charged polymers are interacting with a positively charged region of the PrP^{Sc} structure and there could be multiple interactions with the aggregated proteins.

We propose that a polyanion such as dextran sulphate or pentosan polysulphate is able to bind to the PrP^{Sc} structure with much higher avidity than native heparans and so can displace the endogenous compounds. Thus, highly negatively charged polymers immobilised to a surface can capture specifically the abnormal prion protein. The normal prion protein is non-aggregating and does not have such a high affinity interaction with endogenous heparans or with polyanions such as dextran sulphate. Under the assay conditions chosen the presence of lower affinity anions such as the detergent Sarkosyl improves the specificity of capture still further by competing with the immobilised polyanion for the lower affinity PrP^C interaction sites.

In contrast we suggest that a polycation cannot displace the endogenous heparans from the PrP^{Sc} structure. We suggest that it must instead complex directly with the endogenous heparan/PrP^{Sc} aggregate - forming an ionic interaction with the free negative charges on the heparan. So, in this configuration the native, intact heparan/PrP^{Sc} complex is bound tightly to the immobilised polycation whilst, in the case of an immobilised polyanion the non-native, 'displaced' PrP^{Sc} structure is captured instead. This provides an explanation for the higher signal we obtain with the best

polycationic capture surfaces, in that competition by polyanions for endogenous heparans may not be 100% efficient and so not all of the PrP^{Sc} aggregates are bound by negatively charged polymers.

- 5 Anionic capture agents may be preferable when the aggregating protein is not expected to be bound natively by native heparan, e.g. when the sample is blood or serum or the like rather than tissue.

10 In addition to the ionic interactions proposed, there may be additional hydrophobic binding between other regions of the PrP^{Sc} aggregate and the polymers employed. These will strengthen further the binding interactions.

15 "Avidity" here is used in the usual meaning of the overall binding strength of a molecule with many binding sites with a multivalent binding agent and in contrast to "affinity", being the binding strength between each individual binding site and of the molecule and the binding agent.

20 The competition agent if used is preferably an amino acid amide of a fatty acid, such as n-lauroylsarcosine. Such materials have detergency properties, but in this context may well simply be acting as monovalent binding agents via their terminal COO⁻ group or as partially polyvalent agents through the formation of micelles.

25 In a further aspect, the present invention provides a process for the selective binding of an aggregated abnormal form of a protein in the presence of the non-aggregated normal form of the protein, comprising contacting a material containing both said abnormal and normal forms with a
30 polyanionic polyglycoside under conditions such as to provide selective binding of said abnormal form.

In preferred embodiments of each aspect of the invention said abnormal form of a protein is PrP^{Sc} and said normal form is PrP^C. However, the invention in all its forms is broadly applicable to the selective binding of abnormal aggregating forms of proteins.

Polycationic selective binding agents that can be used include polyethyleneimines, polyamines, including polylysines, polyamidoamines, e.g. PAMAM dendrimers, polyquaternary amines such as poly(diallyldimethylammonium chloride) and 1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromide (also known as hexadimethrine bromide or Polybrene).

The preferred polyanionic polyglycoside is a polysulphonated polyglycoside. However, other anionic sites such as carboxylic acid groups or phosphate groups may be used as well or instead.

Preferably, the polysulphonated polyglycoside is pentosan polysulphate (PPS) or dextran sulphate.

Other polyanionic pentosan or dextran derivatives may be used as the polyanionic polyglycoside.

A high level of sulphonation (or other anionic group) is preferred.

The levels of sulphonation of the carrageenins, dextrans and pentosan are high. If a low proportion of the potential sulphonation sites is actually taken up by sulphate groups then it may be found that the compounds do not interact with the binding sites in the PrP^{Sc} selectively.

Suitable anionic selective binding agents may include:

Pentosan polysulphate (MW 3500-5000), Dextran sulphate 500 (MW 500,000), Iota-carrageenan, Lambda-carrageenin and carrageenans, e.g. Kappa-carrageenan, Heparins and heparans,

Dextran sulphate 8 (MW 8,000), sulphonated polyglycosides such as fucoidan, keratin sulphate, hyaluronic acid polysulphate, colominic acid (bacterial polysialic acid), carrageenan types iii and iv, dermatan sulphate, heparan sulphate, furcellaran, sulphated commercially available polysaccharides e.g. polysorbate, sizofiran, xanthan gum, starch, cellulose compounds, pectin, gastric mucin, ceratonia, agars, acacia gum, Sulphated Glycoside 1, Sulphated Glycoside 2, N-acetyl-D-glucosamines, or Dermatan sulphate L-iduronic acid.

The polyionic material may be one selected to have the ability under non-selective conditions to bind both aggregating altered or rogue forms of a protein and also the non-aggregating normal form of the protein as well as the ability to bind the aggregating form selectively under appropriate conditions.

The desired selectivity is obtainable by suitable adjustment of the reaction conditions, particularly the presence and concentration of the competition agent, the pH and the detergency. Preferably therefore the pH is so selected as to provide said selective binding.

The pH is preferably from 5.6 to 9, e.g. from 7 to 9, more preferably 8 to 9, e.g. from 8.2 to 8.6, especially 8.4, particularly when the detergents described below are used. Suitable buffers include phosphate buffers and Tris buffers.

The salt concentration is preferably not higher than 250mM and is preferably significantly less, e.g. not above 100mM.

Preferably, a detergent is present which promotes said selective binding whether by virtue of detergency or by acting as a competition agent.

Particularly preferred for this purpose are detergents which are an amino acid amide of a fatty acid, e.g. n-lauroylsarcosine or other fatty acid sarcosines. The presence of such a detergent/competition agent is especially, preferred when the selective binding agent is polyanionic.

Preferably the concentration of this detergent is at least 0.05% by weight, more preferably at least 0.1%, preferably at least 0.2%, e.g. 0.2 to 2%, more preferably 0.5 to 1.5%, but greater amounts may be used.

Other detergents having a similar effect may be used, including CHAPS, Brij, Octyl- β -glycoside, Tween 20, Triton X-100 and Nonidet P-40. The use of high concentrations of sodium dodecylsulphate (SDS) is however undesirable. Combinations of n-lauroyl sarcosine (or similar) with other detergents are suitable, preferably containing 0.5 to 2%, e.g. about 1% sarcosine detergent, e.g. with 0.5 to 2%, e.g. about 1%, of one of the detergents listed above, particularly Triton X-100 or Nonidet P-40.

We have found that the presence of trypsin, chymotrypsin, proteinase K, or another such protease can be helpful to prevent inhibition by unknown materials of the binding of aggregating protein to either polyanionic or polycationic selective binding agents. This is especially the case where the sample contains a relatively high level of other proteins, such as is the case if a PrP^{Sc} positive brain sample is diluted with a PrP^{Sc} negative brain material. Additional matrix inhibition prevention can be obtained by including other enzymes of a degradative nature including Dnase and collagenase.

The selective binding agent after binding to said aggregating abnormal form of the protein may be captured with an immobilised capture agent and the presence or amount of a complex formed between said selective binding agent and said capture agent may be determined.

Said capture agent may be a lectin (where the binding agent is suitable, e.g. is a polyglycoside) or an antibody reactive with said selective binding agent. Said selective binding agent may be provided with a selectively bindable tag moiety and said capture agent may then bind to said tag moiety.

Optionally and alternatively, the selective binding agent is immobilised to a solid medium prior to exposure to said sample. The selective binding agent may be provided with a selectively bindable tag moiety and may be immobilised to said solid medium via said tag.

Where a bindable tag moiety is present it may for instance be biotin, fluorescein, dinitrophenol, digoxigenin, or (His)₆.

The selective binding agent may be immobilised directly to a solid rather than through a bindable tag. For instance PG's may be directly coupled by covalent coupling through remaining hydroxyl groups of the PG using solid phases derivatised with for instance epoxy or vinyl sulphone groups.

In each aspect of the invention, whether the binding of the abnormal protein takes place before or after the immobilisation or capture of the selective binding agent, the immobilised selective binding agent/abnormal protein complexes are preferably subjected to a washing step to remove normal protein to improve selectivity. The washing step is preferably conducted using a solution containing a

said competition agent, which may be a detergent solution, which preferably again comprises a detergent that whether by virtue of its detergency or otherwise promotes selective binding. This is preferably an amino amide of a fatty acid, 5 e.g. n-lauroyl sarcosine or another fatty acid sarcosine. Preferably, the concentration of the sarcosine detergent in the washing step is at least 0.05%, preferably at least 0.1%, more preferably at least 0.2%, e.g. 0.2 to 2%, preferably 0.5 to 1.5%. Other detergents may also be present and the wash 10 is preferably buffered to a pH in the range of 5.6 to 8.4.

Said binding of PrP^{Sc} (or other abnormal protein) may be qualitatively or quantitatively determined by conducting an immunoassay for PrP^{Sc} (or other aggregating protein) after separation of bound PrP^{Sc} from unbound PrP^C (or other normal 15 form protein).

Also, once the aggregating form of the protein has been selectively bound and optionally after the normal form has been removed, further polyanionic material, e.g. anionic polyglycoside (suitably labelled with a tag or detectable 20 label) may be bound to the already bound aggregating protein to form a sandwich (e.g. polyglycoside-aggregated protein-polyglycoside label) which may then be quantitated or detected. Selective binding conditions may not be necessary when carrying out the second part of sandwich formation.

25 As mentioned above, the selective binding agent may be immobilised to a solid material either before or after being contacted with the altered protein. Separation of the sample from the solid material may then be used to remove the normal form of the protein from the assay leaving only the altered 30 form for further determination.

25

In this context, solid support materials include not only macroscopic or handlable materials such as microtitre plates, dipsticks and laminar flow devices, but also microbeads and superparamagnetic microbeads, which may be separated off by filtration or by magnetic capture. Biotin or other tags may be conjugated to dextran sulphate or PPS and like materials by standard chemical methods. About one in ten of the sugar backbone residues in PPS is a uronic acid methyl ester and this provides one route for coupling via their carboxyl residues. Other known routes for coupling are hydroxyl (one in four is still free after the sulphation reaction), or end group reducing sugar. Biotin is a convenient bindable tag moiety to employ for binding of the polyanionic material or other selective binding agent to a solid material derivatised with avidin or a material with avidin binding properties such as streptavidin, Neutravidin or Captavidin.

Other molecules suitable for use as bindable tag moieties will include all those which are readily conjugated to the polyionic material and which lend themselves to capture by a suitable capture agent. For instance, a molecule such as fluorescein may be conjugated to PPS or like molecules by reacting an amino fluorescein derivative with the uronic and side chains of pentosan polysulphate in the presence of carbodiimide EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) and may be captured by a suitable readily available antibody, which may itself be immobilised to the solid material. Other tags suitable for antibody capture in this way include dinitrophenol DNP, digoxigenin, nucleic acid or nucleic acid analog sequences, and (His)₆.

Binding agents other than antibodies may also be used, e.g. complementary nucleic acid or nucleic acid analog sequences.

Alternatively however, a capture agent may be used which selectively binds the polyionic material itself rather than through a tag moiety. For instance, polyglycosides may be bound by a suitable lectin or by a suitable antibody. Antibodies for binding PPS are for instance disclosed in Kongtawelert et al; J. Immunol. Methods 1990, Jan 24; 126(1); 39-49. Standard techniques for immobilising such antibodies are well known in the art.

Any known or in future devised method for determining the presence or amount of aggregated or aggregating altered proteins such as PrP^{Sc} (without needing selectivity to exclude the normal form such as PrP^C) can be used to determine the presence or amount of the aggregating form once it has been selectively bound by the selective binding agent and unbound normal form protein has been separated therefrom, suitably by immobilisation of the bound and washing away of residual unbound. Such methods include the known ELISA, RIA, IRMA and other forms of immunoassay, for instance the method embodied in the Bio-Rad PlateliaTM BSE Detection Kit and described in Serban et al.

Depending on the form of the assay used, it may be desired or required to elute the captured abnormal form protein from the selective binding agent prior to the assay. In conducting such an elution step, the presence of a chaotrope such as guanidine thiocyanate may be desirable at a concentration of at least 1M, preferably 2 to 6 M, e.g. 4 to 6 M. Alternative chaotropes may be used including urea.

Additionally or alternatively, a competition agent having a still higher avidity may be used to displace the

protein from the selective binding agent. Sodium dodecyl sulphate (SDS) is suitable for this and is preferably used at a concentration of 0.5 to 1% by weight, preferably above 0.75%.

5 Other proteins that may be selectively bound and determined according to the invention include the β -amyloid protein and tau protein which form plaques in Alzheimer's disease.

10 Without wishing to be bound by the following theory, it is thought that PPS and similar molecules function in the invention by binding pairs of negative sulphate groups to pairs of positive amino acids (Lys and Arg) in the relevant proteins or via the proteins' polyhistidine metal binding sites. Binding to the aggregated forms may be stronger due
15 to the increased number of binding sites presented by the aggregating protein. Suitable anionic detergents may compete more effectively for binding with the non-aggregating form to enhance selectivity. Suitably, the selectivity obtained is such that the avidity for binding to the aggregating protein
20 is at least three times that for the normal form, preferably at least 10:1.

 In a further aspect, the invention includes a process for separating PrP^{Sc} from PrP^C comprising selectively binding PrP^{Sc} to a binding agent in the presence of an amino acid
25 amide of a fatty acid. Preferred conditions for such binding are as set out in detail above and the bound protein may be assayed as described.

 The invention will be further described and illustrated by the following examples making reference to the
30 accompanying drawing in which:

Figure 1 shows dilution curves obtained in Example 9.

Example 1: Separation of normal prion from rogue prion protein using biotinylated pentosan polysulphate and subsequent affinity capture

Introduction

Biotin was conjugated to pentosan polysulphate using standard chemical methods. The biotinylated pentosan polysulphate was allowed to bind to the rogue prion protein in brain homogenates and after binding the pentosan polysulphate/prion complexes were captured using streptavidin-derivatised superparamagnetic beads. The captured rogue prion was subsequently eluted from the beads and detected using the immuno-based Bio-Rad Platelia™ BSE Detection Kit; the latter kit is unable to differentiate the normal and rogue prion protein and will give a signal with both proteins. A bank of two BSE-infected and two uninfected bovine brains were investigated and used to demonstrate that the pentosan polysulphate, under the specific conditions described, could be used to specifically capture rogue prion protein from the brain homogenates.

Method

25 Preparation of the superparamagnetic beads.

1. Just prior to use, 400 µl of streptavidin superparamagnetic beads (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) were washed by magnetic capture in three consecutive 1 ml volumes of TBST (50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% (v/v) Tween20 [Sigma-Aldrich Company Ltd., P-7949]).

2. The beads were finally resuspended in 400µl of TBST.
3. 100µl aliquots were prepared in four tubes and the liquid removed. The beads were then ready for use.

5 Preparation of the brain homogenates.

1. 300-500 mg of each brain tissue was added to the grinding tubes containing grinding beads as supplied in the BSE Purification Kit (Bio-Rad). The liquid originally supplied in these tubes in the kit was
10 aspirated and discarded prior to use.
2. A volume of 150mM NaCl that was calculated to generate a 50% (w/v) brain homogenate after homogenisation was added to each tube.
3. The tubes were homogenised for 45 seconds at speed
15 setting 6.5 on a ribolyzer (purchased from Bio-Rad).
4. The homogenates were diluted 1:1 with 150mM NaCl.
5. 50µl volumes of each homogenate were placed in separate tubes.

20 Specific capture of the rogue prion protein

6. 10µl of 20% (w/v) N-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) was then added to each tube of homogenate and mixed.
7. 50µl of biotinylated pentosan polysulphate (10µg/ml in
25 distilled sterile water) was then added to each tube, mixed and incubated at room temperature for 30 minutes.
8. Each reaction was then added to a tube of washed streptavidin superparamagnetic beads and incubated at room temperature for 30 mins.
- 30 9. The beads were then washed by magnetic capture in three 1 ml volumes of TBST.

Elution of the rogue prion protein and immunodetection.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
1. Finally, after the last wash, the beads from each reaction were resuspended in 10µl of C1 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit).
 2. 5µl of 0.2% (w/v) SDS was added to each bead suspension and mixed.
 3. 5µl of 1M guanidine thiocyanate (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) was added to each bead suspension and mixed.
 4. The reaction was heated at 100°C for 5 minutes.
 5. 100µl of R6 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit) was then added and mixed.
 6. 100µl of each eluate was then used in the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit using the protocol and reagents supplied with this kit. Briefly, this kit involves immunocapture of normal and/or rogue prion protein and immunodetection with a horseradish peroxidase conjugated antibody.

Results

After performing the immunodetection in the microtiter plate-based Platelia™ assay the signal in each well was measured at a wavelength of 450 nm using an ELISA reader.

<u>Brain homogenate used</u>	<u>OD₄₅₀</u>
BSE-infected bovine brain sample 1	0.229
BSE-infected bovine	0.208

brain sample 2	
Normal bovine brain	0.061
sample 1	
Normal bovine brain	0.047
sample 2	

The signal from the two BSE-infected brain homogenates containing rogue prion is significantly higher than in the uninfected normal brain homogenates.

5

Discussion

The Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit cannot differentiate between normal or rogue prion protein. Normally, the specificity for rogue prion protein is achieved
10 by prior digestion of the sample with proteinase K which removes the protease susceptible normal prion protein. Any rogue prion protein in the sample is more resistant to protease digestion and remains and is subsequently detected by the Platelia™ assay. In this experiment we have
15 demonstrated an alternative approach to protease digestion of the sample. We have used defined conditions under which biotinylated pentosan polysulphate in solution can specifically bind to the rogue prion protein in the sample. The rogue prion/pentosan polysulphate complex can then be
20 captured using streptavidin superparamagnetic beads. After washing, the rogue prion protein can subsequently be eluted and detected in the immunoassay. Normal prion protein is not captured by this protocol and is washed away and is therefore not detected in the immunoassay. We have demonstrated that by
25 using this technique we could correctly detect rogue prion

protein in two BSE-infected bovine brains and no signal was observed in two normal bovine brains.

5 Example 2: Separation of normal prion from rogue prion protein using immobilised biotinylated pentosan polysulphate

Introduction

 Biotin was conjugated to pentosan polysulphate using standard chemical methods. The biotinylated pentosan polysulphate was used to coat streptavidin-derivatised superparamagnetic beads. The coated beads were then used to specifically capture the rogue prion protein from brain homogenates. The captured rogue prion protein was subsequently eluted from the beads and detected using the immuno-based Bio-Rad Platelia™ BSE Detection Kit; the latter kit is unable to differentiate the normal and rogue prion protein and will give a signal with both proteins. A bank of three BSE-infected and three uninfected bovine brains were investigated and used to demonstrate that the pentosan polysulphate, under the specific conditions described, could specifically capture rogue prion protein from the brain homogenates.

Method

- 25 Preparation of pentosan polysulphate coated magnetic beads.
- 1. 600 µl of streptavidin superparamagnetic beads (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) were washed by magnetic capture in three consecutive 1 ml volumes of TBS (50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5).
 - 30 2. The beads were finally resuspended in 540µl of TBS and 60µl of 10mg/ml biotinylated pentosan polysulphate in

TBS added. The beads were incubated at room temperature for 1 hour with gentle rocking to allow the pentosan polysulphate to coat the beads.

- 5 3. After coating the beads were washed by magnetic capture in three consecutive 1 ml volumes of 5% (w/v) bovine albumin (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906), 50mM phosphate buffer pH 8.4 and finally resuspended in 60µl of the same buffer. The beads were then ready for use.

10 Preparation of the brain homogenates.

- 15 1. 300-500 mg of each brain tissue was added to the grinding tubes containing grinding beads as supplied in the BSE Purification Kit (Bio-Rad). The liquid originally supplied in these tubes in the kit was aspirated and discarded prior to use.
- 20 2. A volume of 150mM NaCl that was calculated to generate a 50% (w/v) brain homogenate after homogenisation was added to each tube.
3. The tubes were homogenised for 45 seconds at speed setting 6.5 on a ribolyzer (purchased from Bio-Rad).
4. The homogenates were diluted 5-fold with 5% (w/v) bovine albumin, 50mM phosphate buffer pH 8.4.
5. 45µl volumes of each homogenate were placed in separate tubes.
- 25 6. 5µl of 20% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) was added to each tube and mixed thoroughly.
7. 450µl of 5% (w/v) bovine albumin, 50mM phosphate buffer pH 8.4 was then added to each and mixed.
- 30 8. 50µl of 20% (w/v) N-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) was then added and mixed.

Specific capture of the rogue prion protein

1. 10µl of prepared pentosan polysulphate-coated superparamagnetic beads were added to each diluted brain homogenate and incubated with rocking for 1 hour at room temperature.
 2. Each reaction was then washed by magnetic capture with 3 X 100µl volumes of TBS.
- 10 Elution of the rogue prion protein and immunodetection.
1. The beads from each reaction were resuspended in 10µl of C1 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit).
 2. 5µl of 0.2% (w/v) SDS was added to each bead suspension and mixed.
 3. 5µl of 1M guanidine thiocyanate (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) was added to each bead suspension and mixed.
 4. The reaction was heated at 100°C for 5 minutes.
 5. 100µl of R6 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit) was then added and mixed.
 6. 100µl of each eluate was then used in the Bio-Rad.
 7. Platelia™ BSE Detection kit using the protocol and reagents supplied with this kit. Briefly, this kit involves immunocapture of normal and/or rogue prion protein and immunodetection with a horseradish peroxidase conjugated antibody.

Results

- 30 After performing the immunodetection in the microtiter plate-based Platelia™ assay the signal in each well was

35

measured at a wavelength of 450 nm using an ELISA reader.

<u>Brain homogenate used</u>	<u>OD₄₅₀</u>
BSE-infected bovine brain sample 1	0.465
BSE-infected bovine brain sample 2	0.382
BSE-infected bovine brain sample 3	0.437
Normal bovine brain sample 1	0.060
Normal bovine brain sample 2	0.074
Normal bovine brain sample 3	0.066

- 5 The signals from the three BSE-infected brain homogenates containing rogue prion protein is significantly higher than in the uninfected normal brain homogenates.

Discussion

- 10 The Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit cannot differentiate between normal or rogue prion protein. Normally, the specificity for rogue prion protein is achieved by prior digestion of the sample with proteinase K which removes the protease susceptible normal prion protein. Any
- 15 rogue prion protein in the sample is more resistant to protease digestion and remains and is subsequently detected by the Platelia™ assay. In this experiment we have

demonstrated an alternative approach to protease digestion of the sample. We have used defined conditions under which pentosan polysulphate can specifically capture the rogue prion protein from the sample. This captured rogue prion protein is eluted and detected in the immunoassay. Normal prion protein is not captured by the pentosan polysulphate and is washed away and is therefore not detected in the immunoassay. We have demonstrated that by using this technique we could correctly detect rogue prion protein in three BSE-infected bovine brains and no signal was observed in three normal bovine brains.

Example 3: Biotinylation of PPS

Principle of the method.

15

Approximately one in ten of the sugar residues in the poly-xylose backbone of pentosan sulphate is substituted with a uronic acid residue, this in turn is substituted with a methyl ester on some of the carboxyl groups, thus a number of free carboxyl groups exist in the molecule and can be derivatised with carbodiimide to form active esters. These in turn may be substituted with amino species to generate an amide bond. In this particular case, EDC and NHS are chosen to form the active ester and biotin hydrazide is chosen as the amino species. Two reactions were performed, a one step reaction in which biotin hydrazide is present initially and no NHS is added, and a second reaction in which NHS/EDC is allowed to react simultaneously with PS and biotin hydrazide.

30

Materials

Pentosan sulphate (Norton Healthcare) was a gift from Stephen Dealler

Biotin hydrazide 100mg, Pierce#21339 mw 258.33 batch AH41461

5 EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide methiodide] Sigma #16,534-4 , 1g,

NHS [N-Hydroxysuccinimide] Sigma #H7377 5g mw 115.1

Dialysis tubing mwco 3.5k Pierce # 68035

DMSO Sigma

10

Method

The two reactions were conducted using the following protocols in two versions, with and without NHS.:

15 Dissolve 100mg of biotin hydrazide in 6ml of DMSO in a glass vial, this may require warming and/or ultrasonication. The final concentration is thus 16.7mg/ml or 65mM. Take 1,000 mg of pentosan sulphate and dissolve in 10ml of a 50/50 mixture of DMSO and water, this can be done in a plastic
20 universal container. Dissolve 100mg of EDC in 1ml of DMSO in a glass vial, it may need warming. Dissolve NHS (approx 40-50 mg) in 1.0 ml of water.

The reaction is performed in conical bottom polystyrene universal containers, with a small circular magnetic stirrer
25 bar (approx 10mm dia) on a magnetic stirrer base and fitted with a combination pH electrode of 12mm dia (or less).

Example 3a: Reaction without NHS

Place 5.0 ml of pentosan sulphate solution in the
30 reaction vessel, add 1.0 ml of biotin hydrazide solution, stir well and record the pH. A value of 7-8 can be expected.

Add 0.2 ml of EDC solution and whilst continuously stirring, record the pH and add 10 uL aliquots of 1 N HCl from a glass micro-syringe and needle, recording the pH after every addition. Continue additions of acid until the pH is in the
5 range 5-6. This is necessary as the reaction generates OH ions. The reaction should remain clear and colourless throughout. If any white precipitate of biotin hydrazide is formed, then the concentration of DMSO should be increased, the target value is $\geq 50\%$. Leave the reaction for 2-3 hours
10 at room temperature (or overnight if this is more convenient).

Record the final pH of the reaction mixture. Add an equal volume of 1M NaCl to dilute the DMSO down to 25% and displace ionically bound hydrazide and transfer the entire
15 contents to a 35cm length of 2.2cm dia dialysis tubing. Note the DMSO concentration is reduced to 25% to avoid damage to the dialysis tubing, the tubing should also be tested with water prior to use to detect any pinholes and should be only 1/3 full to allow for swelling on dialysis. Dialyse
20 overnight against 2L of water and repeat this several times, the more dialysis the better as pentosan sulphate tends to strongly retain basic ions by non-covalent ionic interaction by virtue of its strong negative charge. Freeze dry the dialysed solution and record the dry weight. The final
25 product should be a firm white cake. Yields can vary a lot, but 50-60% is typical, most of the loss occurs on dialysis, due to MW heterogeneity of the pentosan sulphate and loss of species with a MW of less than 3,500.

Example 3b: Reaction with NHS

This reaction is carried out essentially as above except that 1.0 ml (44mg) of NHS is added to the reaction vial prior to the addition of the EDC reagent which starts the reaction. The initial pH may be in the range of 6-7 and should be adjusted down with 1 N HCl to approx pH 5-6.

Quality Control

After calculating the recovery from the dry weight, make up a solution of 10 mg/ml in water and scan the spectrum from 200 to 400 nm. Peaks should be seen at 260 and 280nm, though one or both may be unresolved shoulders. This adsorption is due to pyridine residues incorporated into the molecule during the sulphation step. They can be used to monitor the concentration of pentosan sulphate, eg during chromatography. Pentosan can be monitored by UV absorption at 260nm, or at lower concentrations by the Toluidine Blue metachromasia assay.

Example 4: Removal of Prion Protein from PlasmaRemoval of the rogue prion protein

1. 100 µl of prepared pentosan polysulphate-coated superparamagnetic beads were added to one of two PrP^{Sc} spiked freshly prepared human plasma aliquots. Both aliquots were incubated with rocking for 1 hour at room temperature.
2. The beads were then removed from the spiked plasma aliquot by magnetic capture. This supernatant, together with the remaining plasma aliquot were then tested for the presence of the rogue prion protein.

Testing of the spiked aliquots for rogue prion protein.

1. The two plasma aliquots were treated with proteinase K under conditions that we have shown to digest normal prion protein but leave rogue protein intact. These conditions are easily determined empirically. The proteinase K treated samples were then tested for the presence of the rogue prion protein using the immuno-based Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit.

Results

- After performing the immunodetection in the microwell plate-based Platelia™ assay the signal in each well was measured at a wavelength of 450 nm using an ELISA reader.
- The rogue prion protein could be readily detected in the spiked serum sample that had not been treated with pentosan polysulphate. In contrast the pentosan polysulphate-treated sample gave no signal in the test demonstrating that there was no detectable rogue prion protein remaining in this sample.

Discussion

This experiment demonstrates that pentosan polysulphate can be used to effectively remove rogue prion protein from samples of interest.

Example 5: Investigation of detergent conditions allowing the specific binding of pentosan polysulphate to the rogue prion protein

Introduction

Biotin was conjugated to pentosan polysulphate using standard chemical methods. The biotinylated pentosan polysulphate was used to coat streptavidin-derivatised
5 superparamagnetic beads. The coated beads were then used to establish conditions of detergent under which the pentosan polysulphate could bind the rogue prion protein but not the normal cellular prion protein.

10 Method

Preparation of pentosan polysulphate coated magnetic beads.

1. 600 µl of streptavidin superparamagnetic beads (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) were washed by magnetic
15 capture in three consecutive 1 ml volumes of TBS (50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5).
2. The beads were finally resuspended in 540µl of TBS, 5% (w/v) bovine albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) and 60µl of 10mg/ml biotinylated pentosan
20 polysulphate in TBS added. The beads were incubated at room temperature for 1 hour with gentle rocking to allow the pentosan polysulphate to coat the beads.
3. After coating the beads were washed by magnetic capture in three consecutive 1 ml volumes of, 50mM phosphate
25 buffer pH 8.4, 5% (w/v) BSA and finally resuspended in 60µl of the same buffer. The beads were then ready for use.

Preparation of the brain homogenates.

- 30 1. 300-500 mg samples of BSE-infected and normal bovine brain tissue were added to the grinding tubes containing

grinding beads as supplied in the BSE Purification Kit (Bio-Rad). The liquid originally supplied in these tubes in the kit was aspirated and discarded prior to use.

2. A volume of 150mM NaCl that was calculated to generate a 50% (w/v) brain homogenate after homogenisation was added to each tube.
3. The tubes were homogenised for 45 seconds at speed setting 6.5 on a ribolyzer (purchased from Bio-Rad).
4. The homogenates were diluted 5-fold with 5% (w/v) BSA, 50mM phosphate buffer pH 8.4.
5. 45µl volume aliquots of each homogenate were placed in separate tubes.
6. 5µl of 20% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) was added to each tube and mixed thoroughly.
7. 450µl of 5% (w/v) BSA, 50mM phosphate buffer pH 8.4 was then added to each aliquot and mixed.
8. 50µl of N-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) at various concentrations of detergent was then added to various aliquots and mixed. One set (one BSE-infected and one uninfected brain) had no N-lauroylsarcosine added.

Capture of prion protein

1. 10µl of prepared pentosan polysulphate-coated super-paramagnetic beads were added to each diluted brain homogenate and incubated with rocking for 1 hour at room temperature.
2. Each reaction was then washed by magnetic capture with 3 X 100µl volumes of TBS.

Elution of the prion protein and immunodetection

1. The beads from each reaction were resuspended in 10µl of C1 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit).
2. 5µl of 0.2% (w/v) SDS was added to each bead suspension and mixed.
3. 5µl of 1M guanidine thiocyanate (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) was added to each bead suspension and mixed.
4. The reaction was heated at 100°C for 5 minutes.
5. 100µl of R6 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit) was then added and mixed.
6. 100µl of each eluate was then used in the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit using the protocol and reagents supplied with this kit. Briefly, this kit involves immunocapture of normal and/or rogue prion protein and immunodetection with a horseradish peroxidase conjugated antibody.

Results

After performing the immunodetection in the microtiter plate-based Platelia™ assay the signal in each well was measured at a wavelength of 450 nm using an ELISA reader.

Final concentration of N-lauroylsarcosine in the bead capture buffer	Bovine brain used	OD ₄₅₀
2%	BSE-infected brain	0.52
2%	Normal brain	0.14
1%	BSE-infected brain	0.33
1%	Normal brain	0.13
0.5%	BSE-infected brain	0.45
0.5%	Normal brain	0.13
0.2%	BSE-infected brain	0.41
0.2%	Normal brain	0.09
0%	BSE-infected brain	0.24
0%	Normal brain	0.86

At all concentrations of N-lauroylsarcosine there was a discrimination between BSE-infected and normal brain. 0.2% N-lauroylsarcosine was the best concentration of detergent and allowed the pentosan polysulphate to bind to and capture the rogue prion protein without binding or capture of the normal prion protein. In the absence of N-lauroylsarcosine, even though SDS detergent was present, there was no discrimination of pentosan polysulphate binding to rogue prion and normal prion protein. Under these conditions the pentosan polysulphate bound both the normal and rogue prion protein.

15 Discussion

1. The specificity of binding of pentosan polysulphate to rogue prion protein under these specific test conditions

is dependent upon the presence of N-lauroylsarcosine or similar detergents. Without this detergent the pentosan polysulphate bound to both normal and rogue prion protein.

5

Example 6: Investigation of pH conditions allowing the specific binding of pentosan polysulphate to the rogue prion protein

10 Introduction

Biotin was conjugated to pentosan polysulphate using standard chemical methods. The biotinylated pentosan polysulphate was used to coat streptavidin-derivatised superparamagnetic beads. The coated beads were then used to establish conditions of pH under which the pentosan polysulphate could bind the rogue prion protein but not the normal cellular prion protein.

Method

20 Preparation of pentosan polysulphate coated magnetic beads.

1. 1 ml aliquots of streptavidin superparamagnetic beads (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) were washed by magnetic capture in three consecutive 1 ml volumes of TBS (50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5).
- 25 2. Each aliquot of beads were finally resuspended in 1 ml of TBS 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) and 100µl of 10mg/ml biotinylated pentosan polysulphate in TBS added. The beads were incubated at room temperature for 1 hour with gentle rocking to allow the pentosan polysulphate to coat the beads.

30

2/6

3. After coating, each aliquot of beads was washed by magnetic capture in three consecutive 1 ml volumes of 5% (w/v) BSA, 50mM Tris buffer pH 8.4.
4. Aliquots of beads were then resuspended in buffers of pH 5.7, 7.5, 8.4 and 9.6 all containing 5% (w/v) BSA.

Preparation of the brain homogenates in buffers of various pH

1. 300-500 mg of BSE-infected and normal bovine brain tissue were each added to a grinding tube containing grinding beads as supplied in the BSE Purification Kit (Bio-Rad). The liquid originally supplied in these tubes in the kit was aspirated and discarded prior to use.
2. A volume of 150mM NaCl that was calculated to generate a 50% (w/v) brain homogenate after homogenisation was added to each tube.
3. The tubes were homogenised for 45 seconds at speed setting 6.5 on a ribolyzer (purchased from Bio-Rad).
4. 50µl of each homogenate was diluted 5-fold in buffers of pH 5.7, 7.5, 8.4 and 9.6 all containing 5% (w/v) BSA.
5. 45µl volumes of each diluted homogenate were placed in separate tubes.
6. 5µl of 20% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) was added to each tube and mixed thoroughly.
7. 450µl of buffer of the same pH as the initial dilution buffer all containing 5% (w/v) bovine albumin was then added to each and mixed.
8. 50µl of 20% (w/v) N-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) was then added and mixed.

Bead capture of the brain homogenates

1. 10µl of prepared pentosan polysulphate-coated super-paramagnetic beads in buffer of the corresponding pH were added to each diluted brain homogenate and
5 incubated with rocking for 1 hour at room temperature.
2. Each reaction was then washed by magnetic capture with 3 x 100µl volumes of TBS.

Elution of the rogue prion protein and immunodetection.

- 10 1. The beads from each reaction were resuspended in 10µl of C1 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit).
2. 5µl of 0.2% (w/v) SDS was added to each bead suspension and mixed.
- 15 3. 5µl of 1M guanidine thiocyanate (Sigma-Aldrich Company Ltd., G-9277) was added to each bead suspension and mixed.
4. The reaction was heated at 100°C for 5 minutes.
5. 100µl of R6 (supplied with the Bio-Rad Platelia™ BSE
20 Detection kit) was then added and mixed.
6. 100µl of each eluate was then used in the Bio-Rad Platelia™ BSE Detection kit using the protocol and reagents supplied with this kit. Briefly, this kit involves immunocapture of normal and/or rogue prion
25 protein and immunodetection with a horseradish peroxidase conjugated antibody.

Results

- 30 After performing the immunodetection in the microtiter plate-based Platelia™ assay the signal in each well was measured at a wavelength of 450 nm using an ELISA reader.

<i>pH buffer used</i>	<i>Bovine brain used</i>	<i>OD₄₉₀</i>
5.7	BSE-infected brain	0.79
5.7	Normal brain	0.30
7.5	BSE-infected brain	1.57
7.5	Normal brain	1.25
8.4	BSE-infected brain	0.42
8.4	Normal brain	0.04
9.6	BSE-infected brain	0.08
9.6	Normal brain	0.04

At a pH of 7.5 and lower the pentosan polysulphate-coated beads could bind both normal and rogue prion protein.

5 At pHs of 9.6 and higher the pentosan polysulphate-coated beads could not bind both forms of the prion protein. At pH 8.4 the pentosan polysulphate-coated beads captured the rogue prion protein but did not capture the normal prion protein. At this pH the pentosan polysulphate shows specificity for

10 binding to the rogue prion protein.

Discussion

The specificity of binding under the test conditions of pentosan polysulphate to rogue prion protein is dependent

15 upon the pH. At pH 8.4 pentosan polysulphate binds rogue prion protein but cannot bind the normal prion protein. At pHs of 7.5 and lower both normal and rogue prion are bound whereas at pHs of 9.6 and higher there is no binding of rogue or normal prion protein. Therefore, for specific binding of

pentosan polysulphate to rogue prion protein under these conditions a pH close to 8.4 should be used.

Example 7 : Demonstration of specific capture of PrP^{res} (PrP^{sc}) to a high charge density polyanionic ligand using competing lower charge density polyanions to selectively inhibit binding of PrP^c

Background

10 PrP can be bound to immobilised polyanions. In the absence of competing polyanions in the capture buffer both PrP^{res} and PrP^c are captured. Specificity for capture of PrP^{res} can be achieved by including in the capture buffer a polyanion of lower charge density than that of the capture
15 polyanion. In this example dextran sulphate is used as the high charge density capture polyanion and N-lauroyl sarcosine (which forms multi-molecular detergent micelles) and pentosan polysulphate or fucoidan are used as the weaker charge density competing polyanions.

20

Method

1. Maxisorp microtitre wells were coated with dextran sulphate (500 000 mwt) following standard procedures.
2. 100µl of brain homogenate containing 1mg brain, 50mM
25 Tris pH 8.3, 1% (w/v) BSA, 1% (v/v) Triton X-100 were added to the coated wells. In some cases this capture buffer also contained either 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, fucoidan, dextran sulphate or various concentrations of pentosan polysulphate.

3. After incubation for 2 hours to allow capture of prion protein, the wells were washed x3 with 50mM Tris pH 8.3, 1% (w/v) BSA, 1% (v/v) Triton X-100.
4. The wells were then washed x3 with PBS.
- 5 5. 100µl of 5M guanidinium thiocyanate was added to each well and incubated 5 mins at 4°C.
6. Wells were washed 3x with PBS and then captured prion protein detected with the anti-prion protein conjugate from the Bio-rad Platelia™ BSE-detection kit following the kit protocol.
- 10 7. Developed signal was measured in an ELISA reader at OD450.

Results

Competing polyanion used	BSE-infected or normal brain	OD450
None	BSE-infected	0.10
None	Normal	0.15
1% (w/v) N-lauroyl sarcosine	BSE-infected	0.95
1% (w/v) N-lauroyl sarcosine	Normal	0.03
1mg/ml pentosan polysulphate	BSE-infected	0.26
1mg/ml pentosan polysulphate	Normal	0.03
0.1mg/ml pentosan polysulphate	BSE-infected	0.14
0.1mg/ml pentosan polysulphate	Normal	0.07
1mg/ml fucoidan	BSE-infected	0.13
1 mg/ml fucoidan	Normal	0.03
1 mg/ml dextran sulphate	BSE-infected	0.02
1 mg/ml dextran sulphate	Normal	0.03

Discussion

- 5 In the absence of competing polyanion in the capture buffer the overall signal is lower and there is no difference in signal from infected or normal brain i.e. there is no specific capture of PrP^{Sc}. The signal from infected brain, however, is increased by including a competing polyanion in
- 10 the capture buffer and the signal from the corresponding

normal or uninfected brain is suppressed. In this example, the best differentiation between infected and normal brain is achieved by the use of 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine in the capture buffer. In addition, a differentiation between
5 infected and normal brain can be achieved with fucoidan or pentosan polysulphate. With pentosan polysulphate the differentiation can be increased by increasing the concentration of the competing polyanion, pentosan polysulphate, in the capture buffer from 0.1 to 1 mg/ml. As a
10 control, if dextran sulphate is included in the capture buffer the signal, as expected, is reduced to background as it competes for and inhibits the binding of the PrP^{sc} to the immobilised dextran sulphate.

15 Example 8 : Demonstration of specific capture of PrP^{sc} to a high charge density polyanion coated surface

Background

In this experiment it was demonstrated that PrP^{sc} could
20 be specifically captured to a polyanionic surface. In this instance, the surface was provided by derivatised maleic anhydride polystyrene. Uncharged polysorp and maxisorp wells were used as controls. In other experiments it has been demonstrated that these uncharged surfaces can be derivatised
25 with polyanionic dextran sulphate and can then bind PrP^{sc}.

Method

1. Maleic anhydride activated polystyrene microplate wells (Perbio Science UK Ltd., Cheshire) were derivatised with
30 TBS 5% (w/v) BSA for 60 mins at room temperature. This generates a carboxyl charged surface on the plastic (see

- product literature). As non-charged controls, polysorp and maxisorp wells (Nunc) were also investigated. In addition, maxisorp wells were also coated with a polyanionic dextran sulphate ligand using the procedure described in Example 9.
- 5 2. 100 µl of brain homogenates containing 1 mg infected or uninfected brain in 50mM Tris pH 8.3, 1% (w/v) BSA, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine were added to the wells.
- 10 3. After incubation for 2 hours to allow capture of prions, the wells were washed x3 with 50 mM Tris pH 8.3, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine.
4. The wells were then washed x3 with PBS.
5. 100 µl of 5M guanidinium thiocyanate was added to each well and incubated 5 mins at 4°C.
- 15 6. Wells were washed 3x with PBS and then captured prion detected with the anti-prion conjugate from the Bio-Rad Platelia™ BSE-detection kit following the kit protocol.
7. Developed signal was measured in an ELISA reader at
- 20 OD450.

54

Results

Type of wells used	BSE-infected or normal brain	OD450
Anionic	BSE-infected	0.2
Anionic	Normal	0.03
Polysorp	BSE-infected	0.05
Polysorp	Normal	0.03
Maxisorp	BSE-infected	0.02
Maxisorp	Normal	0.02
Maxisorp coated with dextran sulphate	BSE-infected	1.0
Maxisorp coated with dextran sulphate	Normal	0.02

Discussion

5 The anionic polystyrene surface, under the conditions used in this experiment, specifically captured PrP^{res}. Uncharged plastic did not have this effect unless it had been coated with a polyanionic ligand.

Example 9: Study of effects of dilution of positive brain sample in negative sample

5 Material

Positive Sample: A 25% suspension of brain homogenate known to be positive for PrP^{sc}

Negative Sample: A 25% suspension of brain homogenate known to be negative for PrP^{sc}

10

Preparation

Maxisorb plates were coated according to the following coating protocol. 1mg of Polybrene was coated onto the plates in carbonate buffer at pH 7.4 and left overnight, washed 3 times with PBS. The plates were then coated with 1mg of dextran sulphate in PBS. After 6 hours, the plates were washed 3 times with PBS, then blocked with 5% BSA by adding 400µl of 5% BSA solution and leaving for 30 minutes. Plates were then washed 3 times with PBS and allowed to dry.

Sample preparation

Preparation of sample dilution in negative brain

sample	Method
Neat +ve	40µl of +ve sample
1/5	8µl of +ve sample + 32µl of -ve sample
1/10	5µl of +ve sample + 45µl of -ve sample
1/100	6µl of (1/10 diluted +ve sample) + 54µl of -ve sample
1/250	20µl of (1/100 diluted +ve sample) + 30µl of -ve sample
1/1000	10µl of (1/250 diluted +ve sample) + 30µl of -ve sample
Neat -ve	25µl of -ve sample

5 Preparation of sample dilution in water

sample	Method
Neat +ve	40µl of +ve sample
1/5	8µl of +ve sample + 32µl of H ₂ O
1/10	5µl of +ve sample + 45µl of H ₂ O
1/100	6µl of (1/10 diluted +ve sample) + 54µl of H ₂ O
1/250	20µl of (1/100 diluted +ve sample) + 30µl of H ₂ O
1/1000	10µl of (1/250 diluted +ve sample) + 30µl of H ₂ O

Sample preparation prior to running in assay

40µl of sample was mixed with 60µl of H₂O and 25µl of capture buffer, 250 mM Tris pH 8.4, 5% BSA, 5% Triton X-100, 5% sarkosyl, 1.25 mg/ml trypsin.

5

Assays were performed according to the following Assay Protocol:

1. Add 100µl of sample to plate and incubate at RT for 120 minutes.
- 10 2. Wash X 3 with 50mM Tris pH8.4 +1%sarkosyl and X 3 with PBS.
3. Add 100µl of 4MGUSCN in 20% PEG and incubate for 10 minutes at 2-8°C.
4. Wash X 3 with PBS.
- 15 5. Add 100µl of Bio-Rad Platelia™ enzyme antibody conjugate and incubate at 2-8°C for 60 minutes.
6. Wash X 5 with Bio-Rad Platelia™ wash.
7. Add 100µl of Bio-Rad Platelia™ substrate and incubate for 30minutes in dark.
- 20 8. Add 100µl of Bio-Rad Platelia™ stop solution and read.

Plate Layout

	1	1
A	Neat +ve	1/10 In H ₂ O
B	1/5 In negative brain	1/100 In H ₂ O
C	1/10 in negative brain	1/250 In H ₂ O
D	1/100 In negative brain	1/1000 In H ₂ O
E	1/250 in negative brain	
F	1/1000 in negative brain	
G	Neat -ve	
H	1/5 In H ₂ O	

The results obtained were as follows:

Dilution of 10mg of brain

homogenate in -ve brain

sample label	mg of -ve brain	mg of +ve brain	Dilution Factor	OD
Neat +ve	0.00	10.00	1	4
1/5	8.00	2.00	5	1.992
1/10	9.00	1.00	10	1.252
1/100	9.90	0.10	100	0.175
1/250	9.96	0.04	250	0.077
1/1000	9.99	0.01	1000	0.039
Neat -ve	10.00	0.00	0	0.021

Dilution of 10mg of brain
homogenate in H₂O

sample label	mg of -ve brain	mg of +ve brain	Dilution Factor	OD
Neat +ve	0.00	10.00	1	4
1/5	0.00	2.00	5	2.377
1/10	0.00	1.00	10	1.395
1/100	0.00	0.10	100	0.145
1/250	0.00	0.04	250	0.053
1/1000	0.00	0.01	1000	0.016

Summary

mg of +ve brain	OD	
	Diluted in -ve brain	Diluted in H ₂ O
10.00	4	4
2.00	1.992	2.377
1.00	1.252	1.395
0.10	0.175	0.145
0.04	0.077	0.053
0.01	0.039	0.016
0.00	0.021	----- ----

These results are presented graphically in Figure 1, which shows the dilution curves for dilution of positive brain with respectively water and negative brain. The two curves are essentially the same, demonstrating that the presence of negative brain material does not interfere with the assay.

Example 10: Capture of aggregated tau protein in Alzheimer's brain and normal age-matched controls

10

We have shown that, under defined conditions, various selective capture agents are specific for the capture of aggregated pathogenic prion protein such that normal unaggregated prion is not captured. The aggregated prion protein has an extensive beta-pleated sheet structure whereas normal prion is mostly alpha helix in structure. This example demonstrates that other aggregated beta-pleated sheet proteins such as tau aggregates that are found in Alzheimer's Disease can similarly be selectively captured.

20

Method

1. 25%(w/v) homogenates of Alzheimer's and age matched control brains were prepared in distilled water.
2. 4µl of brain was made up to 100µl in Capture buffer (50mM Tris pH 8.4, 1%(v/v) Triton X-100, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, 1% (w/v) BSA).
3. 25µl of brain was also made up to 100µl in Capture buffer containing 25µg Trypsin.
4. Duplicate 100µl aliquots of brain prepared as in steps 2 and 3 above were added to dextran sulphate-coated

30

- microtiter wells and incubated for 2 hours at room temperature.
5. Wells were then washed three times with 50mM Tris pH 8.4, 1%(w/v) N-lauroyl sarcosine.
- 5 6. Samples were incubated with an anti-tau monoclonal antibody in PBS 0.1%(v/v)Tween20.
7. After 1 hour at room temperature wells were washed three times with PBS 0.1%(v/v)Tween20.
8. Immobilised primary antibody was detected with an anti-
10 mouse IgG horseradish peroxidase conjugate following standard procedures.

Results

15

Results with the anti-tau antibody

Brain	1 mg brain No trypsin	10mg brain With trypsin
Alzheimer's 1	1.32	1.26
Alzheimer's 2	0.85	0.62
Control 1	0.56	0.20
Control 2	0.97	0.51

Discussion

20

It is known that the brains from most aged individuals contain aggregated tau but in Alzheimer's Disease there are more of these aggregates than in age matched controls. Here, the selective capture agent is capturing these aggregates. In this example, trypsin digestion decreases the binding of

the protein and reduces the signal but, under these conditions, does not reduce it to back-ground. The ratio of signal after treatment with trypsin to the signal without treatment was much higher in the Alzheimer's brains than in
5 the controls. This suggests that there is more protease resistant aggregates of tau protein in Alzheimer's brain compared to the age matched controls.

10 Example 11: The effect of titrating Trypsin on PrP^{Sc} positive samples

Method

Dextran sulphate coated plate:

15 1mg of Hexadimethrine bromide (Polybrene) (100µl of 10mg/ml in carbonate buffer pH 7.4) was coated onto Maxisorb plates and left over night at RT°.

Each plate was then washed 3 times with PBS and coated with 1mg of Dextran Sulphate (MW 500000) (10mg/ml stock in
20 Tris buffer pH 8.6) and left at RT° for 4hrs.

The plates were then washed 3 times with PBS and then blocked with 300µl of 5%BSA solution in TBS and left at RT° for 30 minutes.

The plates were then washed 3 times with PBS.

25

Capture Buffer

250mM Tris buffer at pH 8.4 containing 5% BSA, 5% Sarkosyl, 5% Triton

30 Sample

Weakly and strongly positive brains BI63 and SV10 (25% homogenate) were treated as follows to provide samples for assay.

25µl of brain homogenate + 25µl of capture buffer, 250 mM Tris pH 8.4, 5% BSA, 5% Triton X-100, 5% sarkosyl, + 65µl of H₂O.

To this sample 10µl of various concentrations of Trypsin was added.

10 Wash Buffer

50mM Tris pH8.4 +1% sarkosyl

Method

15 Assay Protocol

1. Add 100µl of sample to plate and incubate at RT for 120 minutes.
2. Wash X 3 with 50mM Tris pH8.4 +1% sarkosyl and X 3 with PBS.
3. Add 100µl of 4MGuSCN (in 20% PEG) and incubate for 10 minutes at 2-8°C.
4. Wash X 3 with PBS.
5. Add 100µl of Bio-Rad Platelia™ enzyme antibody conjugate and incubate at 2-8°C for 60 minutes.
6. Wash X 5 with Bio-Rad Platelia™ wash.
7. Add 100µl of Bio-Rad Platelia™ substrate and incubate for 30 minutes in dark.
8. Add 100µl of Bio-Rad Platelia™ stop solution and read.

Results

5mg of Positive
brain Bi63

Trypsin (µg)	OD
1000	0.135
100	0.14
25	0.169
10	0.173
1	0.068
0	0.068

5mg of Positive
brain SV10

Trypsin (µg)	OD
25	2.858
0	0.894

5 Conclusion

The presence of Trypsin appears to have increased the signal. It also appears that a broad concentration range of Trypsin can be used without a detrimental effect on assay.

Example 12: Demonstration of the specific binding of PrP^{Sc} by poly cations

Method

5 This example demonstrates the use of various poly cations for specific capture of PrP^{Sc}. The ligands were either passively coated onto polystyrene microplates or actively coated (i.e. bound), where appropriate, to maleic anhydride plates.

10

Selective binding agent immobilisation

 All the selective binding agents were immobilised overnight at 16-25°C in 50mM carbonate buffer pH 9.6 at a concentration of 10µg/ml. After immobilization, the wells
15 were washed x3 with PBS and then blocked with 5% (w/v) BSA in PBS for 30 mins. After blocking, wells were washed x2 with PBS before use. The PAMA dendrimer starbust, poly L-lysine and polyethyleneimine were coated onto both Maxisorp and maleic anhydride microplates whereas the polybreen and
20 pDADMAC were coated onto the Maxisorp plates only.

Capture of PrP^{Sc}

- 25 1. BSE-infected bovine and uninfected bovine brains were homogenized in distilled water following commercially defined protocols.
2. 0.5 mg of homogenised brain was captured in ligand coated wells in a total volume of 100µl 50mM Tris pH 8.3, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) BSA, 0.5mg/ml trypsin (porcine pancreas).

3. After capture for 2 hours at 18-25°C the wells were washed x3 with 50mM Tris pH 8.3, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine.
4. The wells were then washed x3 with PBS and incubated for 10 mins with 100µl of 4M guanidinium thiocyanate, 20% PEG 8000 at 4-8°C.
5. The wells were washed x3 with PBS and then incubated with an anti-prion monoclonal antibody horseradish peroxidase conjugate.
6. After 60 mins the wells were washed x5 with PBS 0.1% (v/v) Tween20 and 100µl TMB substrate added.
7. After 30mins the OD450 of each reaction was measured and recorded (see table below).

15 Results

Binding Agent	Passive adsorption		Active adsorption	
	Positive	Negative	Positive	Negative
PAMA dendrimer starburst	0.938	0.030	0.097	0.026
Polybreen	0.019	0.016	ND	ND
Poly L-lysine	0.070	0.017	0.001	0.001
pDADMAC*	1.828	0.037	ND	ND
polyethyleneimine	0.118	0.030	0.402	0.055

* Aldrich 40903-0-mw 400,000 - 500,000

Discussion

The pDADMAC and PAMA dendrimer starburst poly cations work well as PrP^{Sc}-specific ligands when passively coated to polystyrene microplates. The pDADMAC works best in this series of binding agents. Polyethyleneimine works to some degree when immobilised on maleic anhydride microplates through its amino groups.

This experiment demonstrates that a variety of poly cations can be used to specifically capture PrP^{Sc} from infected brain under the given Capture Buffer conditions used. These agents can be passively or actively immobilised to polystyrene surfaces. Other experiments have demonstrated that maximum signal from 20mg of positive brain can be achieved in the presence of 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine in the Capture Buffer; without N-lauroyl sarcosine the signal is reduced. This illustrates that the capture agents perform best under defined buffer conditions.

Example 13: Capture of aggregated beta amyloid and tau in Alzheimer's brain and normal age-matched controls by polycationic binding agent

Background

pDADMAC, under defined conditions, has been shown to be specific for the capture of aggregated pathogenic prion protein; normal unaggregated prion is not captured. The aggregated prion protein has an extensive beta-pleated sheet structure whereas normal prion is mostly alpha helix in structure. It is postulated that the binding agent may recognize other aggregated beta-pleated sheet proteins such as beta-amyloid and tau aggregates that are found in

Alzheimer's disease. The experiments below were performed in order to investigate this hypothesis.

Method

- 5 1. 25% (w/v) homogenates of Alzheimer's and age matched control brains were prepared in distilled water.
2. 80µl of brain homogenate was made up to 100µl in Capture buffer (50mM Tris pH 8.4, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine, 1% (w/v) BSA) and added to
10 polycationic-coated microwells (formed by coating the wells with poly (diallyldimethyl ammonium chloride) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catalogue number 40,903-0).
3. After incubation for 2 hours at room temperature, the
15 wells were washed three times with 50mM Tris pH 8.4, 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine and then incubated with an anti-tau monoclonal antibody in PBS 0.1% (v/v) Tween20.
4. After 1 hour at room temperature wells were washed three times with PBS 0.1% (v/v) Tween20.
- 20 5. Immobilised primary antibody was detected with an anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate following standard procedures.

Results

Brain	Classification by brain bank	OD450
67/97	Positive	1.85
73/97	Positive	0.80
163/97	Positive	0.61
149/97	Positive	0.45
97/97	Negative	0.05
98/98	Negative	0.08

5 Discussion

The polycationic binding agent enables capture of the tau aggregates. When the captured tau is detected with the anti-tau antibody, the Alzheimer's disease brains all gave a high positive signal whereas the negative control brains gave a low negative signal. In conclusion, capture with a polycation under the specified conditions can enable differentiation of Alzheimer's disease brains from those brains without the disease.

15 Example 14: Effect of different proteases and DNase on the matrix inhibition of pDADMAC capture of PrP^{Sc}

Background

20 The effect of different proteases on the effectiveness of capture of PrP^{Sc} to polycation-coated plates (formed by coating the wells with poly (diallyldimethyl ammonium

chloride) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catalogue number 40,903-0) were investigated.

Method

- 5 1. 80µl of brain homogenate was made up to 100µl by
addition of 20µl of Capture buffer (250mM Tris pH 8.3,
5% (v/v) Triton X-100, 5% (w/v) N-lauroyl sarcosine, 5%
(w/v) BSA) containing different proteases and/or DNase.
- 10 2. The homogenates were then added to polycationic-coated
microwells.
3. After incubation for 2 hours at room temperature, the
wells were washed six times with PBS.
4. 100µl 4M Guanidine thiocyanate, 20% (w/v) PEG was added
to each well.
- 15 5. After incubation for 10 minutes at room temperature
wells were washed three times with PBS.
6. 100µl of anti-prion protein horseradish peroxidase
conjugate (diluted 1:1500 in PBS 0.1% (v/v) Tween 20 and
5% (w/v) BSA) was added.
- 20 7. After 1 hour at room temperature wells were washed five
times with PBS 0.1% (v/v) Tween 20.
8. Immobilised conjugate was detected with TMB solution
following standard protocols.

Results

5 Assessing effects of Chymotrypsin, Trypsin , DNase and Proteinase K in Capture Buffer

Protease or DNase used	Infected bovine brain
No protease or DNase	0.122
Chymo/Trypsin (Conc both 6.25mg/ml)	0.139
Dnase/Trypsin (Conc 1mg/ml Dnase, 6.25mg/ml Trypsin)	0.639
Chymo/Dnase (Conc 1mg/ml Dnase, 6.25mg/ml Chymo)	0.616
Chymo/Dnase/Trypsin Conc 1mg/ml Dnase, 6.25mg/ml Chymo and Trypsin)	0.460
Trypsin (Conc 6.25mg/ml)	0.568
Chymo (Conc 6.25mg/ml)	0.171
Dnase (Conc 1mg/ml)	0.180
Proteinase K (Conc 1mg/ml)	0.531
Pronase (Conc 1.25mg/ml)	0.222
Pronase (Conc 6.25mg/ml)	0.178

Titration of Trypsin and Chymotrypsin concentrations in Capture buffer

Protease used	Infected bovine brain
Trypsin 6.25mg/ml	0.732
Trypsin 1.25mg/ml	0.726
Chymo 3.125mg/ml	0.566
Chymo 0.625mg/ml	0.433

5

Discussion

It has been demonstrated that the polycationic ligand under certain conditions is specific for binding to PrP^{Sc}. However, the signal can be reduced by matrix effects derived from constituents of the brain homogenate that can interfere with binding and reduce the signal. This matrix effect can be reduced and the signal from infected brain increased by the use of proteases. This study shows that trypsin, chymotrypsin and proteinase K are effective at removing the matrix inhibition; pronase (at the concentrations investigated) is less effective. Trypsin at a concentration of 6.25-1.15 mg/ml is equally effective whereas chymotrypsin is more effective as the concentration is increased. DNase has a demonstrable but smaller effect on removal of matrix inhibition.

20

Example 15 : Effect of pH and salt on pDADMAC capture of Prion Proteins

Background

5 The effects of pH and salt concentration on the effectiveness of capture of PrP^{Sc} to polycation-coated plates (formed by coating the wells with poly (diallyldimethyl ammonium chloride) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catalogue number 40,903-0) were investigated

10

Method

1. 80µl of brain homogenate was made up to 100µl by addition of 20µl of Capture buffer (250mM Tris, see Table for pH, 5%(v/v) Triton X-100, 5% (w/v) N-lauroyl
- 15 sarcosine, 5% (w/v) BSA and 6.25mg/ml of Trypsin) containing various concentrations of salt and adjusted to various pHs was investigated.
2. The homogenates were then added to polycationic-coated microwells.
- 20 3. After incubation for 2 hours at room temperature, the wells were washed six times with PBS.
4. 100µl 4M Guanidine thiocyanate, 20% (w/v) PEG was added to each well.
5. After incubation for 10 minutes at room temperature
- 25 wells were washed three times with PBS.
6. 100µl of anti-prion protein horseradish peroxidase conjugate (diluted 1:1500 in PBS 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) BSA) was added.
7. After 1 hour at room temperature wells were washed five
- 30 times with PBS 0.1%(v/v)Tween20.

24

8. Immobilised conjugate was detected with TMB solution following standard protocols and the OD450 of the reactions measured.

5 Results

Effect of pH

Capture Buffer pH	Infected bovine brain	Negative bovine brain
5	0.177	0.119
6	0.082	0.1
7	0.093	0.045
8.4	0.226	0.039
9	0.24	0.038
10	0.25	0.037

25

Effect of salt

Capture Buffer	Infected bovine brain	Uninfected bovine brain
20mM NaCl	0.476	0.038
100mM NaCl	0.361	0.039
250mM NaCl	0.191	0.028
1M NaCl	0.06	0.024

5 Discussion

As the pH of the Capture buffer is lowered the signal from the uninfected brain increases but the signal from the infected brain decreases. At pHs of greater than 8.0 the optimum positive to negative signal ratio is achieved.

- 10 As the salt concentration in the Capture buffer is increased the signal from the infected brain progressively decreases. This indicates that a low salt concentration or no salt is the optimum condition for the PrP^{sc} capture.

Example 16 : Effect of varying concentrations of N-lauroyl sarcosine and protease on pDADMAC capture of PrPSc

Background

5 The effect of different N-lauroyl sarcosine concentrations in the presence or absence of trypsin were investigated on the effectiveness of capture of PrPSc to polycation-coated plates (formed by coating the wells with poly (diallyldimethyl ammonium chloride) (pDADMAC), (Aldrich
10 Chemical Company Inc., catalogue number 40,903-0) were investigated.

Method

- 15 1. 80µl of infected brain homogenate was made up to 100µl by addition of 20µl of Capture buffer (250mM Tris pH 8.3, 5%(v/v) Triton X-100, 5% (w/v) BSA) containing different concentrations of protease and N-lauroyl sarcosine.
- 20 2. The homogenates were then added to polycationic-coated microwells.
3. After incubation for 2 hours at room temperature, the wells were washed six times with PBS.
4. 100µl 4M Guanidine thiocyanate, 20% (w/v) PEG was added to each well.
- 25 5. After incubation for 10 minutes at room temperature wells were washed three times with PBS.
6. 100µl of anti-prion protein horseradish peroxidase conjugate (diluted 1:1500 in PBS 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) BSA) was added.
- 30 7. After 1 hour at room temperature wells were washed five times with PBS 0.1%(v/v)Tween20.

8. Immobilised conjugate was detected with TMB solution following standard protocols.

Results

Detergent and protease used in Capture Buffer		Concentrations of agent used	OD450
N-lauroyl sarcosine Trypsin	0		0.08
	1.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	2.5%		1.181
	1.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	5%		2.287
	1.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	10.0%		2.628
	1.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	0		0.171
	6.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	2.5%		2.384
	6.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	5%		2.725
	6.25mg/ml		
N-lauroyl sarcosine Trypsin	10.0%		2.883
	6.25mg/ml		

5

Discussion

In the absence of N-lauroyl sarcosine there is no signal from the infected brain with low concentrations of trypsin. At higher concentrations of trypsin, however, some signal is restored in the absence of N-lauroyl sarcosine.

10

Whilst the invention has been described with particular reference to preferred embodiments thereof it will be

appreciated that many modifications and variations thereof are possible within the general scope of the invention. Any variation of the invention as explicitly claimed which would operate in the same way to produce the same result is to be
5 within the protection conferred by the application.

In this specification, unless expressly otherwise indicated, the word 'or' is used in the sense of an operator that returns a true value when either or both of the stated conditions is met, as opposed to the operator 'exclusive or'
10 which requires that only one of the conditions is met. The word 'comprising' is used in the sense of 'including' rather than in to mean 'consisting of'.

CLAIMS

1. A process for the selective binding of an aggregating abnormal form of a protein in the presence of the non-aggregating normal form of the protein, comprising contacting under selective binding conditions a material containing both said abnormal and normal forms with a binding agent which is a polyionic material having a binding avidity for said aggregating form of said protein as present in the sample.
2. A process as claimed in claim 1, wherein said selective binding conditions include the presence of a competition agent in solution, which competition agent has ionic groups having a lesser binding avidity for the abnormal form of the protein than does the polyionic material.
3. A process as claimed in claim 1 or claim 2, wherein the binding agent is protease resistant.
4. A process as claimed in any preceding claim, wherein a protease is present during said binding or wherein said protein is exposed to the action of a protease after being bound.
5. A process as claimed in any preceding claim, wherein the binding agent is a polyanionic material having a multiplicity of anionic groups or a polycationic material having a multiplicity of cationic groups.

6. A process as claimed in Claim 5, wherein said polyionic material has a multiplicity of anionic groups which are sulphate, carboxyl or phosphate groups or a multiplicity of cationic groups which are amino groups, imine groups or quaternary ammonium groups.
7. A process as claimed in Claim 6, wherein the said polyionic material is a polyanionic polyglycoside.
8. A process as claimed in Claim 7, wherein the polyanionic polyglycoside is a polysulphonated polyglycoside.
9. A process as claimed in Claim 8, wherein the polyanionic polyglycoside is a polyanionic pentosan derivative or dextran derivative.
10. A process as claimed in Claim 9, wherein the polysulphonated polyglycoside is pentosan polysulphate (PPS) or dextran sulphate.
11. A process as claimed in Claim 5, wherein said polyionic material is hexadimethrine bromide, PAMAM dendrimer, poly L-lysine, pDADMAC or polyethyleneimine.
12. A process as claimed in any preceding claim, wherein the competition agent has a lesser density of ionic groups than the polyionic material.
13. A process as claimed in claim 12, wherein the competition agent is anionic.

14. A process as claimed in claim 13, wherein the competition agent is an anionic detergent.
- 5 15. A process as claimed in Claim 13, wherein the competition agent is an amino acid amide of a fatty acid.
- 10 16. A process as claimed in Claim 15, wherein the competition agent is n-lauroylsarcosine.
17. A process as claimed in any preceding claim, wherein the pH is such as to promote said binding of the binding agent to the abnormal form of the protein.
- 15 18. A process as claimed in Claim 17, wherein the pH is from 8 to 9.
19. A process as claimed in Claim 18, wherein the pH is from 8.2 to 8.6.
- 20 20. A process as claimed in any preceding claim, wherein a detergent is present which promotes binding of the binding agent to the abnormal form of the protein.
- 25 21. A process as claimed in any preceding claim, wherein said binding agent after binding to said aggregated abnormal form of the protein is captured with an immobilised capture agent.

22. A process as claimed in Claim 21, wherein said capture agent is a lectin or an antibody reactive with said binding agent.
- 5 23. A process as claimed in Claim 21, wherein the said binding agent is provided with a selectively bindable tag moiety and said capture agent binds to said tag moiety.
- 10 24. A process as claimed in any one of Claims 1 to 20, wherein the binding agent is immobilised to a solid medium prior to exposure to said abnormal form of the protein.
- 15 25. A process as claimed in Claim 24, wherein the medium is a substrate having said binding agent coated thereon.
- 20 26. A process as claimed in Claim 24, wherein the binding agent is provided with a selectively bindable tag moiety and is immobilised to said solid medium via said tag moiety.
- 25 27. A process as claimed in Claim 23 or Claim 26, wherein said bindable tag moiety is biotin, fluorescein, dinitrophenol, digoxigenin, a nucleic acid or nucleic acid analogue sequence or (His)₆.
- 30 28. A process as claimed in any one of Claims 1 to 20, wherein said binding agent is in a solid which provides a surface having said binding avidity.

29. A process as claimed in Claim 28, wherein the surface is that of a polymer having ionic groups covalently bonded within the structure of the polymer or produced by modification of surface groups of the polymer.
- 5
30. A process of assay for the presence of an abnormal aggregating form of a protein in a sample, said process comprising the binding of said abnormal form protein according to any preceding claim followed by determining
- 10 the existence or amount of binding of the protein to the binding agent.
31. A process as claimed in Claim 30, wherein said binding is qualitatively or quantitatively determined by
- 15 conducting an immunoassay for the aggregating form of the protein.
32. A process as claimed in claim 30 or claim 31, wherein the binding of the abnormal aggregating form of the
- 20 protein is conducted selectively in the presence of the normal non-aggregating form of the protein and bound aggregated form protein is then separated from non-bound normal form protein and thereafter said determination of the existence or amount of said binding is determined.
- 25
33. A process as claimed in any preceding claim, wherein said abnormal form of a protein is PrP^{Sc} and said normal form is PrP^C.

34. A process for separating PrP^{Sc} from PrP^C comprising selectively binding PrP^{Sc} to a binding agent in the presence of an amino acid amide of a fatty acid.
- 5 35. A process as claimed in claim 34, wherein the binding agent is a polyionic material.
36. A process as claimed in claim 34 or claim 35, wherein the amino acid amide of a fatty acid is N-lauroylsacrosine.
10
37. A process as claimed in any one of claims 34 to 36, conducted at a pH of from 8 to 9.
- 15 38. A binding agent which is a polyanionic polyglycoside, hexadimethrine, or a polycationic binding agent conjugated to a bindable tag moiety, whereby the binding agent can be immobilised to a solid medium by the binding of said bindable tag moiety to a capture agent
20 on said solid medium.
39. A selective binding agent as claimed in Claim 38, wherein the binding agent is a polysulphonated polyglycoside.
25
40. A selective binding agent as claimed in Claim 38, wherein the binding agent is a polyanionic pentosan derivative or dextran derivative.

85

41. A selective binding agent as claimed in claim 38, wherein the binding agent is a polycationic material selected from hexadimethrine bromide, PAMAM dendrimer, poly L-lysine, pDADMAC or polyethyleneimine.

W 03/073 06

PCT/G80/0028

86

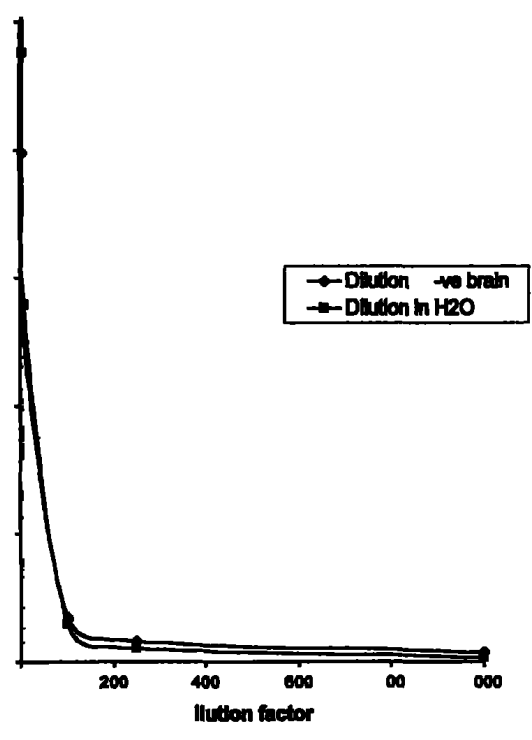


Fig 1

BSTTUTE OH (RULE 20)

ENLACE DE FORMAS PATOLOGICAS DE PROTEINAS DE PRION**Descripción de la Invención**

La presente invención se refiere al uso de agentes de
5 enlace resistentes a la proteasa, típicamente, a materiales
poli-iónicos tales como materiales polianiónicos, que
incluyen polisulfato de pèntosan, sulfato de dextrano u otros
poliglicósidos polianiónicos o materiales policatiónicos que
incluyen polibreno, dendrímeros de poliamidoamina o
10 poli(cloruro de dialildimetilamonio), opcionalmente bajo
condiciones selectivas para capturar la forma autorreactiva o
patológica de la proteína prión PrP^C y proteínas que se
agregan similarmente a las formas anormales de proteínas que
no se agregan en su forma normal.

15 Las enfermedades del prión, también referidas como
encefalopatías espongiformes transmisibles o TSE, se han
reconocido recientemente. La encefalopatía espongiforme bovina
(BSE) se reportó por primera vez en 1985. Los primeros casos
de la enfermedad de Jacob Creutzfeldt (vCJD) se reportaron en
20 1996. Se cree que la vCJD es una enfermedad neurodegenerativa
fatal en los humanos provocada por el consumo de carne
contaminada con BSE. El tiempo de incubación a partir de la
infección hasta los síntomas clínicos en el humano, puede ser
de varios años.

25 El único componente identificado del prión, el agente

REF: 158154

que provoca las enfermedades del prión, es PrP^{sc} , una isoforma anormal de PrP^{c} (PrP^{sc} se refiere también como PrP^{res} y PrP^{c} se refiere también como PrP^{sen}). El PrP^{sc} se ha considerado previamente porque se distingue del PrP^{sc} debido a que es
5 relativamente resistente a la proteasa. Sin embargo, se ha publicado recientemente que existe una forma susceptible a la proteasa de PrP^{sc} , es decir, existe una forma infecciosa de PrP que es susceptible a la proteasa.

Puede ser que la PrP^{sc} susceptible a la proteasa pero
10 infecciosa sea capaz de agregar (es decir, se agrega en la naturaleza) pero que todavía no se agrega o al menos se agrega sólo parcialmente.

Ambas formas susceptibles a la proteasa e insensibles a la proteasa de PrP^{sc} y porciones centrales de PrP^{sc} surgen
15 después de la digestión de la proteasa parcial (referida frecuentemente en el arte como PrP^{27-30}) referidas en la presente como PrP^{sc} excepto cuando el contexto indica que significa uno específico de estos. También, el término "proteínas de agregación" se usa para incluir tanto PrP^{sc}
20 resistentes a la proteasa agregada y formas similares de otras proteínas, así como a las formas parcialmente agregadas o no agregadas infecciosas de PrP^{sc} u otras proteínas que pueden incluir el PrP^{sc} infeccioso susceptible a la proteasa observado recientemente.

25 El PrP^{c} es una glicoproteína anclada al GPI con una

función desconocida. A pesar de que otros marcadores de enfermedades del prión se han sugerido, el PrP^{sc} permanece no solo en el componente prión obligatorio, sino también el marcador aceptado universalmente y confiable sólo para esta familia de enfermedades.

La metodología favorecida actualmente para el ensayo en presencia de PrP^{sc} es someter una muestra a la proteólisis con la proteinasa K durante un periodo suficiente para destruir el PrP^c y determinar entonces, la presencia de PrP^{sc} que sobrevive a un inmunoensayo usando un anticuerpo que no es selectivo para PrP^{sc} en presencia de PrP^{sc} (Serban et al., Neurology, Vol. 40, No. 1, Ene 1990). El uso de la proteasa excluye naturalmente la presencia de un anticuerpo como un agente de captura o como un agente de detección durante la etapa de la proteólisis. La proteasa debe eliminarse o desactivarse antes de que el anticuerpo pueda introducirse. Sería deseable evitar esta limitación en el procedimiento.

El ensayo depende de la eliminación completa de PrP^c para evitar positivos falsos y en las condiciones que tampoco son como para degradar el PrP^{sc} para evitar negativos falsos. Tales condiciones de proteólisis selectiva necesitan ser desarrolladas para cada tipo de muestra que va a ser ensayada. Se limita la sensibilidad del ensayo resultante. Por ejemplo, en ensayos del tejido de cerebro bovino, la sensibilidad puede sólo ser tal que se obtenga un resultado

positivo confiable aproximadamente en el tiempo en el que el animal habría mostrado probablemente síntomas clínicamente observables de BSE. Así, el ensayo tiene un límite de sensibilidad en la región de 1 µg/ml, que corresponde a 10⁴-
5 10⁵ unidades de infección de prión.

Existe la necesidad de pruebas de diagnósticos específicos y más sensibles para las enfermedades de prión. En particular, se requiere una prueba antes de morir usando muestras de sangre u otros tipos de muestras de sangre para
10 evaluar el estado de la enfermedad de un animal en particular. En la ausencia de tal, una vez que se identifica un animal afectado dentro de un rebaño, se requiere de un método de sacrificio extensivo de ganado vacuno. Es vital nuevamente, que se desarrolle una prueba diagnóstica para
15 seleccionar a la población humana y para proteger a los individuos de la infección potencial de sangre donada, procedimientos quirúrgicos, órganos y transplantes de tejido.

Ambas US5977324 y US6221614 describen los métodos de enlace de PrP^{sc} usando ácido fosfotungstico (PTA). El PTA es
20 una proteína no específica precipitante que también se enlazará a, y precipitará a un amplio rango de proteínas distintas de PrP^{sc}. La concentración de proteínas en la muestra también afectará grandemente la recuperación usando PTA.

25 Se ha informado que el plasminógeno enlaza PrP^{sc}

selectivamente con respecto a PrP^c y se propuso usar en ensayos diagnósticos (Fischer et al., Nature, 2000, Nov 23, 408 (6811): 479-83). Sin embargo, este método no ha demostrado ser lo suficientemente útil en la práctica. El
5 plasminógeno también se identifica en una descripción relacionada, la US 2002/0004586 es un factor que se enlaza selectivamente al PrP^{sc}.

De conformidad con la US 6419916 y las descripciones relacionadas, el compuesto de poliamina Superfect[™] (una
10 mezcla de poliamina ramificada producida mediante la degradación inducida por calor de un dendrímero PAMAM) y otras poliaminas ramificadas similares son capaces de eliminar el PrP^{sc} de células in vitro. El mecanismo es incierto. Se especula que tales compuestos pueden enlazarse
15 directamente al PrP^{sc} colocados como un amiloide con porciones cargadas negativamente expuestas e inducir un cambio conformacional bajo condiciones ácidas. Se dice que el efecto no puede involucrar simplemente el enlace de PrP^{sc} e inhibir la síntesis de PrP^{sc} debido a que el PrP^{sc} existente se
20 elimina. Se encuentra que la poliamina elabora PrP^{sc} sensible a la proteasa proporciona un pH que está por debajo de 4. Se deduce que las poliaminas actúan en un compartimiento celular ácido en los experimentos de depuración de PrP^{sc} in vitro.

Parecería a partir de este trabajo, que sería
25 especulativo el concluir que tales poliaminas enlazan PrP^{sc}.

Se promueven un número de otras posibilidades. No se promueve o sugiere alguna selectividad para enlazar PrP^{Sc} en PrP^C. Además, no puede deducirse que cualquier enlace que se presente sea más que transitorio, que sólo sirve para alterar
5 la conformación de PrP^{Sc} de manera que se permita atacar a la proteasa. También, la acción de las poliaminas se presenta para requerir un pH bajo. De hecho, las propias investigaciones demuestran que tales poliaminas de dendrímeros no enlazan PrP^{Sc} en tal pH bajo.

10 El polisulfato de pentosan (poli-b-xilosa-2,3-disulfonato, PPS) es uno de un rango de poliglicósidos polisulfonados grandes (PGs) (PM 8,000-12,000). Elaborado a partir del haya, es un compuesto económico que ha sido usado durante muchos años como un anticoagulante similar la
15 heparina, también un PG. Los PG incluyen PPS y otros polianiones que son conocidos por enlazar PrP^C y PrP recombinante (recPrP), ver por ejemplo, Brimacombe DB et al, Biochem J, 1999 Sep 15; 342 pt 3, 605-13. El PPS ha sido
20 propuesto como un agente terapéutico para prevenir o tratar enfermedades de TSE. Sin embargo, no se ha demostrado eliminar el PrP^{Sc} existente in vivo o in vitro.

En la fabricación, el aserrín de la haya se extrae para producir el polímero de azúcar soluble de xilosa (un azúcar de anillo de cinco miembros) llamado pentosan. Este p límero
25 se somete entonces a una reacción de sulfatación usando una

mezcla de ácido clorosulfónico y piridina, que resulta en 3 de 4 de todos los hidroxilos de anillo del azúcar, que tiene un éster de sulfato agregado a ellos. El contenido de sulfatos totales es entonces de 50-55% en peso que es mayor
5 al de la heparina, el cual es de aproximadamente de 30-35%. La otra molécula similar que se acerca a este grado de sulfatación es el sulfato de dextrano (40-45%). El pentosan tiene un peso molecular bajo de 3.5 a 7.0 K.

No se ha reportado ninguna selectividad para enlazar
10 polianiones o policationes de PrP^{sc} con respecto al enlace de PrP^{c} . Sorprendentemente, se han establecido condiciones bajo las cuales los materiales poli-iónicos enlazan proteínas alteradas agregadas del tipo PrP^{sc} , además se han establecido condiciones bajo las cuales tales polianiones enlazan estas
15 formas anormales pero que no enlazan sus formas normales no agregadas del tipo PrP^{c} , el enlace es suficientemente fuerte y se realiza bajo condiciones preferidas lo suficientemente selectivas para ser útiles en ensayos en presencia de una proteína alterada agregada (por ejemplo, PrP^{sc}).

20 Por lo tanto, es necesario proporcionar en un primer aspecto de la invención, un proceso para enlazar selectivamente una forma anormal de agregación de una proteína, en presencia de la forma normal de no agregación de la proteína, que comprende ponerse en contacto bajo
25 condiciones de enlace selectivas, un material que se pone en

contacto con ambas formas, normales y anormales con un material poli-iónico, que tiene una avidez de enlace para dicha forma de agregación de la proteína como se presenta en la muestra. Las condiciones de enlace pueden incluir la presencia de un agente de competencia en solución, en las cuales el agente de competencia tiene una avidez de enlace menor para la forma anormal de la proteína que hace el material poli-iónico.

El material poli-iónico puede estar en solución o puede proporcionar una superficie que presenta grupos de superficie iónica. En el último caso, la superficie puede ser de un polímero que tenga dichos grupos iónicos enlazados covalentemente dentro de la estructura del polímero o producirse mediante la modificación de los grupos de superficie del polímero. Un ejemplo de un polímer polianiónico adecuado es Nafion, un polímero de hidrocarburos sulfonado perfluorado disponible en forma de cuentas como hojas. Pueden usarse también polímeros policationicos.

Alternativamente, la superficie es de un sustrato que está cubierto o enlazado a una sustancia que presenta dichos grupos iónicos. Un ejemplo de un polímero adecuado que tiene tales grupos de superficie es una superficie plástica no cargada, activada con anhídrido maléico y derivada con TRIS para producir una superficie de grupos carboxilo o con un material policationico. Los policationes o polianiones pueden

cubrirse en cambio pasivamente en polímeros tales como poliestireno.

En el caso de un material polianiónico, ya sea que se usen en soluciones o revestidos en una superficie sólida, el
5 material polianiónico puede ser preferiblemente un poliglicósido polianiónico.

Generalmente, el agente de competencia tiene una densidad menor de grupos iónicos que el material poli-iónico. Sin limitarse a la teoría, es probable que los resultados
10 descritos en detalle aquí se deba a las formas anormales de agregación de la proteína, que tienen más sitios de enlace para la interacción con los grupos iónicos que la forma normal de no agregación de la misma proteína. Un agente de competencia que tiene uno o unos pocos grupos iónicos es
15 capaz de interactuar con una cierta avidez ya sea con las formas de agregación o de no agregación de la proteína, pero un material poli-iónico es capaz de enlazar la forma agregada de la proteína simultáneamente a través de muchos grupos iónicos, llevando a que tengan una avidez más alta para la
20 agregación que para la forma de no agregación.

Los resultados experimentales con cerebros bovinos infectados indican que tanto los polianiones inmovilizados (tal como sulfato de dextrano) y policationes (tales como polietilenimina) permiten capturar la forma anormal de la
25 proteína de prión PrP^{Sc} en homogeneizados del cerebro. La

señal obtenida usando un conjugado de proteína de anticuerpo/enzima de anti prión es aproximadamente de 3 a 5 veces más para la mejor superficie de captura policationica que para la mejor superficie de captura polianiónica.

5 En ambos casos, el detergente Sarkosyl (N-lauroil-sarcosina) puede actuar como un agente de competencia útil para mejorar la especificidad de captura de la proteína anormal y evitar una señal de la proteína de prión normal cuando usa un anticuerpo anti-prión no específico. También,
10 al digerir parcialmente la muestra con tripsina, se incrementa sustancialmente la señal de PrP^{sc} cuando se usan tanto compuestos policationicos como polianiónicos, pero no se tienen efectos específicos (que indiquen que baj las condiciones empleadas, la tripsina elimina un inhibidor de
15 poliones que enlaza PrP^{sc} , más bien, que digieren preferencialmente PrP^{c} , como se ha observado en la proteinasa K).

Se informa en la literatura científica que el PrP^{sc} se asocia nativamente con los polianiones tales como los
20 heparanos. Es probable que estos polímeros cargados negativamente interactúen con una región cargada positivamente de la estructura PrP^{sc} y que podría haber múltiples interacciones con las proteínas agregadas.

Se propone que un polianión tal como el sulfato de
25 dextrano o polisulfato de pentosan sea capaz de enlazar a la

estructura PrP^{Sc} con una avidez mucho más alta que los heparanos nativos y puedan desplazar los compuestos endógenos. Así, los polímeros con carga altamente negativa inmovilizados en una superficie, puedan capturar
5 específicamente la proteína de prión anormal. La proteína prión normal es de no agregación y no tiene tal interacción de afinidad alta con los heparanos endógenos o con los polianiones tales como el sulfato de dextrano. Bajo condiciones de ensayo elegidas en presencia de aniones de
10 afinidad reducida tales como el detergente Sarkosyl mejora la especificidad de captura todavía más allá de competir con el polianión inmovilizado para los sitios de interacción de PrP^{Sc} de afinidad reducida.

En contraste, se sugiere que un polianión no pueda
15 desplazar a los heparanos endógenos de la estructura PrP^{Sc} . Se sugiere que debe en cambio formar complejos directamente con el heparano/agregado PrP^{Sc} agregado, formando una interacción iónica con las cargas negativas libres en el heparano. Así, en esta configuración el complejo de heparano/ PrP^{Sc} intacto
20 nativo se enlaza firmemente al polianión inmovilizado aunque en el caso de un polianión inmovilizado, se captura en lugar de la estructura PrP^{Sc} "desplazada" no nativa. Esto proporciona una explicación del porque la señal más alta se obtiene con las mejores superficies de captura catiónicas, en
25 las que la competencia mediante polianiones para los

heparanos endógenos no puede ser 100% eficiente y no todos los agregados PrP^{sc} se enlazan mediante los polímeros cargados negativamente.

Los agentes de captura aniónicos pueden preferirse
5 cuando la proteína de agregación no se espera que sea enlazada nativamente mediante el heparano nativo, por ejemplo, cuando la muestra es sangre o un suero o similares más que un tejido.

Además de las interacciones iónicas propuestas, pueden
10 haber enlaces hidrofóbicos adicionales entre otras regiones del agregado de PrP^{sc} y los polímeros empleados. Estos fortalecerán además las interacciones de enlace.

"Avidez" se usa en la presente como un significado usual de la resistencia de enlace completo de una molécula con
15 muchos sitios de enlace, con un agente de enlace multivalente y en contraste con "afinidad" es la resistencia de enlace entre cada sitio de enlace individual, de la molécula y del agente de enlace.

El agente de competencia si se usa, es preferiblemente
20 una amida de aminoácido de un ácido graso, tal como n-lauroilsarcosina. Tales materiales tienen propiedades detergentes, pero en este contexto puede estar actuando bien simplemente como un agente de enlace monovalente vía su grupo COO^- terminal o como agentes parcialmente polivalentes a
25 través de la formación de micelos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un proceso para el enlace selectivo de una forma anormal agregada de una proteína en presencia de la forma normal no agregada de la proteína, que comprende poner en
5 contacto un material que contiene dichas formas anormales y normales con un poliglicósido polianiónico bajo condiciones tales como proporcionar un enlace selectivo de dicha forma anormal.

En las modalidades preferidas de cada aspecto de la
10 invención, dicha forma anormal de una proteína es PrP^{sc} y dicha forma normal es PrP^c. Sin embargo, la invención en todas estas formas es ampliamente aplicable para enlazar selectivamente formas de agregación anormales de proteínas.

Los agentes de enlace selectivos policationicos que
15 pueden usarse incluyen polietileneiminas, poliaminas que incluyen polilisininas, poliamidaminas, por ejemplo, dendrímeros PAMAM, aminas policuaternarias tales como poli(cloruro de dialildimetilamonio) y polimetobromuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileño (también conocido como
20 bromuro de hexadimetrina o Polibreno).

El poliglicósido polianiónico preferido es un poliglicósido polisulfonado. Sin embargo, pueden usarse también o en cambio otros sitios aniónicos tales como grupos ácidos carboxílicos o grupos fosfato.

25 Preferiblemente, el poliglucósido polisulfonado es

polisulfato de pentosan (PPS) o sulfato de dextrano.

Otros derivados de dextrano o pentosan polianiónicos pueden usarse como el poliglicósido polianiónico.

Se prefiere un nivel elevado de sulfonación (u otro
5 grupos aniónico).

Los niveles de sulfonación de las carrageninas, dextranos y pentosan son elevados. Si una proporción baja de los sitios de sulfonación potencial se toma actualmente por los grupos sulfato, entonces puede encontrarse que l s
10 compuestos no interactúan con los sitios de enlace en el Prp^{sc} selectivamente.

Los agentes de enlace selectivos aniónicos pueden incluir:

Polisulfato de pentosan (PM 3500-5000), sulfato de
15 dextrano 500 (PM 500,000), Iota-carragenina, Lambda-carragenina y carrageninas, por ejemplo, Kappa-carragenina, heparinas y heparanos, sulfato de dextrano 8 (PM 8,000), poliglicósidos sulfonados tales como fucoidan, sulfato de queratina, polisulfato de ácido hialurónico, ácido colomínico
20 (ácido polisiálico bacterial), tipos de carragenina iii y iv, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, furcellarano, polisacáridos disponibles comercialmente, por ejemplo, polisorbato, sizofirano, goma xantana, almidón, compuesto de celulosa, pectina, mucina gástrica, ceratonia, agares, goma
25 de acacia, glicósido sulfatado 1, glicósido sulfatado 2, N-

acetil-D-glucosaminas o ácido L-idurónico de sulfato de Dermatan.

El material poli-iónico puede ser uno seleccionado por tener la capacidad bajo condiciones no selectivas para
5 enlazar tanto las formas autorreactivas o alteradas de agregación de una proteína, y también la forma normal de no agregación de la proteína así como la habilidad para enlazar la forma de agregación selectivamente bajo condiciones apropiadas.

10 La selectividad deseada se obtiene mediante el ajuste adecuado de las condiciones de la reacción, particularmente la presencia y concentración del agente de competencia, el pH y la detergencia. Por lo tanto, el pH se selecciona preferiblemente para proporcionar dicho enlace selectivo.

15 El pH es preferiblemente de 5.6 a 9, por ejemplo, de 7 a 9, más preferiblemente de 8 a 9, por ejemplo, de 8.2 a 8.6, especialmente 8.4, particularmente cuando se usan los detergentes descritos abajo. Las soluciones amortiguadoras incluyen soluciones amortiguadoras de fosfato y soluciones
20 amortiguadoras Tris.

La concentración de la sal es preferiblemente no mayor que 250 mM y preferiblemente menos significativa, por ejemplo, no arriba de 100 mM.

Preferiblemente, está presente un detergente que
25 promueve dicho enlace selectivo ya sea en virtud de su

detergencia o mediante su comportamiento como un agente de competencia.

Se prefiere particularmente para este propósito, detergentes que son una amida de aminoácido derivada de un ácido graso, por ejemplo, n-laurilsarcosina u otras sarcosinas de ácidos grasos. Se prefiere especialmente la presencia de tal agente detergente/competencia cuando el agente selectivo es polianiónico.

Preferiblemente, la concentración de este detergente es al menos de 0.5% en peso, más preferiblemente al menos de 0.1%, preferiblemente al menos de 0.2%, por ejemplo, de 0.2 a 2%, más preferiblemente de 0.5 a 1.5% pero pueden usarse cantidades más grandes.

Pueden usarse otros detergentes que tienen un efecto similar, que incluyen CHAPS, Octil- β -glicósido, Tween 20, Triton X-100 y Nonidet P-40. Sin embargo, es indeseable el uso de concentraciones altas de dodecilsulfato de sodio (SDS). Las combinaciones de sarcosina de n-lauroil (o similar) con otros detergentes son adecuadas, preferiblemente que contengan de 0.5 a 2%, por ejemplo, de aproximadamente 1% de detergente de sarcosina, por ejemplo, con 0.5 a 2%, por ejemplo, de aproximadamente 1% de uno de los detergentes listados arriba, particularmente Triton X-100 o Nonidet P-40.

Se ha encontrado que la presencia de tripsina, quimotripsina, proteinasa K u otra proteasa puede ser útil

para evitar la inhibición mediante materiales desconocidos del enlace de la proteína de agregación a ambos agentes de enlace selectivos policationicos o polianiónicos. Este es especialmente el caso en donde la muestra contiene un nivel
5 relativamente alto de otras proteínas tales como en el caso en el que una muestra de cerebro negativa PrP^{sc} se diluye con un material de cerebro del PrP^{sc} negativo. La prevención de la inhibición de matriz adicional puede obtenerse incluyendo otras enzimas de una naturaleza degradante que incluyen Dnasa
10 y colagenasa.

El agente de enlace selectivo después de enlazarse a dicha forma anormal de agregación de la proteína puede capturarse con un agente de captura inmovilizado y puede determinarse la presencia o cantidad de un complejo formado
15 entre dicho agente de enlace selectivo y dicho agente de captura.

Dicho agente de captura puede ser una lectina (cuando el agente de enlace es adecuado, por ejemplo, es un poliglicósido), o un anticuerpo reactivo con dicho agente de
20 enlace selectivo. Dicho agente de enlace selectivo puede proporcionarse con una porción de etiqueta enlazada selectivamente y dicho agente de captura puede entonces enlazarse a dicha porción de etiqueta.

Opcionalmente y alternativamente, el agente de enlace
25 selectivo se inmoviliza a un medio sólido previo a la

exposición de dicha muestra. El agente de enlace selectivo puede ser proporcionado con una porción de etiqueta enlazable y puede ser inmovilizado al medio sólido vía la etiqueta.

Cuando se presenta una porción de etiqueta enlazable puede ser por ejemplo, biotina, fluorescina, dinitrofenol, digoxigenina o (His)6.

El agente de enlace selectivo puede ser inmovilizado directamente a un sólido más bien a través de una etiqueta enlazable. Por ejemplo, la PG puede acoplarse directamente mediante un acoplamiento covalente a través de grupos hidroxilo restantes del PG usando fases sólidas derivadas mediante por ejemplo, grupos epoxi o vinil sulfona.

En cada aspecto de la invención, ya sea que el enlace de la proteína anormal tenga lugar antes o después de la inmovilización o captura del agente de enlace selectivo, los complejos de proteína anormal/agente de enlace selectivo inmovilizados se someten preferiblemente a una etapa de lavado para eliminar la proteína normal para mejorar la selectividad. La etapa de lavado se conduce preferiblemente usando una solución que contiene el agente de competencia, que puede ser una solución de detergente, que comprende preferiblemente de nuevo un detergente ya sea en virtud de su detergencia o que por otra parte promueve un enlace selectivo. Se prefiere una amino amida derivada de un ácido graso, por ejemplo, sarcosina n-lauroilo u otra sarcosina de

ácido graso. Preferiblemente, la concentración del detergente de sarcosina en la etapa del lavado es al menos de 0.5% preferiblemente al menos de 0.1%, más preferiblemente al menos de 0.2%, por ejemplo, de 0.2 a 2%, preferiblemente de 5 0.5 a 1.5%. Otros detergentes pueden estar presentes y el lavado se amortigua preferiblemente a un pH en el rango de 5.6 a 8.4.

El enlace de PrP^{sc} (u otra proteína anormal) puede ser cualitativamente o cuantitativamente determinado mediante la 10 conducción de un inmunoensayo de PrP^{sc}. (u otra proteína de agregación) después de la separación de enlaces de PrP^{sc} a partir de un no enlace de PrP^{sc} (u otra proteína en forma normal).

También, una vez que la forma de agregación de la 15 proteína ha sido unida selectivamente y opcionalmente después la forma normal ha sido eliminada, el material polianiónico adicional, por ejemplo, poliglicósido aniónico (etiquetado adecuadamente con una etiqueta o etiqueta detectable) puede unirse ya a la proteína de agregación de unión para formar un 20 intercalado (por ejemplo, una etiqueta de poliglicósidos de proteína agregada con poliglicósidos) que pueden entonces ser cuantificados o detectados. Las condiciones selectivas pueden no ser necesarias cuando se lleve a cabo la segunda parte de la formación del intercalado.

25 Como se mencionó arriba, el agente de enlace selectivo

puede ser inmovilizado a un material sólido ya sea antes o después de estar en contacto con la proteína alterada. La separación de la muestra del material sólido puede entonces usarse para eliminar la forma de proteína del ensayo que deja
5 solamente la forma alterada para una determinación adicional.

En este contexto, los materiales de soporte sólidos incluyen no solo materiales manipulables o macroscópicos tales como placas de microtitulación, dispositivos de flujo laminar y tiras reactivas, sino también microperlas y
10 microperlas supermagnéticas, que pueden separarse mediante filtración o mediante captura magnética. La biotina u otras etiquetas pueden conjugarse a un sulfato de dextrano o PPS y materiales semejantes mediante métodos químicos estándar. Aproximadamente uno en diez de los residuos de la columna de
15 azúcar en PPS es un éster de metilo de ácido urónico y proporciona una forma de acoplamiento vía sus residuos carboxilo. Otras formas conocidas de acoplamiento son hidroxilo (uno en cuatro se encuentra aún libre después de la reacción de sulfatación), o al final de la reducción del
20 azúcar. La biotina es una porción de etiqueta enlazable conveniente empleada para enlazar el material polianiónico u otro agente de enlace selectivo a un material sólido derivado con avidina o un material con propiedades para enlazar avidina tales como estreptavidina, neutravidina, o
25 captavidina.

107

Otras moléculas adecuadas para usarse como porciones de etiqueta enlazables incluirán todas aquellas que ya están conjugadas al material poli-iónico y que se prestan para capturar un agente de captura adecuado. Por ejemplo, una
5 molécula tal como fluoresceína puede conjugarse a PPS o moléculas similares haciendo reaccionar un derivado de fluoresceína con las cadenas laterales y urónicas del polisulfato de pentosan en presencia de carbodiimida EDC(1-
etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida) y puede
10 capturarse mediante un anticuerpo adecuado disponible fácilmente, que se puede inmovilizar al material sólido. Otras etiquetas adecuadas para capturar el anticuerpo en esta forma incluyen dinitrofenol DNP, digoxigenina, ácido nucleico o secuencias análogas de ácido nucleico y (His) 6. Pueden
15 usarse otros agentes de enlace en lugar de los anticuerpos, por ejemplo, secuencias análogas a los ácidos nucleicos o ácidos nucleicos complementarios.

Sin embargo, puede usarse alternativamente un agente de captura que se enlace selectivamente al material poli-iónico
20 en lugar de que lo haga a través de una porción de etiqueta. Por ejemplo, los poliglicósidos pueden unirse mediante una lectina adecuada o mediante un anticuerpo adecuado. Los anticuerpos para enlazar PPS se describen por ejemplo en Kongtawelert et al., J. Immunol. Methods 1990, Enero 24;
25 126(1); 30-49. Las técnicas estándar para inmovilizar tales

anticuerpos son bien conocidas en el arte.

Cualquier método conocido o inventado en el futuro para determinar la presencia o cantidad de proteínas alteradas de agregación o agregadas tales como PrP^{Sc} (sin necesidad de
5 seleccionar o excluir la forma normal tal como PrP^{Sc}) puede usarse para determinar la presencia o cantidad de la forma de agregación una vez que se han unido selectivamente al agente de enlace selectivo y la proteína en forma normal no unida ha sido separada de allí, adecuadamente mediante la
10 inmovilización del enlace y lavado fuera del no enlace residual. Tales métodos incluyen el método conocido ELISA, RIA, IRMA y otras formas de inmunoensayo, por ejemplo el método incluye el kit de detección BSE Platelia™ Bio-Rad descrito en Serban et al.

15 Dependiendo de la forma del ensayo usado, puede desearse o requerirse fluir la proteína en forma anormal capturada a partir del agente de enlace selectivo previo al ensayo. Al llevar a cabo tal etapa de elución, puede ser deseable que la presencia de un caotropo tal como tiocianato de guanidina
20 tenga una concentración de al menos 1M, preferiblemente de 2 a 6 M, por ejemplo, de 4 a 6 M. Pueden usarse caotropos alternativos que incluyan urea.

Adicionalmente o alternativamente, puede usarse un agente de competencia que tenga una avidéz aún más alta para
25 desplazar la proteína del agente de enlace selectivo. El

sulfato dodecilo de sodio (SDS) es adecuado para esto y se usa preferiblemente una concentración de 0.5 a 1% en peso, preferiblemente arriba de 0.75%.

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

Sin el deseo de apegarse a la siguiente teoría, se piensa que el PPS y las moléculas similares funcionan en la invención mediante pares de enlace de grupos sulfato negativos a pares de aminoácidos positivos (Lys y Arg) en las proteínas relevantes o vía los sitios de enlace de metal de polihistidina de las proteínas. El enlace a las formas agregadas puede ser más fuerte debido al número incrementado de sitios de enlace presentados por la proteína de agregación. Los detergentes aniónicos adecuados pueden competir más efectivamente para enlazarse con la forma de no agregación para aumentar la selectividad. Convenientemente, la selectividad obtenida es tal que la afección para enlazarse a la proteína de agregación es al menos tres veces que la forma normal, preferiblemente al menos de 10:1.

En un aspecto adicional, la invención incluye un proceso para separar PrP^{sc} de PrP^c que comprende enlazar PrP^{sc} selectivamente a un agente de enlace en presencia de una amida de aminoácido de un ácido graso. Las condiciones

10

preferidas para tal enlace se establecen en detalle arriba y la proteína de unión puede ser ensayada como se describe.

La invención se describirá e ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos haciendo referencia a los
5 dibujos acompañantes en los cuales:

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

Ejemplo 1: Separación de prión normal a partir de proteína de prión autorreactiva usando polisulfato de pentosan biotinilado y una captura de afinidad subsiguiente.
10

Introducción

La biotina se conjugó al polisulfato de pentosan usando métodos químicos estándar. El polisulfato de pentosan biotinilado se permitió enlazar a la proteína de prión
15 autorreactiva en homogenatos del cerebro y después de enlazar los complejos de polisulfato/prión de pentosan se capturaron usando cuentas supermagnéticas derivadas de estreptavidina. El prión autorreactivo capturado se eluyó posteriormente a partir de las cuentas y se detectaron usando el kit de
20 detección BSE Platelia™ Bio-Rad inmuno basado; el último kit es incapaz de diferenciar la proteína de prión autorreactiva y normal y proporcionará una señal con ambas proteínas. Un banco de dos BSE infectados y dos cerebros bovinos no infectados se investigó y se usó para demostrar que el
25 polisulfato de pentosan bajo las condiciones específicas

descritas podría usarse para capturar específicamente la proteína de prión autorreactiva de los homogeneizados del cerebro.

Método

5 Preparación de las perlas superparamagnéticas

1. Justo antes de usarse, 400 µl de perlas superparamagnéticas de estreptavidina (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) se lavaron mediante la captura magnética en tres volúmenes de 1 ml consecutivo de TBST (50 mM Tris, 150
10 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% (v/v) Tween 20 [Sigma-Aldrich Company Ltd., p-7949]).

2. Las perlas se suspenden nuevamente en 400 µl de TBST.

3. Se preparan alícuotas de 100 µl en cuatro tubos y el líquido eliminado. Las perlas estuvieron entonces listas para
15 usarse.

Preparación de los homogeneizados del cerebro.

1. Se añaden 300-500 mg de cada tejido del cerebro a los tubos de molienda que contienen perlas de molienda suministradas en el kit de detección de purificación
20 BSE (Bio-Rad). El líquido suministrado originalmente en estos tubos en el kit se aspiró y se descartó previo al uso.

2. Un volumen de NaCl de 150 mM se calculó para generar un homogeneizado de cerebro (p/v) al 50% después de
25 la homogenización se añadió a cada tubo.

112

3. Los tubos se homogeneizaron durante 45 segundos con velocidades establecidas de 6.5 en un ribolizador (adquirido por Rio-Rad).

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

5 5. Los volúmenes de 50 µl de cada homogeneizado se colocaron en tubos por separado.

Captura específica de la proteína de prión autorreactiva

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

7. 50 µl de polisulfato de pentosan biotinilado (10 µg/ml) en agua estéril destilada) se añadieron entonces a cada tubo, se mezclaron y se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 minutos.

15 8. Cada reacción se añadió entonces a un tubo de perlas superparamagnéticas de estreptavidina lavadas y se incubaron a la temperatura ambiente durante 30 minutos.

20 9. Las perlas se lavaron entonces mediante la captura magnética en tres volúmenes de 1 ml de TBST.

Elución de la proteína de prión autorreactiva y la inmunodetección.

25 1. Finalmente, después del último lavado, las perlas de cada reacción se suspendieron nuevamente en 10 µl de

polisulfato de pentosan (PPS) o sulfato de dextrano.

Otros derivados de dextrano o pentosan polianiónicos pueden usarse como el poliglicósido polianiónico.

Se prefiere un nivel elevado de sulfonación (u otro
5 grupos aniónico).

Los niveles de sulfonación de las carrageninas, dextranos y pentosan son elevados. Si una proporción baja de los sitios de sulfonación potencial se toma actualmente por los grupos sulfato, entonces puede encontrarse que los
10 compuestos no interactúan con los sitios de enlace en el PrP^{sc} selectivamente.

Los agentes de enlace selectivos aniónicos pueden incluir:

Polisulfato de pentosan (PM 3500-5000), sulfato de
15 dextrano 500 (PM 500,000), Iota-carragenina, Lambda-carragenina y carrageninas, por ejemplo, Kappa-carragenina, heparinas y heparanos, sulfato de dextrano 8 (PM 8,000), poliglicósidos sulfonados tales como fucoidan, sulfato de queratina, polisulfato de ácido hialurónico, ácido colomínico
20 (ácido polisiálico bacterial), tipos de carragenina iii y iv, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, furcelarano, polisacáridos disponibles comercialmente, por ejemplo, polisorbato, sizofirano, goma xantana, almidón, compuesto de celulosa, pectina, mucina gástrica, ceratonia, agares, goma
25 de acacia, glicósido sulfatado 1, glicósido sulfatado 2, N-

114

5

<u>Homogeneizado de</u> <u>cerebro usado</u>	<u>OD₄₅₀</u>
Muestra 1 del cerebro bovino infectado con BSE	0.229
cerebro bovino infectado con BSE	0.208

Muestra de cerebro 2

Cerebro de bovino normal 0.061

10 Muestra 1

Cerebro de bovino normal 0.047

Muestra 2

La señal de los dos homogeneizados de cerebro infectados con BSE que contiene el prión autoreactivo es
15 significativamente superior que en los homogeneizados de cerebro normal no infectados.

Discusión

El kit de detección Bio-Rad Plantelia™ BSE no se puede diferenciar entre la proteína de prión normal o
20 autorreactiva. Normalmente la especificidad para la proteína de prión autorreactiva se logra la digestión previa de la muestra con la proteína saca que retira la proteasa susceptible de la proteína de prión normal. Cualquier
25 proteína de prión autorreactiva en la muestra es más resistente a la digestión de la proteasa y permanece y que

detecta posteriormente por el ensayo Platelia™. En este experimento hemos demostrado un método alternativo para la digestión de proteasas de la muestra. Hemos usados condiciones definidas bajo las cuales el polisulfato de pentosan biotinilado en solución, se puede enlazar específicamente a la proteína de prión autorreactiva en la muestra. El complejo de polisulfato de pentosan/prión autorreactivo luego se pueden capturar usando perlas superparamagnéticas de estreptavidina. Después de lavar la proteína de prión autorreactiva se puede eluir posteriormente y detectarse en el inmunoensayo. La proteína de prión normal no se captura por este protocolo y se lava completamente y por lo tanto no se detecta en el inmunoensayo. Se ha demostrado que por el uso de esta técnica se puede detectar correctamente la proteína de prión autorreactiva en los cerebros de bovino infectados con BSE, y no se observa señal en los cerebros de bovino normal.

Ejemplo 2: Separación del prión normal de la proteína de prión autorreactiva usando polisulfato de pentosan biotinilado inmovilizado.

Introducción

Se conjugó la biotina al polisulfato de pentosan usando métodos químicos estándar. El polisulfato de pentosan biotinilado se usa para recubrir las perlas superparamagnéticas derivadas de estreptavidina. Luego se

116

usan las perlas recubiertas para captura específicamente las proteína de prión autorreactivas de homogeneizado de cerebro. La proteína de prión autorreactiva capturada se eluye posteriormente de las perlas y se detecta usando el kit de
5 detección Bio-Rad-Platelia™ inmunobasado; el último kit no puede diferenciar la proteína de prión autorreactiva y la normal, y dará una señal en ambas proteínas. Se investigaron un banco de tres cerebros de bovino infectados con BSE y tres cerebros no infectados, y se usaron para demostrar que el
10 polisulfato de pentosan bajo las condiciones específicas descritas, puede capturar específicamente las proteína de prión autorreactiva de los homogeneizados de cerebro.

Método

Preparación de perlas magnéticas de cubiertas con
15 polisulfato de pentosan.

1. 600µl de perlas superparamagnéticas de estreptadivina (Sigma Aldrich Company Ltd., S-2415) se lavaron por la captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1ml de TBS (50Mm Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5).
- 20 2. Las perlas se volvieron a suspender finalmente en 540µl de TBS y 60µl de polisulfato de pentosan biotinilado 10mg/ml en el TBS agregado. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, al hacer vibrar para permitir que el polisulfato de pentosan recubra las perlas.
- 25 3. Después de recubrir las perlas se lavaron con

112

captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1ml de albúmina de bovino al 5% (p/v) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906), solución amortiguadora de fosfato 50mM pH 8.4 y se volvieron a suspender finalmente en 60µl de la misma solución amortiguadora. Luego estuvieron listas para uso las perlas.

Preparación de los homogeneizados de cerebro.

1. 300-500 mg de cada tejido de cerebro se agregaron a los tubos de molienda que contienen perlas de molienda como se suministra en el kit de purificación BSE (Bio-Rad). El líquido suministrado originalmente en estos tubos en el kit se aspiró y se descartó previo al uso.

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

3. Se homogeneizaron los tubos por 45 segundos a un ajuste de velocidad de 6.5 en un ribolizador (adquirido de Bio-Rad).

4. Los homogeneizados se diluyeron 5 veces con albúmina de bovino 5% (p/v) solución amortiguadora de fosfato 50mM pH 8.4.

5. Se colocaron volúmenes de 45µl de cada homogeneizado en tubos por separado.

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

7. 450µl de albúmina de bovino 5% (p/v), solución amortiguadora de fosfato 50mM pH 8.4 luego se agregó y cada uno se mezcló.

8. 50µl de N-lauroilsarcosina (p/v) al 20% (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) luego se agregó y se mezcló.

Captura específica de la proteína de príon autorreactiva

1. 10µl de perlas superparamagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosan preparado, se agregaron a cada homogeneizado de cerebro diluido y se incubaron al hacer vibrar por 1 hora a temperatura ambiente.

2. Luego se lavó cada reacción por captura magnética con 3 X 100µl volúmenes de TBS.

Elución de la proteína de príon autorreactiva e inmunodetección.

1. Las perlas de cada reacción se volvieron a suspender en 10µl de C1 (suministrado por el kit de detección Bio-Rad Platelia™ BSE).

2. 50µl de 0.2% (p/v) SDS se agregaron a cada suspensión de perlas y se mezclaron.

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

4. La reacción se calentó a 100°C por 5 minutos.

5. 100µl de R6 (suministrado con el kit de detección Bio-Rad Plantelia™ BSE) luego se agregó y se mezcló.

J/9

6. 100µl de cada eluato luego se usó en el Bio-Rad.

7. El kit de detección Platelia™ BSE usando el protocolo y reactivo suministrado con este kit. Brevemente, este kit involucra la inmunocaptura de la proteína de prión normal y autorreactiva, y la inmunodetección con un anticuerpo conjugado de peroxidasa de raíz de rábano.

Resultados

Después de efectuar la inmunodetección en el ensayo Platelia™ basado en placas de microtitulación, se midió la señal en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm usando un vector ELISA.

	Homogeneizado de cerebro usado	CD ₄₅₀
	Muestra 1 de cerebro de bovino infectado con BSE	0.465
15	Muestra 2 de cerebro de bovino infectado con BSE	0.382
	Muestra 3 de cerebro de bovino infectado con BSE	0.437
20	Muestra 1 de cerebro de bovino normal	0.060
	Muestra 2 de cerebro de bovino normal	0.074
	Muestra 3 de cerebro de bovino normal	0.066

25

Las señales de los tres homogeneizados de cerebro infectados con BSE que contiene la proteína de prión autorreactiva, es significativamente superior que en los homogeneizados de cerebro normales no infectados.

5 Discusión

El kit de detección Bio-Rad Platelia™ BSE no puede diferenciar entre la proteína de prión autorreactiva o normal. Normalmente la especificidad para la proteína de prión autorreactiva se logra por la digestión previa de la muestra con la proteína K que retira la proteína de prión normal susceptible a la proteasa. Cualquier proteína de prión autorreactiva en la muestra es más resistente a la digestión de la proteasa y permanece y se detecta posteriormente por el ensayo de Platelia™. En este experimento se ha demostrado un método alternativo para la digestión de la proteasa de la muestra. Se ha usado definidas bajo las cuales el polisulfato de pentosan puede capturar específicamente la proteína de prión autorreactiva de la muestra. Esta proteína de prión autorreactiva capturada se eluye y detecta en el inmunoensayo. La proteína de prión normal no se captura por el polisulfato de pesntosan se lava completamente y no se detecta por lo tanto en el inmunoensayo. Se ha demostrado que por el uso de esta técnica se puede detectar correctamente la proteína de prión autorreactiva entre tres cerebros de bovino infectados con BSE y no se observa señal en tres cerebros de

bovino normal.

Ejemplo 3: Biotiniliación de PPS

Principio del método.

Aproximadamente uno de diez residuos de azúcar en la
5 estructura de poli-xilosa del sulfato de pentosan se
substituye con un residuo de ácido urónico, esto a su vez se
substituye con un éster de metilo en alguno de los grupos
carboxilo, así existe un número de grupos carboxilo libres en
la molécula y se pueden derivar en carbodiimida para formar
10 ésteres activos. Estos a su vez se pueden substituir con
especies amino para generar un enlace de amida. En este caso
particular EDC y NHS se escogen para formar el éster activo y
la hibrazida de biotina se escogen como la especie amina. Se
efectuaron dos reacciones, una reacción en una etapa en la
15 cual está presente la hidrazida de biotina inicialmente y no
se agrega en NHS, y una segunda reacción en la cual NHS/EDC
se deja reaccionar simultáneamente con PS e hidrazida de
biotina.

Materiales

20 Sulfato de pentosan (Norton Healthcare) fue un obsequio
de Stephen Dealler.

Hidrazida de biotina 100mg, Pierce#21339 pm 258.33 lote
AH41461

EDC [1-etil-3-(3-dimetilamimopropil)carbodiimida
25 metyoduro] Sigma #16,534-4, 1g,

NHS [N-hidroxisuccinimida] Sigma # H7377 5g pm 115.1
tubería de diálisis mwco 3.5K pierce # 68035 DMSO Sigma

Método

Se efectuaron las dos reacciones usando los siguientes
5 protocolos en dos versiones con NHS.

Disolver 100mg de hidrazida de biotina en 6 ml de DMSO
en un vial de vidrio, esto puede requerir calentamiento y/o
ultrasonificación. La concentración final es así 16.7 mg/ml o
65Mm. Tomar 1, 000 mg de sulfato de pentosan y disolver en 10
10 ml de una mezcla 50/50 de DMSO y agua esto se puede usar en
un recipiente plástico universal. Disolver 100 mg de EDC en
1ml de DMSO en un vial de vidrio, se puede necesitar
calentamiento. Disolver NHS (aproximadamente 40-50mg n 1.0
ml de agua).

15 La reacción se efectúa en recipientes universales de
poliestireno de fondo cónico con una barra agitadora
magnética circular pequeña (aproximadamente 10mm de diámetro)
sobre una base agitadora magnética y ajustada con una
combinación de electrodo de pH 12mm diámetro (o menos).

20 Ejemplo 3a: Reacción sin NHS

Colocar 5.0 ml de una solución de sulfato de pentosan en
el recipiente de reacción, agregar 1.0 ml de solución de
hidrazida de biotina agitar bien y registrar el PH. Se puede
esperar un valor de 7 a 8.

25 Agregar 0.2 ml de solución EDC y mientras que agita

continuamente registrar el pH y agregar alícuota de 10 µl de HCL 1N desde una micro jeringa de vidrio y aguja, registrar el pH después de cada adición. Continuar las adiciones del ácido hasta que el Ph esta en el rango de 5-6. Esto es necesario ya que la reacción genera iones de OH. La reacción debe permanecer transparente e incolora a lo largo. Si se forma cualquier precipitado blanco de hidrazida de biotina, entonces se debe incrementar la concentración de DMSO, el valor objetivo es $\geq 50\%$. Dejar la reacción por 2 a 3 horas a temperatura ambiente (o durante la noche si esto es más conveniente).

Registrar el pH final de la mezcla de reacción. Agregar un volumen de NaCl 1M para diluir el DMSO hasta 25% y desplazar la hidrazida enlazada iónicamente y transferir los contenidos completos a un tubo de diálisis de 35 cm de longitud de 2.2 cm de diámetro. Observar que la concentración de DMSO se reduce hasta 25% para evitar el daño de la tubería de diálisis, la tubería también se debe probar con agua previo al uso para detectar algunas perforaciones y debe estar solamente en un tercio lleno para permitir el aumento de volumen con la diálisis. Dializar durante la noche dos litros de agua y repetir esto varias veces, entre mayor diálisis mejor lo que tiende el sulfato de pentosan para retener fuertemente los iones básicos por interacción iónica no covalente en virtud de su carga negativa fuerte. Secar por

congelación la solución dializada y registrar el peso seco. El producto final debe ser una torta blanca firme. Los rendimientos pueden variar demasiado pero es típico 50-60%, la mayoría de la pérdida sucede con la diálisis debido a la
5 heterogeneidad de peso molecular del sulfato del pentosan y la pérdida de especies con un peso molecular menor a 3,500.

Ejemplo 3b: Reacción con NHS

Esta reacción se efectúa esencialmente como anterior excepto que 1.0 ml (44mg) de NHS se agregan al vial de
10 reacción previo a la adición del reactivo EDC que comienza la reacción. El pH inicial puede estar en el rango de 6-7 y se debe ajustar a la baja con HCl 1 N hasta aproximadamente pH 5-6.

Control de calidad

15 Después de calcular la recuperación de peso seco, reponer una solución de 10 mg/ml en agua y escanear el espectro de 200 a 400 nm. Los picos se deben observar a 260 y 280 nm aunque uno o ambos pueden ser bordes sin resolver. Esta adsorción se debe a los residuos de piridina
20 incorporados en la molécula durante la etapa de sulfatación. Pueden usarse observar la concentración de sulfato de pentosan por ejemplo, durante cromatografía. El pentosan se pueden monitorear por absorción UV a 260nm o concentraciones
25 inferiores por un ensayo de metacromasia de azul de toluidina.

Ejemplo 4: Remoción de la proteína del prión del plasma.

Remoción de la proteína del prión autorreactiva.

1. 100µl de perlas superparamagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosan preparado se agregaron a una de dos
5 alícuotas de plasma humano preparadas recientemente con picos de PrP^{sc}. Se incubaron ambas alícuotas con hielo en cubos por una hora a temperatura ambiente.

2. Las perlas luego se retiraron de la alícuota de plasma con picos con captura magnética. Este sobrenadante
10 junto con la alícuota de plasma remanente luego se probó para la presencia de la proteína de prión autorreactivo.

Prueba de las alícuotas con picos para la proteína de prión autorreactiva.

1. Las dos alícuotas de plasma se trataron con la
15 proteínasa K bajo condiciones que han demostrado digerir la proteína de prión normal pero dejan intacta la proteína autorreactiva. Estas condiciones se determinan fácilmente de manera empírica. Las muestras tratadas con la proteínasa K luego se probaron para la presencia de la proteína de prión
20 autorreactivo usando el kit de detección Bio-Rad PlateliaTM BSE inmunobasado.

Resultados.

Después de efectuar la inmunodetección en el ensayo de micropozos PlateliaTM basado en placas, se midió la señal en
25 cada pozo en una longitud de onda de 450nm usando un vector

ELISA. La proteína de prión autorreactiva se pueden detectar fácilmente en la muestra de suero con picos que no había sido tratada con polisulfato de pentosan. En contraste la muestra tratada con polisulfato de pentosan no dio señal en la prueba
5 demostrando que no había proteína de prión autorreactiva detectable que permanecía en esta muestra.

Discusión

Este experimento demuestra que el polisulfato de pentosan se puede usar para retirar efectivamente la proteína
10 de prión autorreactiva de las muestras de interés.

Ejemplo 5: Investigación de las condiciones detergentes que permiten el enlace específico de polisulfato de pentosan a la proteína de prión autorreactiva.

Introducción

15 Se conjugó la biotina a polisulfato de pentosan usando métodos químicos estándar. El polisulfato de pentosan biotinilado se usó para recubrir las perlas superparamagnéticas derivadas de estreptadivina recubiertas. Las perlas recubiertas luego se usaron para establecer
20 condiciones detergentes bajo las cuales se puede enlazar el polisulfato de pentosan a la proteína de prión autorreactiva pero no a la proteína de prión celular normal.

Método

Preparación de perlas magnéticas recubiertas con
25 polisulfato de pentosan.

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

5 2. Se volvieron a suspender finalmente las perlas en 540 μ l de TBS albúmina de bovino al 5% (p/v) (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) y 60 μ l de polisulfato de pentosan biotinilado 10mg/ml en TBS agregado. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora con hielo en
10 cubos moderados para permitir que el polisulfato de pentosan recubriera las perlas.

3. Después de recubrir las perlas se lavaron por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de solución amortiguadora de fosfato 50mM pH 8.4, 5% (p/v) BSA y
15 finalmente se volvieron a suspender en 60 μ l de la misma solución amortiguadora. Las perlas luego estuvieron listas para usar.

Preparación de los homogeneizados de cerebro.

1. 300-500mg muestras de tejido de cerebro de bovino
20 normal e infectado con BSE se agregaron a los tubos de molienda que contienen perlas de molienda como se suministran en el kit de purificación de BSE (Bio-Rad). El líquido originalmente suministrado en estos tubos en el kit se aspiró y descartó previo al uso.

25 2. Un volumen de 150mM NaCl que se calculó para generar

un homogeneizado de cerebro 50% (p/v) después de la homogeneización se agregó a cada tubo.

3. Los tubos se homogeneizaron por 45 segundos a un ajuste de velocidad de 6.5 en un ribolizador (adquirido de Bio-Rad).

4. Los homogeneizados se diluyeron 5 veces con 5% (p/v) BSA, 50Mm solución amortiguadora de fosfato pH 8.4.

5. Alícuotas de volumen de 45µl de cada homogeneizado se colocaron en tubos por separado.

10 6. 5µl de 20% (p/v) SDS (dodecil sulfato de sodio) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-5750) se agregaron a cada tubo y se mezclaron completamente.

7. 450µl de 5% (p/v) BSA, solución amortiguadora de fosfato 50mM pH 8.4 luego se agregaron a cada alícuota y se
15 mezclaron.

8. 50µl de N-lauroilsarcosina (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) a diversas concentraciones de detergente luego se agregaron a diversas alícuotas y se mezclaron. En conjunto (un cerebro infectado con BSE y un cerebro no infectado) no
20 tuvieron N-lauroilsarcosina agregada.

Captura de la proteína del prión

1. 10 µl de perlas superparamagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosan preparado se agregaron a cada homogeneizado de cerebro diluido y se incubaron en hielos por
25 una hora a temperatura ambiente.

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

Elución de la proteína de prión e inmunodetección.

1. Las perlas de cada reacción se volvieron a suspender en 10 µl de C1 (suministrado con el kit de detección Bio-Rad Platelia™ BSE).

2. 5 µl de 0.2% (p/v) SDS se agregaron a cada suspensión de perlas y se mezclaron.

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

4. La reacción se calentó a 100°C por 5 minutos

5. 100 µl de R6 (suministrado con un kit de detección de Platelia™ BSE Bio-Rad) luego se agregó y mezcló.

6. 100 µl de cada eluato luego se usó en el kit de detección de Platelia™ BSE Bio-Rad. usando el protocolo y reactivos suministrados por este kit. Brevemente, este kit involucra la inmunocaptura de la proteína de prión normal y/o autorreactiva y la inmunodetección con un anticuerpo conjugado de peroxidasa de raíz de rábano.

Resultados

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

	Concentración final de N-lauroilsarcosina en la solución amortiguadora de captura de perlas	Cerebro de bovino usado	OD ₄₃₀
5	2%	Cerebro infectado con BSE	0.52
	2%	Cerebro normal	0.14
	1%	Cerebro infectado con BSE	0.33
	1%	Cerebro normal	0.13
10	0.5%	Cerebro infectado con BSE	0.45
	0.5%	Cerebro normal	0.13
	0.2%	Cerebro infectado con BSE	0.41
	0.2%	Cerebro normal	0.09
	0%	Cerebro infectado con BSE	0.24
15	0%	Cerebro normal	0.86

En todas las concentraciones de N-lauroilsarocina hay una discriminación entre el cerebro infectado con BSE y normal. N-lauroilsarcosina al 0.2% fue la mejor concentración de detergente y permitió que el polisulfato de pentosan se uniera y capturara la proteína prión autorreactiva sin unirse o capturar la proteína prión normal. En ausencia de N-lauroilsarcosina, aunque está presente el SDS detergente, no hubo discriminación del polisulfato de pentosan enlazado a la proteína prión normal y prión autorreactiva. Bajo estas

condiciones, el polisulfato de pentosan une tanto la proteína prión normal y autorreactiva.

Discusión

1. La especificidad de la unión del polisulfato de pentosan a la proteína prión autorreactiva bajo estas condiciones de prueba específicas depende de la presencia de N-lauroilsarcosina o detergentes similares. Sin este detergente, el polisulfato de pentosan se une tanto a la proteína prión normal y autorreactiva.

10 Ejemplo 6: Investigación de las condiciones de pH que permiten el enlace específico del polisulfato de pentosan para la proteína prión autorreactiva

Introducción

La biotina se conjuga al polisulfato de pentosan usando métodos de química estándar. El polisulfato de pentosan biotinilado se usa para cubrir las perlas superparamagnéticas derivadas de estreptavidina. Las perlas recubiertas se usan entonces para establecer condiciones de pH bajo las cuales el polisulfato de pentosan podrá unir la proteína prión autorreactiva, pero no la proteína prión celular normal.

Método

Preparación de las perlas magnéticas recubiertas de polisulfato de pentosan.

25 1. 1 ml de alícuotas de perlas superparamagnéticas de

estreptavidina (Sigma-Aldrich Company Ltd., S-2415) se lavan por captura magnética en tres volúmenes consecutivos de 1 ml de TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, pH 7.5).

2. Cada alícuota de perlas se vuelve a suspender finalmente en 1 ml de albúmina de suero de bovino (BSA) (Sigma-Aldrich Company Ltd., A-7906) TBS al 5% (p/v), y se agregó 100µl de polisulfato de pentosan biotinilado en TBS. Las perlas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora al hacer vibrar suave para permitir que el polisulfato de pentosan cubra las perlas.

3. Después de recubrir, cada alícuota de perlas se lavó por captura magnética en tres volúmenes de 1 ml consecutivos de 5% (p/v) de BSA, solución amortiguadora Tris 50mM pH 8.4.

4. Se vuelven a suspender entonces alícuotas de perlas en soluciones amortiguadoras de pH 5.7, 7.5, 8.4 y 9.6 todas contienen 5% (p/v) de BSA.

Preparación de homogeneizados de cerebro en soluciones amortiguadoras de varios pH

1. 300-500 mg de tejido de cerebro de bovino normal e infectado con BSE se agregaron cada uno a un tubo de molido que contiene perlas de molido como se suministra en el Kit de Purificación BSE (Bio-Rad). El líquido originalmente suministrado en estos tubos en el kit se aspira y se descarta antes del uso.

2. Un volumen de NaCl 150mM que se calcula para generar un homogeneizado de cerebro de 50% (p/v) después de la homogenización se agregó a cada tubo.

3. Los tubos se homogenizaron durante 45 segundos a una velocidad colocada a 6.5 en un ribolizador (adquirido de Bio-Rad).

4. Se diluyeron 50µl de cada homogeneizado 5 veces en soluciones amortiguadoras de pH 5.7, 7.5, 8.4 y 9.6 todas contienen 5% (p/v) de BSA.

10 5. Se colocaron volúmenes de 45µl de cada homogeneizado diluido en tubos separados.

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

15 7. Se agregó entonces 450µl de la solución amortiguadora del mismo pH como la solución amortiguadora de dilución inicial, todas conteniendo 5% (p/v) de albúmina de bovino a cada una, y se mezcló.

8. Se agregó entonces 50µl de N-lauroilsarcosina al 20% (p/v) (Sigma-Aldrich Company Ltd., L-9150) y se mezcló.

Captura de perlas de los homogeneizados de cerebro

1. Se agregaron 10 µl de perlas super-paramagnéticas recubiertas con polisulfato de pentosan en solución amortiguadora del correspondiente pH a cada homogeneizado de cerebro diluido, y se incubaron al hacer vibrar durante 1

25

hora a temperatura ambiente.

2. Cada reacción se lavó entonces por captura magnética con 3 x 100µl de volúmenes de TBS.

Elución de la proteína de prión autorreactiva e
5 inmunodetección.

1. Las perlas de cada reacción se vuelven a suspender en 10µl de C1 (suministrado con el kit de detección BSE Bio-Rad Platelia® BSE).

2. Se agregaron 5µl de SDS al 0.2% (p/v) a cada
10 suspensión de perla y se mezcló.

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

4. La reacción se calentó a 100°C durante 5 minutos.

15 5. Se agregaron entonces 100µl de R6 (suministrado con el kit de detección Bio-Rad Platelia® BSE) y se mezcló.

6. Se usaron entonces 100µl de cada eluido en el kit de detección Bio-rad Platelia® BSE usando el protocolo y reactivos suministrados con este kit. Brevemente, este kit
20 involucra la inmunocaptura de la proteína prión autorreactiva y/o normal y la inmunodetección con un anticuerpo conjugado de peroxidasa de raíz de rábano.

Resultados

Después de realizar la inmunodetección en el ensayo
25 Platelia® basado en la placa microtitulada, la señal en cada

pozo se midió a una longitud de onda de 450 nm usando un lector ELISA.

	pH de solución amortiguadora usada	Cerebro de bovino usado	OD ₄₅₀
5	5.7	cerebro infectado con BSA	0.79
	5.7	Cerebro normal	0.30
	7.5	cerebro infectado con BSE	1.57
10	7.5	Cerebro normal	1.25
	8.4	cerebro infectado con BSE	0.42
	8.4	Cerebro normal	0.04
	9.6	cerebro infectado con BSE	0.08
15	9.6	Cerebro normal	0.04

A un pH de 7.5 y menor, las perlas recubiertas de polisulfato de pentosan podrán unirse a la proteína tanto normal como autorreactiva. A pH de 9.6 y superiores, las perlas recubiertas de polisulfato de pentosan podrán no unirse a ambas formas de proteína de prión. A un pH de 8.4, las perlas recubiertas con polisulfato de pentosan capturan la proteína prión autorreactiva, pero no capturan la proteína prión normal. A este pH, el polisulfato de pentosan muestra

una especificidad para enlazarse a la proteína prión autorreactiva.

Discusión

La especificidad de unirse bajo las condiciones de prueba del polisulfato de pentosan a la proteína prión autorreactiva, depende del pH. A pH 8.4, el polisulfato de pentosan une la proteína prión autorreactiva pero no une la proteína prión normal. A pH de 7.5 y menores, las prión tanto normal como autorreactiva se unen, mientras que a pH de 9.6 y superiores, estas no se unen a la proteína prión autorreactiva o normal. Por lo tanto, para unión específica de polisulfato de pentosan a la proteína prión ásepera bajo estas condiciones, deberá usarse un pH cercano al 8.4.

Ejemplo 7: Demostración de captura específica de PrP^{res} (PrP^{Sc}) a un ligando polianiónico de alta densidad de carga usando polianiones de menor densidad de carga competente para inhibir selectivamente el enlace de PrP^c

Antecedentes

El PrP puede unirse para polianiones inmovilizados. En ausencia de polianiones competentes en la solución amortiguadora de captura, se capturan tanto el PrP^{res} como el PrP^c. La especificidad para la captura de PrP^{res} puede realizarse al incluir en la solución amortiguadora de captura un polianión de una densidad de carga más baja que el polianión de captura. En este ejemplo, se usa el sulfato de

dextrano como el polianión de captura de alta densidad de carga y N-lauroil sarcosina (que forma micelas de detergente multi-moleculares) y polisulfato de pentosan o fucoïdan se usan como los polianiones competentes de densidad de carga débil.

Método

1. Se recubren pozos de Maxisorp microtitulados con sulfato de dextrano (500 000 mpeso) siguiendo procedimientos estándar.
2. Se agregaron 100µl de homogeneizado de cerebro que contiene 1mg de cerebro, Tris 50mM pH 8.3, BSA al 1% (p/v), Triton X-100 al 1% (v/v) a los pozos recubiertos. En algunos casos, esta solución amortiguadora de captura también contiene ya sea N-lauroil sarcosina al 1% (p/v), fucoïdan, sulfato de dextrano o varias concentraciones de polisulfato de pentosan.
3. Después de la incubación durante 2 horas para permitir la captura de la proteína prión, los pozos se lavaron x3 con Tris 50mM pH 8.3, BSA al 1% (p/v), Triton X-100 al 1% (v/v).
4. Los pozos se lavaron entonces x3 con PBS.
5. Se agregaron 100µl de tiocianato de guanidina a cada pozo y se incubó 5 minutos a 4°C.
6. Los pozos se lavaron 3x con PBS y luego la proteína prión capturada detectada con el conjugado de proteína anti-

prión del kit de detección de BSE Bio-rad Platelia® siguiendo el protocolo del kit.

7. Se midió el desarrollo de la señal en un lector ELISA a OD450.

5 Resultados

	Polianión de competencia usado	Cerebro normal o infectado con BSE	OD450
	Ninguno	Infectado con BSE	0.10
	Ninguno	Normal	0.15
10	N-lauroil sarcosina al 1% (p/v)	Infectado con BSE	0.95
	N-lauroil sarcosina al 1% (p/v)	Normal	0.03
	1mg/ml de polisulfato de pentosan	Infectado con BSE	0.26
15	1mg/ml de polisulfato de pentosan	Normal	0.03
	0.1 mg/ml de polisulfato de pentosan	Infectado con BSE	0.14
	0.1 mg/ml de polisulfato de pentosan	Normal	0.07
20	1 mg/ml de fucoïdan	Infectado con BSE	0.13
	1 mg/ml de fucoïdan	Normal	0.03
	1 mg/ml de sulfato de dextrano	Infectado con BSE	0.02
	1 mg/ml de sulfato de dextrano	Normal	0.03

Discusión

En ausencia del polianión de competencia en la solución amortiguadora de captura, la señal general es menor y por ello no hay diferencia en la señal del cerebro normal o infectado, esto es, no hay una captura específica de PrP^{res}. La señal del cerebro infectado, sin embargo, se incrementa al incluir un polianión de competencia en la solución amortiguadora de captura y la señal de cerebros normales o no infectados correspondientes se suprime. En este ejemplo, la mejor diferenciación entre el cerebro normal e infectado se realiza por el uso de la N-lauroil sarcosina al 1% (p/v) en la solución amortiguadora de captura. Además, puede realizarse una diferenciación entre el cerebro normal e infectado con fucoidan o polisulfato de pentosan. Con polisulfato de pentosan, la diferenciación puede incrementarse al incrementar la concentración del polianión de competencia, polisulfato de pentosan, en la solución amortiguadora de captura desde 0.1 hasta 1 mg/ml. Como el control, si se incluye sulfato de dextrano en la solución amortiguadora de captura, la señal, como se espera, se reduce al respaldo como se completa para e inhibe la unión del PrP al sulfato de dextrano inmovilizado.

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

Antecedentes

En este experimento se demuestra que el PrP^{res} podrá

capturarse específicamente a una superficie polianiónica. En este caso, la superficie se proporciona al derivar el poliestireno de anhídrido maléico. Se usan pozos de polisorp y maxisorp como controles. En otros experimentos, se ha
5 demostrado que estas superficies descargadas pueden derivarse con sulfato de dextrano polianiónico y pueden entonces unir el PrP^{res}.

Método

1. Se derivan los pozos de microplaca de poliestireno
10 activado con anhídrido maléico (Perbio Science UK Ltd., Cheshire) con TBS BSA al 5% (p/v) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Esto genera una superficie cargada con carboxilo en el plástico (ver literatura del producto). Como
15 controles no cargados, los pozos de polisorp y maxisorp (Nunc) también se investigan. Además, los pozos de maxisorp también se recubren con un ligando de sulfato polianiónico de dextrano usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 9.

2. Se agregan a los pozos 100µl de homogeneizados de cerebro que contiene 1 mg de cerebro infectado o no infectado
20 en Tris 50mM pH 8.3, BSA al 1% (p/v), Triton X-100 (v/v) al 1%, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v).

3. Después de la incubación durante 2 horas para permitir la captura de priones, los pozos se lavaron x3 con
tris 50mM pH 8.3, N-lauroil sarcosina al 1% (p/v).

25 4. Los pozos se lavaron entonces x3 con PBS.

JVA

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

6. Los pozos se lavaron 3x con PBS y luego se capturo el prión detectado con el conjugado anti-prión del kit de 5 detección de BSE Bio-Rad Platelia® siguiendo el protocolo del kit.

7. Se midió el desarrollo de la señal en un lector ELISA a OD450.

Resultados

10	Tipo de pozos usados	Cerebro normal o infectado con BSE	OD450
	Aniónico	Infectado con BSE	0.2
	Aniónico	Normal	0.03
	Polisorp	Infectado con BSE	0.05
	Polisorp	Normal	0.03
15	Maxisorp	Infectado con BSE	0.02
	Maxisorp	Normal	0.02

20	Maxisorp recubierto con sulfato de dextrano	Infectado con BSE	1.0
	Maxisorp recubierto con sulfato de dextrano	Normal	0.02

25

Discusión

La superficie de poliestireno aniónica, bajo las condiciones usadas en este experimento, específicamente capturan el PrP^{res}. El plástico no cargado no tiene este efecto, salvo que se recubra con un ligando polianiónico.

Ejemplo 9: Estudio de los efectos de la dilución de muestra de cerebro positivo en muestra negativa

Material

Muestra positiva: Una suspensión del 25% de homogeneizado de cerebro conocido por ser positivo para PrP^{sc}.

Muestra Negativa: Una suspensión del 25% de homogeneizado de cerebro conocido por ser negativo para PrP^{sc}.

Preparación

Placas de maxisorb se recubren de conformidad con el siguiente protocolo de recubrimiento. Se recubrió 1 mg de Polibreno en las placas en solución amortiguadora de carbonato a pH 7.4 y se dejó durante la noche, se lavó 3 veces con PBS. Las placas se recubrieron entonces con 1mg de sulfato de dextrano en PBS. Después de 6 horas, las placas se lavaron 3 veces con PBS, luego se bloquearon con BSA al 5% al agregar 400µl de solución de BSA al 5% y se dejó durante 30 minutos. Las placas se lavaron entonces 3 veces con PBS y se permitió que se secaran.

Preparación de muestra

Preparación de muestra de dilución en cerebro negativo

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

Preparación de dilución de muestra en agua.

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

Preparación de muestra antes de correr en el ensayo

40µl de la muestra se mezclaron con 60µl de H₂O y 25µl de solución amortiguadora de captura, Tris 250mM pH 8.4, BSA al 5%, triton X-100 al 5%, sarkosil al 5%, 1.25 mg/ml de tripsina.

Los ensayos se realizan de conformidad con el siguiente protocolo de ensayo:

1. Agregar 100µl de la muestra a la placa e incubar a temperatura ambiente durante 120 minutos.
- 10 2. Lavar X 3 con tris 50mM pH8.4 +1% sarkosil y X 3 con PBS.
3. Agregar 100µl de 4MGuSCN en PEG al 20% e incubar durante 10 minutos a 2-8°C.
4. Lavar X 3 con PBS.
- 15 5. Agregar 100µl de conjugado de anticuerpo de enzima Bío-Rad Platelia® e incubar a 2-8°C durante 60 minutos.
6. Lavar X 5 con lavado Bio-Rad Platelia®.
7. Agregar 100µl de substrato Bio-Rad Platelia® e incubar durante 30 minutos en la oscuridad.
- 20 8. Agregar 100µl de solución de detención Bio-Rad Platelia® y leer.

✓✓✓

Disposición de la Placa

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

Los resultados obtenidos son como sigue:

Dilución de 10mg de cerebro homogeneizado en cerebro -ve.

	Etiqueta de muestra	mg de cerebro -ve	mg de cerebro +ve	Factor de dilución	OD
15	+ve puro	0.00	10.00	1	4
	1/5	8.00	2.00	5	1.992
	1/10	9.00	1.00	10	1.252
	1/100	9.90	0.10	100	0.175
20	1/250	9.96	0.04	250	0.077
	1/1000	9.99	0.01	1000	0.039
	-ve puro	10.00	0.00	0	0.021

146

Dilución de 10 mg de homogeneizado de cerebro en H₂O.

5

Etiqueta de muestra	mg de cerebro -ve	mg de cerebro +ve	Factor de dilución	OD
+ve puro	0.00	10.00	1	4
1/5	0.00	2.00	5	2.377
1/10	0.00	1.00	10	1.395
1/100	0.00	0.10	100	0.145
1/250	0.00	0.04	250	0.053
1/1000	0.00	0.01	1000	0.016

10

Resumen

15

20

mg de cerebro +ve	OD	
	Dilución en cerebro -ve	Dilución en H ₂ O
10.00	4	4
2.00	1.992	2.377
1.00	1.252	1.395
0.10	0.175	0.145
0.04	0.077	0.053
0.01	0.039	0.016
0.00	0.021	-----

Estos resultados se presentan gráficamente en la Figura 1, los cuales muestran las curvas de dilución para la

147

dilución de cerebro positivo con respectivamente agua y cerebro negativo. Las dos curvas son esencialmente las mismas, demostrando que la presencia de material de cerebro negativo no interfiere con el ensayo.

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

Se ha mostrado que, bajo condiciones definidas, varios agentes de captura selectivos son específicos para la captu
de proteína prión patogénica agregada de tal manera qu no se
10 captura el prión no agregado normal. La proteína prión agregada tiene una estructura de lámina de pliegues beta, mientras que la prión normal es mayormente de hélice alfa en estructura. Este ejemplo demuestra que otras proteína de lámina de pliegues beta agregadas, tales como agregados tau
15 que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer, pueden similarmente capturarse de manera selectiva.

Método

1. 25%(p/v) de homogeneizados de Alzheimer y cerebros de control agrupados por edad, se prepararon en agu
20 destilada.

2. 4µl del cerebro se hacen hasta 100µl en solución amortiguadora de captura (Tris 50mM pH 8.4, 1%(v/v) Triton X-100, 1% (p/v) N-lauroil sarcosina, 1% (p/v) BSA).

3. 25µl de cerebro se hace también hasta 100µl en
25 solución amortiguadora de captura que contiene 25µg de

✓ 8

Tripsina.

4. Se agregan alícuotas duplicadas de 100µl de cerebro preparadas como en las etapas 2 y 3 de arriba, a pozos microtitulados recubiertos con sulfato de dextrano y se
5 incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

5. Los pozos se lavan entonces tres veces con Tris 50mM pH 8.4, 1%(p/v) N-lauroil sacosina.

6. Las muestras se incuban con un anticuerpo monoclonal anti-tau en PBS 0.1%(v/v)Tween20.

10 7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavaron tres veces con PBS 0.1%(v/v)Tween20.

8. Se detectó el anticuerpo primario inmovilizado con un conjugado de peroxidasa de raíz de rábano IgG anti-ratón siguiendo los procedimientos estándar.

15 Resultados

Resultados con el anticuerpo anti-tau

20

Cerebro	1 mg cerebro sin tripsina	10 mg cerebro con tripsina
Alzheimer 1	1.32	1.26
Alzheimer 2	0.85	0.62
Control 1	0.56	0.20
Control 2	0.97	0.51

Discusión

Se conoce que los cerebros de la mayoría de los individuos de edad contienen tau agregado, pero en la enfermedad de Alzheimer hay más de estos agregados que en los
5 controles agrupados por edad. Aquí, el agente de captura selectivo captura estos agregados. En este ejemplo, la digestión de tripsina reduce la unión de la proteína y reduce la señal, pero, bajo estas condiciones, no reduce su respaldo. La relación de señal después del tratamiento con
10 tripsina para la señal sin tratamiento, fue mucho mayor en los cerebros de Alzheimer que en los controles. Esto sugiere que hay más agregados resistentes a la proteasa de la proteína tau en el cerebro de Alzheimer en comparación con los controles agrupados por edad.

15 Ejemplo 11: El efecto de trituración de tripsina en muestras de PrP^{Sc} positivo

Método

Placa recubierta de sulfato de dextrano:

1 mg de bromuro de hexadimetrina (Polibreno) (100µl de
20 10mg/ml en solución amortiguadora de carbonato pH 7.4) se recubrió en placas Maxisorb y se dejó durante la noche a temperatura ambiente.

Cada placa se lavó entonces 3 veces con PBS y se recubrió con 1mg de sulfato de dextrano (PM 500000) (10mg/ml
25 solución de almacenamiento en solución amortiguadora Tris pH

8.6) y se dejó a temperatura ambiente durante 4 horas.

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

5 Las placas se lavan entonces 3 veces con PBS.

Solución amortiguadora de captura

Solución amortiguadora Tris 250mM a pH 8.4 que contiene BSA al 5%, sarkosil al 5%, triton al 5%.

Muestra

10 Se trataron cerebros débilmente y fuertemente positivos BI63 y SV10 (homogeneizado al 25%) como sigue, para proporcionar muestras para ensayo.

25µl de homogeneizado de cerebro + 25µl de solución amortiguadora de captura, Tris 250mM pH8.4, BSA al 5%, Triton
15 X-100 al 5%, sarkasoil al 5%, + 65µl de H₂O.

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

Solución amortiguadora de lavado

Tris 50mM pH8.4 + sarkosil al 1%

20 Método

Protocolo de ensayo

1. Se agregó 100 µl de muestra a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 120 minutos.

2. Se lavó X 3 con 50mM Tris pH8.4 +sarkosil al 1% y X 3
25 con PBS.

JSA

3. Se agregó 100 µl de 4MGuSCN (en 20% PEG) y se incubó durante 10 minutos a 2-8°C.

4. Se lavó X 3 con PBS.

5. Se agregó 100 µl de conjugado de anticuerpo de enzima Bio-Rad Platelia™ y se incubó a 2-8°C durante 60 minutos.

6. Se lavó X5 con lavado Bio-Rad Platelia™.

7. Se agregó 100 µl de sustrato Bio-Rad Platelia™ y se incubó durante 30 minutos en la oscuridad.

8. Se agregó 100 µl de solución de detención Bio-Rad Platelia™ y se leyó.

Resultados

5 mg de cerebro positivo B163

	Tripsina (µg)	OD
15	1000	0.135
	100	0.14
	25	0.169
	10	0.173
	1	0.068
20	0	0.068

5 mg de cerebro positivo SV10

	Tripsina (µg)	OD
	25	2.858
25	0	0.894

Conclusión

La presencia de tripsina aparece para incrementar la señal. También aparece que un amplio rango de concentración de tripsina puede usarse sin un efecto en detrimento en el ensayo.

5 Ejemplo 12: Demostración del enlace específico de Prp^{sc} por policationes

Método

Este ejemplo demuestra el uso de varios policationes para la captura específica de Prp^{sc}. Los ligandos se recubren ya sea
10 pasivamente en microplacas de poliestireno o se recubren activamente (esto es, se unen), donde sea apropiado, a placas de anhídrido maléico.

Inmovilización del agente de enlace selectivo

Todos los agentes de enlace selectivo se inmovilizan
15 durante la noche a 16-25°C en solución amortiguadora de carbonato 50mM pH 9.6 a una concentración de 10µg/ml. Después de la inmovilización, las paredes se lavan x3 con PBS y luego se bloquean con BSA al 5% (p/v) en PBS durante 30 minutos. después de bloquear, los pozos se lavan x2 con PBS antes de
20 usarse. El dendímetro Starbust PAMA, poli L-lisina y polietilenimina se recubrieron en tanto Maxisorp como microplacas de anhídrido maléico, mientras que el polibreno y pDADMAC se recubren sólo en placas de Maxisorp.

Captura de Prp^{sc}

25 1. Se homogenizan cerebros de bovino no infectados y

de bovino infectados con BSE en agua destilada siguiendo los protocolos definidos comercialmente.

2. 0.5 mg del cerebro homogeneizado se capturó en los pozos recubiertos de ligando en un volumen total de 100µl
5 Tris 50mM pH 8.3, 1% (p/v) N-lauroil sarcosina, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (p/v) BSA, 0.5mg/ml tripsina (páncreas porcino).

3. Después de capturar durante 2 horas a 18-25°C, los pozos se lavaron x3 con tris 50mM pH 8.3, N-lauroil
10 sarcosina al 1% (p/v).

4. Los pozos se lavaron entonces x3 con PBS y se incubaron durante 10 minutos con 100µl de tiocianato de guanidina 4M, PEG 8000 al 20% a 4-8°C.

5. Los pozos se lavan x3 con PBS y luego se incuban
15 con un conjugado de peroxidasa de raíz de rábano monoclonal anti-prión.

6. Después de 60 minutos, los pozos se lavan x5 con PBS 0.1% (v/v) Tween20, y se agregó 100µl de sustrato TMB.

7. Después de 30 minutos se midió el OD450 de cada
20 reacción y se registró (ver tabla de abajo).

154

Resultados

	Agente de enlace	Absorción pasiva		Absorción activa	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativa
5	Starburst de dendrímero PAMA	0.938	0.030	0.097	0.026
	Polibreen	0.019	0.016	ND	ND
	Poli L-lisina	0.070	0.017	0.001	0.001
	pDADMAC*	1.828	0.037	ND	ND
10	Polietilenimina	0.118	0.030	0.402	0.055

*Aldrich 40903-0-pm 400,000 - 500,000

Discusión

Los polimeros Starburst dendrímero PAMA y pDADMAC trabajan bien como ligandos específicos de PrP^{sc} cuando se recubren pasivamente para microplacas de poliestireno. El pDADMAC trabaja mejor en esta serie de agentes de enlace. El polietilenimina trabaja en algún grado cuando se inmoviliza en microplacas de anhídrido maléico a través de estos grupos amino.

Este experimento demuestra que una variedad de cationes poli pueden usarse para capturar específicamente el PrP^{sc} del cerebro infectado bajo las condiciones de solución amortiguadora de captura dadas. Estos agentes pueden inmovilizarse pasivamente o activamente a las superficies de poliestireno. Otros experimentos han demostrado que la señal máxima de 20mg de cerebro positivo puede realizarse en

155

presencia de N-lauroil sarcosina al 1% (p/v) en la solución amortiguadora de captura; sin N-lauroil sarcosina la señal se reduce. Esto ilustra que los agentes de captura realizan mejor bajo condiciones de solución amortiguadora definida.

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

Antecedentes

El pDADMAC, bajo condiciones definidas, se ha mostrado
10 que es específico para la captura de la proteína prión patogénica agregada; la prión no agregada normal no se captura. La proteína prión agregada tiene una estructura de lámina con pliegues en beta extensiva, mientras que la prión normal es mayormente de hélice alfa en estructura. Se postula
15 que el agente de enlace puede reconocer otras proteínas de lámina de pliegue en beta agregadas tales como agregados beta-amiloide y tau que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer. Los experimentos de abajo se realizaron con objeto de investigar esta hipótesis.

20 Método

1. Se prepararon homogeneizados de Alzheimer al 25% (p/v) y cerebros de control agrupados por edad en agua destilada.

2. Se hacen 80µl del homogeneizado de cerebro hasta 100µl en solución amortiguadora de captura (tris 50mM pH 8.4,
25 1% (v/v) triton X-100, 1% (p/v) N-lauroil sarcosina, 1% (p/v)

JTB

BSA) y se agregó a micropozos recubiertos policatiónicos (formados al recubrir los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40,903-0).

5 3. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pozos se lavan tres veces con Tris 50mM pH 8.4, N-lauroil sarcosina al 1%(p/v) y luego se incuban con un anticuerpo anti-tau monoclonal en PBS 0.1%(v/v)Tween20.

10 4. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavan tres veces con PBS 0.1%(v/v)Tween20.

5. se detectó el anticuerpo primario inmovilizado con un conjugado de peroxidasa de raíz de rábano IgG anti-ratón siguiendo los procedimientos estándar.

15 Resultados

Cerebro	Clasificación por banco de cerebros	OD450
67/97	Positivo	1.85
73/97	Positivo	0.80
163/97	Positivo	0.61
149/97	Positivo	0.45
97/97	Negativo	0.05
98/98	Negativo	0.08

20 Discusión

25 El agente de enlace policatiónico permite la captura de

157

los agregados tau. Cuando el tau capturado se detecta con el anticuerpo anti-tau, los cerebros de enfermedad de Alzheimer todos tienen una señal positiva alta, mientras que los cerebros de control negativos dan una señal negativa baja. En conclusión, la captura con un polication bajo las condiciones específicas puede permitir la diferenciación de cerebros de enfermedad de Alzheimer de aquellos cerebros sin la enfermedad.

Ejemplo 14: Efecto de las diferentes proteasas y DNasa en la inhibición de matriz de capturo pDADMAC de PrP^{Sc}

10 Antecedentes

El efecto de proteasas diferentes en la efectividad de la captura de PrP^{Sc} a las placas recubiertas con polication (formadas por el recubrimiento de los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC) (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40,903-0) se investigaron.

Método

1. 80µl de homogeneizado de cerebro se hace hasta 100µl por la adición de 20µl de solución amortiguadora de captura (250mM tris pH 8.3, 5% (V/V) Triton X-100, 5% (p/v) N-lauroil sarosina, 5% (p/v) BSA) que contiene diferentes proteasas y/o DNasa.

2. Los homogeneizados se agregan entonces a los micropozos recubiertos policationicos.

3. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pozos se lavan seis veces con PBS.

JB

4. Se agregan 100µl de tiocianato de guanidina 4M, 20% (p/v) PBG a cada pozo.

5. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, los pozos se lavaron tres veces con PBS.

5 6. Se agregaron 100µl de conjugado de peroxidasa de raíz de rábano proteína anti-prión (diluido 1;1500 en PBS 0.1% (v/v) Tween 20 y 5% (p/v) BSA).

7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavaron cinco veces con PBS 0.1% (v/v) Tween20.

10 8. Se detectó el conjugado inmovilizado con solución de TMB siguiendo los protocolos estándares.

Resultados

Evaluación de los efectos de quimiotripsina, tripsina, DNasa y proteinasa K en la solución amortiguadora de captura

15	Proteasa o DNasa usada	Cerebro de bovino infectado
	Sin proteasa o DNasa	0.122
	Quimio/tripsina (conc. De ambos 6.25mg/ml)	0.139
	Dnasa/Tripsina (conc. 1mg/ml Dnasa, 6.25 mg/ml tripsina)	0.639
	Quimio/Dnasa (conc. 1mg/ml Dnasa, 6.25mg/ml Quimio)	0.616
20	Quimio/Dnasa/Tripsina conc. 1mg/ml Dnasa, 6.25mg/ml Quimio y Tripsina	0.480
	Tripsina (conc. 6.25mg/ml)	0.568
	Quimio (conc. 6.25mg/ml)	0.171
	Dnasa (conc. 1mg/ml)	0.180
	Proteinasa K (conc 1mg/ml)	0.531
	Pronasa (conc. 1.25mg/ml)	0.222
25	Pronasa (conc. 6.25mg/ml)	0.178

159

4. Se agregan 100µl de tiocianato de guanidina 4M, 20% (p/v) PEG a cada pozo.

5. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, los pozos se lavaron tres veces con PBS.

5 6. Se agregaron 100µl de conjugado de peroxidasa de raíz de rábano proteína anti-prión (diluido 1;1500 en PBS 0.1% (v/v) Tween 20 y 5% (p/v) BSA).

7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavaron cinco veces con PBS 0.1% (v/v) Tween20.

10 8. Se detectó el conjugado inmovilizado con solución de TMB siguiendo los protocolos estándares.

Resultados

Evaluación de los efectos de quimiotripsina, tripsina, DNasa y proteinasa K en la solución amortiguadora de captura

15	Proteasa o DNasa usada	Cerebro de bovino infectado
	Sin proteasa o DNasa	0.122
	Quimio/tripsina (conc. De ambos 8.25mg/ml)	0.139
	Dnasa/Tripsina (conc. 1mg/ml Dnasa, 6.25 mg/ml tripsina)	0.639
	Quimio/Dnasa (conc. 1mg/ml Dnasa, 8.25mg/ml Quimio)	0.616
20	Quimio/Dnasa/Tripsina conc. 1mg/ml Dnasa, 6.25mg/ml Quimio y Tripsina	0.460
	Tripsina (conc. 6.25mg/ml)	0.568
	Quimio (conc. 6.25mg/ml)	0.171
	Dnasa (conc. 1mg/ml)	0.180
	Proteinasa K (conc 1mg/ml)	0.531
	Pronasa (conc. 1.25mg/ml)	0.222
25	Pronasa (conc. 6.25mg/ml)	0.178

Concentraciones de tripsina y quimiotripsina titulantes en
solución amortiguadora de captura

5	Proteasa usada	Cerebro de bovino infectado
	Tripsina 6.25mg/ml	0.732
	Tripsina 1.25mg/ml	0.726
	Quimio 3.125mg/ml	0.568
	Quimio 0.625mg/ml	0.433

10 Discusión

Se ha demostrado que el ligando policationico bajo ciertas condiciones es específico para enlazarse a PrP^{sc}. Sin embargo, la señal se puede reducir por los efectos de matriz derivados de los constituyentes del homogeneizado de cerebro que pueden interferir con el enlace y reducir la señal. Este efecto de matriz puede reducirse y la señal del cerebro infectado incrementarse por el uso de proteasas. Este estudio muestra que la tripsina, quimiotripsina y proteinasa K son efectivos para remover la inhibición de matraz; la pronasa (a las concentraciones investigadas) es menos efectiva. La tripsina a una concentración de 6.25-1.15 mg/ml es igualmente efectiva, mientras que la quimiotripsina es más efectiva a la concentración incrementada. La DNasa tiene un efecto más pequeño pero demostrable en la remoción de la inhibición de matriz.

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

Antecedentes

Los efectos de la concentración de pH y sal en la efectividad de la captura de PrP^{sc} para las placas recubiertas de poliacrilato (formado al recubrir los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40,903-0) se investigaron.

Método

1. 80µl de homogeneizado de cerebro se llevan hasta 100µl por la adición de 20µl de solución amortiguadora de captura (Tris 250mM, ver Tabla para pH, 5%(v/v) Triton X-100, 5%(p/v) N-lauroil sarcosina, 5%(p/v) BSA y 6.25mg/ml de tripsina) que contiene varias concentraciones de sal y ajustados a varios pH, se investigó.

2. Los homogeneizados se agregan entonces a micropozos recubiertos poliacrílicos.

3. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pozos se lavaron seis veces con PBS.

4. Se agregó 100µl de tiocianato de guanidina 4M, 20%(p/v) PEG a cada pozo.

5. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los pozos tres veces con PBS.

6. 100µl de conjugado de peroxidasa de raíz de rábano de proteína anti-prión (diluido 1:1500 en PBS 0.1%(v/v) Tween 20 y 5% (p/v) BSA) se agregó.

7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavaron cinco veces con PBS 0.1%(v/v) Tween20.

8. El conjugado inmovilizado se detectó con solución TMB siguiendo los protocolos estándares y el OD450 de las reacciones medidas.

Resultados

10 Efecto del pH

15

solución amortiguadora de captura	Cerebro de bovino infectado	Cerebro de bovino negativo
5	0.177	0.119
6	0.082	0.1
7	0.093	0.045
8.4	0.226	0.039
9	0.24	0.038
10	0.25	0.037

Efecto de la sal

20

solución amortiguadora de captura	Cerebro de bovino infectado	Cerebro de bovino no infectado
NaCl 20mM	0.476	0.038
NaCl 100mM	0.361	0.039
NaCl 250mM	0.191	0.028
NaCl 1M	0.06	0.024

Discusión

Como el pH de la solución amortiguadora de captura es más bajo, la señal del cerebro no infectado se incrementa, pero la señal del cerebro infectado se reduce. A pH de más de 8.0, el positivo óptimo para la relación de señal negativa se realiza.

Como la concentración de sal en la solución amortiguadora de captura se incrementa, la señal del cerebro infecto se reduce progresivamente. Esto indica que una concentración de sal baja o no sal es la condición óptima para la captura de PrP^{Sc}.

Ejemplo 16: Efecto de concentraciones variadas de N-lauroil sarcosina y proteasa en la captura pDADMAC de PrPSc

15 Antecedentes

El efecto de diferentes concentraciones de N-lauroil sarcosina en la presencia o ausencia de tripsina, se investiga en la efectividad de captura de PrPSc para las placas recubiertas de poliacrilato (formadas al recubrir los pozos con poli(cloruro de dialildimetil amonio) (pDADMAC), (Aldrich Chemical Company Inc., catálogo número 40,903-0) se investigó.

Método

1. 80µl de homogeneizado de cerebro infectado se llevan hasta 100µl por la adición de 20µl de solución

amortiguadora de captura (Tris 250mM pH 8.3, 5%(v/v) Triton X-100, 5%(p/v) BSA) que contiene diferentes concentraciones de proteasa y N-lauroil sarcosina.

2. Los homogeneizados se agregan entonces a los
5 micropozos recubiertos policatiónicos.

3. Después de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, los pozos se lavan seis veces con PBS.

4. 100µl de guanidina tiocianato 4M, 20% (p/v) PEG se agregan a cada pozo.

10 5. Después de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, los pozos se lavan tres veces con PBS.

6. 100µl de conjugado de peroxidasa de raíz de rábano de proteína anti-prión (diluido 1:1500 en PBS 0.1% (v/v) Tween 20 y 5%(p/v) se agregaron.

15 7. Después de 1 hora a temperatura ambiente, los pozos se lavaron cinco veces con PBS 0.1%(v/v) Tween20.

8. El conjugado inmovilizado se detectó con solución TMB siguiendo los protocolos estándar.

20

25

Resultado

Detergente y proteasa usado en la solución amortiguadora de captura		Concentraciones de agente usado	OD450
5	N-lauroil sarcosina	0	0.08
	Tripsina	1.25 mg/ml	
	N-lauroil sarcosina	2.5%	1.181
	Tripsina	1.25 mg/ml	
	N-lauroil sarcosina	5%	2.267
	Tripsina	1.25 mg/ml	
10	N-lauroil sarcosina	10.0%	2.628
	Tripsina	1.25 mg/ml	
	N-lauroil sarcosina	0	0.171
	Tripsina	6.25 mg/ml	
	N-lauroil sarcosina	2.5%	2.384
	Tripsina	6.25 mg/ml	
15	N-lauroil sarcosina	5%	2.725
	Tripsina	6.25 mg/ml	
	N-lauroil sarcosina	10.0%	2.883
	Tripsina	6.25 mg/ml	

Discusión

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

Aunque la invención se ha descrito con referencia
particular a modalidades preferidas de esta, se apreciará que
25 muchas modificaciones y variaciones de la misma son posibles

/66

dentro del alcance general de la invención. Cualquier
variación de la invención como se reivindica explícitamente
que operaría en la misma forma para producir el mismo
resultado, está dentro de la protección conferida por al
5 solicitud.

En esta especificación, salvo que se indique
expresamente de otra manera, la palabra "o" se usa en el
sentido de un operador que regresa un valor real cuando
alguno o ambas de las condiciones establecidas se cumplen,
10 como opuesto al operador "exclusivo o" que requiere que sólo
una de la condiciones se cumplan. La palabra "comprende" se
usa en el sentido de "incluir" en ves de significar "consiste
de".

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
15 método conocido por la solicitante para llevar a la práctica
la citada invención, es el que resulta claro de la presente
descripción de la invención.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones.

5 1. Un proceso para el enlace selectivo de una forma anormal agregada de una proteína en presencia de una forma normal no agregada de la proteína, caracterizado porque comprende poner en contacto bajo condiciones de enlace selectivo un material que contiene tanto las formas anormales
10 como normales con un agente de enlace que es un material poli-iónico que tiene una fuerza de enlace para la forma agregada de la proteína como se presenta en la muestra. *cll reviv*

2. El proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las condiciones de enlace selectivo
15 incluyen la presencia de un agente de competencia en solución, el agente de competencia tiene grupos iónicos que tienen una fuerza de enlace menor para la forma anormal de la proteína que la del material poli-iónico. *cll*

3. El proceso de conformidad con la reivindicación 1 ó
20 la reivindicación 2, caracterizado porque el agente de enlace es resistente a la proteasa. *cll*
qual agent

4. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la proteasa se presenta durante el enlace o en donde la proteína
25 se expone a la acción de una proteasa después de enlazarse. *cll*
result

5. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el agente de enlace es un material polianiónico que tiene una multiplicidad de grupos aniónicos o un material policatiónico que tiene una multiplicidad de grupos catiónicos.

6. El proceso de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el material poli-iónico tiene una multiplicidad de grupos aniónicos que son grupos sulfato, carboxilo o fosfato, o una multiplicidad de grupos catiónicos que son grupos amino, grupos imina o grupos de amonio cuaternario.

7. El proceso de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque el material poli-iónico es un poliglicósido polianiónico.

8. El proceso de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el poliglicósido polianiónico es un poliglicósido polisulfonado.

9. El proceso de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el poliglicósido polianiónico es un derivado de pentosan polianiónico o derivado de dextrano.

10. El proceso de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque el poliglicósido polisulfonado es polisulfato de pentosan (PPS) o sulfato de dextrano. ✓

11. El proceso de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado porque el material poli-iónico es bromuro de

hexadimetrina, dendrímero PAMAM, poli L-lisina, pDADMAC o polietilenimina. ✓

12. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el agente
5 de competencia tiene una densidad menor de grupos iónicos que el material poli-iónico.

13. El proceso de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el agente de competencia es aniónico.

14. El proceso de conformidad con la reivindicación 13,
10 caracterizado porque el agente de competencia es un detergente aniónico.

15. El proceso de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el agente de competencia es una amida de aminoácido de un ácido graso.

15 16. El proceso de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el agente de competencia es n-lauroilsarcosina. ✓

17. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el pH es ^{cual} tal que promueve el enlace del agente de enlace a la forma
20 anormal de la proteína. _{pH?}

18. El proceso de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque el pH es desde 8 hasta 9.

19. El proceso de conformidad con la reivindicación 18,
25 caracterizado porque el pH es desde 8.2 hasta 8.6. ✓

agente de competencia

20. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el detergente está presente de manera que promueve el enlace del agente de enlace a la forma anormal de la proteína.

5 21. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el agente de enlace después de enlazar la forma anormal agregada de la proteína, se captura con un agente de captura inmovilizado.

10 22. El proceso de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el agente de captura es una lectina o un anticuerpo reactivo con el agente de enlace.

15 23. El proceso de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el agente de enlace se proporciona con una porción de etiqueta enlazable selectivamente y el agente de captura se enlaza a la porción de etiqueta.

24. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 hasta 20, caracterizado porque el agente de enlace se inmoviliza al medio sólido antes de exponerse a la forma anormal de la proteína.

20 25. El proceso de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el medio es un sustrato que tiene el agente de enlace recubierto en éste.

25 26. El proceso de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el agente de enlace se proporciona con una porción de etiqueta selectivamente enlazable y se

120
no me gusta el título,
El uso
fuerza, de un mismo elemento

inmoviliza al medio sólido por medio de la porción de etiqueta.

27. El proceso de conformidad con la reivindicación 23 o reivindicación 26, caracterizado porque la porción de
5 etiqueta enlazable es biotina, fluoresceína, dinitrofenol, digoxigenina, un ácido nucleico o una secuencia análoga de ácido nucleico o (His)₆.

28. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1 hasta 20, caracterizado porque el agente de enlace en un sólido que proporciona una superficie tiene la avidez de enlace.

29. El proceso de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque la superficie es tal que el polímero tiene grupos iónicos enlazados covalentemente en la estructura del polímero o producidos por la modificación de grupos de superficie del polímero.

30. Un proceso de ensayo para la presencia de una forma agregada anormal de una proteína en la muestra, el proceso caracterizado porque comprende el enlace de la proteína de forma anormal de conformidad con cualquier reivindicación precedente, seguido por determinar la existencia o cantidad de enlace de la proteína al agente de enlace.

31. El proceso de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el enlace se determina cualitativamente o cuantitativamente al conducir un inmunoensayo para la forma

agregada de la proteína.

32. El proceso de conformidad con la reivindicación 30 ó la reivindicación 31, caracterizado porque el enlace de la forma agregada anormal de la proteína se conduce selectivamente en presencia de la forma no agregada anormal de la proteína y la proteína de forma agregada enlazada se separa entonces de la proteína de forma normal no enlazada y posteriormente la determinación de la existencia o cantidad del enlace se determina.

33. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la forma anormal de la proteína es PrP^{Sc} y la forma normal es PrP^{C} .

34. Un proceso para separar PrP^{Sc} de PrP^{C} caracterizado porque comprende enlazar selectivamente PrP^{Sc} a un agente de enlace en presencia de una amida de aminoácido de un ácido graso.

35. El proceso de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el agente de enlace es un material poli-iónico.

36. El proceso de conformidad con la reivindicación 34 o reivindicación 35, caracterizado porque la amida de aminoácido de un ácido graso es N-lauroilsarcosina.

37. El proceso de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 34 hasta 36, caracterizado porque se conduce a un pH desde 8 hasta 9.

38. Un agente de enlace, caracterizado porque es un poliglicósido polianiónico, hexadimetrina, o un agente de enlace policatiónico conjugado a una porción de tiqueta enlazable, en donde el agente de enlace puede inmovilizarse un medio sólido por el enlace de la porción de etiqueta enlazable a un agente de captura en el medio sólido.

39. Un agente de enlace selectivo de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el agente de enlace es un poliglicósido polisulfonado.

40. El agente de enlace selectivo de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el agente de enlace es un derivado de pentosan polianiónico o un derivad de dextrano.

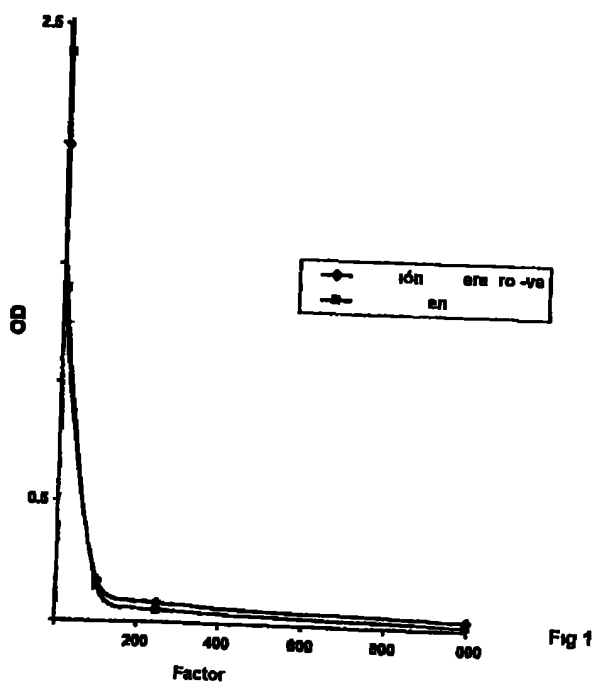
41. Un agente de enlace selectivo de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el agente de enlace es un material policatiónico, seleccionado de bromuro de hexadimetrina, dendrímero PAMAN, poli L-lisina, pDADMAC o polietilenimina.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen formas de agregación infecciosas de proteínas tales como PrP, amiloides, y tau que se enlazan selectivamente en presencia de la proteína de la forma normal usando un agente de enlace poli-iónico tal como sulfato de dextrano o pentosan (aniónicos), o compuestos de poliamina tales como pDADMAC (catiónico). bajo condiciones de enlace selectivo que incluyen el uso de n-lauroilsarcosina a un pH medianamente alcalino, y pueden luego evaluarse.

1/1

[Handwritten signature]



176

NIT : 800176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 74,341
FECHA : SEPTIEMBRE 20 DE 2004

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 84035972 00000000 Folios: 176
Fecha (MM): 2004-09-27 17:09:10
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FREE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 8909 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32738603	20/09/2004	22,553,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.
	TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Bo 14459-841-0013

177
177

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacon : 04095972 00300003 Folios: 176
Fecha (AHD): 2004-09-27 17:09:18
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC.
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	(X)
MODELO DE UTILIDAD	()	(X)
- indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	(X)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	(X)
- Descripción de la invención	()	(X)
- Dibujos de ser estos pertinentes. X	()	(X)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	(X)
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable

Claudia M. Neiva

Fecha

178
180



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)
MICROSENS BIOPHAGE LIMITED

Oficio N° **10044**

ASUNTO:

Radicación N°	04-95972
Solicitud internacional	PCT/GB03/000858
Fecha inicio fase nacional	28/09/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

23 OCT. 2004

202044

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia


29 OCT/2004.