



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



02 117650 00

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 02117650 0000000

Folios: 151 n

Fecha (AGD): 2002-12-31 12:07:39

Título: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1	SOLICITUD DE:													
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.												
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.												
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. sociedad constituida y existente bajo las leyes de Holanda. Dirección: Pietermaai 15, Curacao, Antillas Holandesas Domicilio: Curacao, Antillas Holandesas.	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: _____												
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: EMILIO FERRERO Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax:: 217 92 11 E-mail: <u>clientes@camvp.com.</u> Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número: <u>438.019</u> T.P. <u>31.829</u>												
4 INVENTOR (ES) (72)	1- Claudio SOTO 37 chemin des Méandres, CH-1287 Laconnex, Suiza. 2- Gabriella SABORIO 28 chemin de la Planche Brûlée, F-01210 Farnay-Voltaire Francia.													
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/GB01/02584</u> Publicación Internacional No. <u>WO 02/04954 A2</u> Fecha: <u>13 de junio de 2001</u> Fecha : <u>17 de enero de 2002</u>													
6	Título (54) <u>DIAGNOSTICO TEMPRANO DE ENFERMEDADES CONFORMACIONALES</u>													
7	Clasificación Internacional (51) <u>G01N 33/68</u>													
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	<table><tr><th>(33) País de Origen</th><th>(32) Fecha</th><th>(31) Número de Solicitud</th></tr><tr><td>EP.</td><td><u>7 de julio de 2000</u></td><td><u>00114850.5</u></td></tr><tr><td>EP.</td><td><u>20 de diciembre de 2000</u></td><td><u>00127892.8</u></td></tr><tr><td>EP.</td><td><u>7 de febrero de 2001</u></td><td><u>01102732.3</u></td></tr></table>	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	EP.	<u>7 de julio de 2000</u>	<u>00114850.5</u>	EP.	<u>20 de diciembre de 2000</u>	<u>00127892.8</u>	EP.	<u>7 de febrero de 2001</u>	<u>01102732.3</u>
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud												
EP.	<u>7 de julio de 2000</u>	<u>00114850.5</u>												
EP.	<u>20 de diciembre de 2000</u>	<u>00127892.8</u>												
EP.	<u>7 de febrero de 2001</u>	<u>01102732.3</u>												
9	Comprobante de pago No.: <u>02.82.553</u> Fecha: <u>9 de diciembre de 2002</u>													

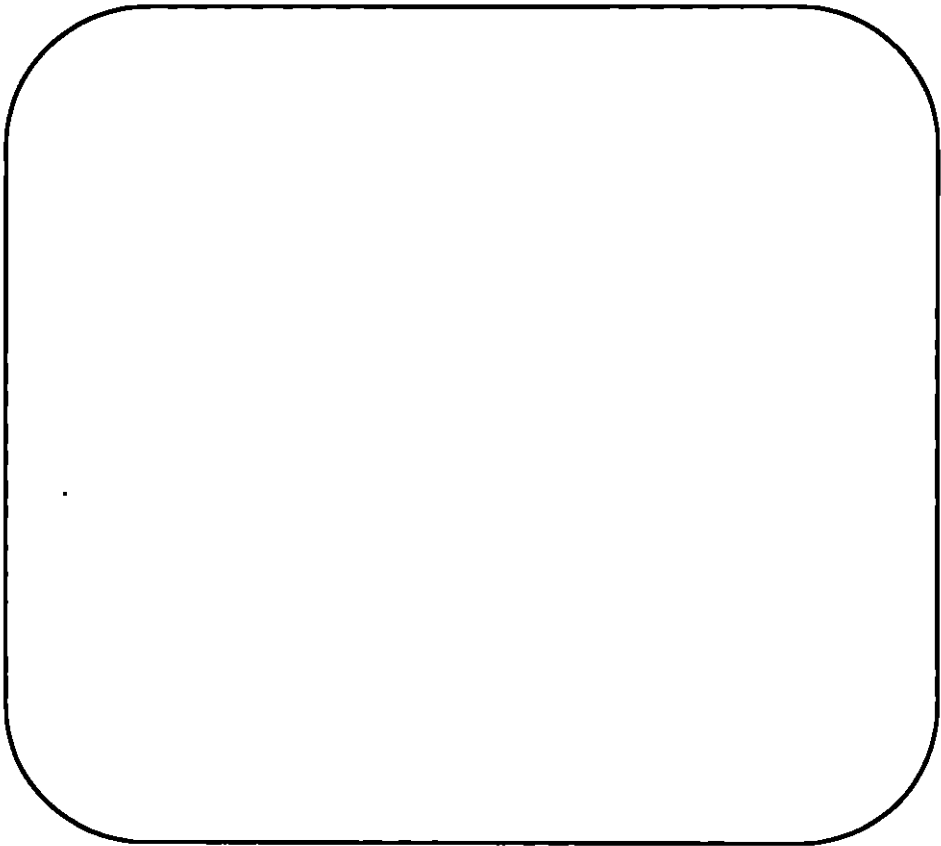
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 378.000.00.
- ☐ 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 CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929



MRE/mrm-ld-3

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

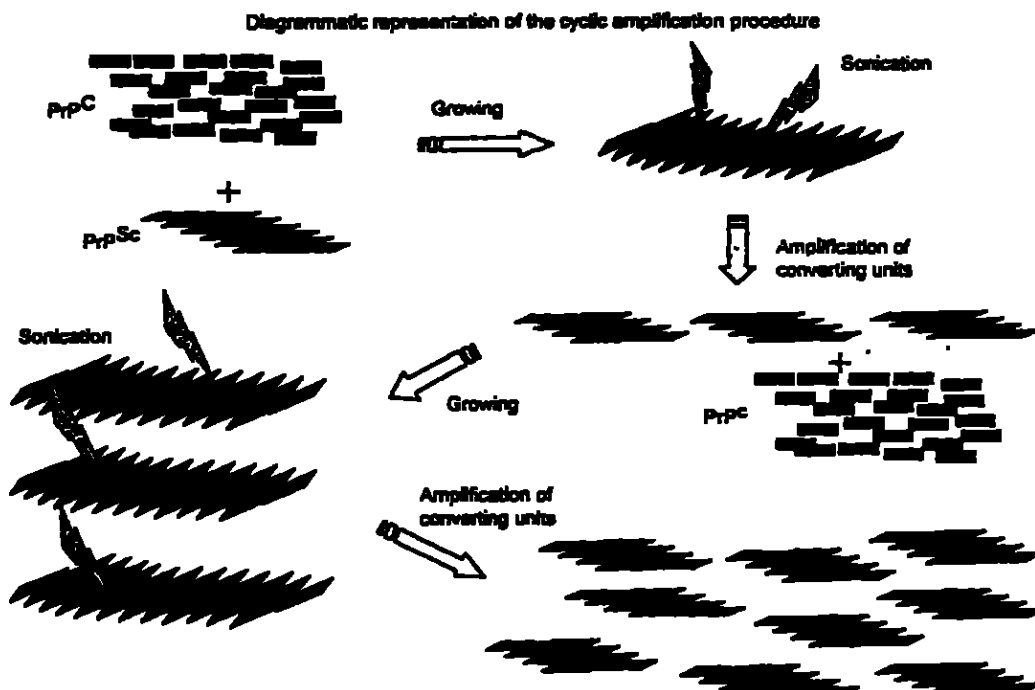
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/04954 A2

- (51) International Patent Classification⁷: G01N 33/68 (74) Agents: WEBBER, Philip, Michael & al.; Frank B. Deh.: & Co., 179 Queen Victoria Street, London EC4V 4EL (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/02584 ✓
- (22) International Filing Date: 13 June 2001 (13.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00114650.5 7 July 2000 (07.07.2000) EP
00127892.8 20 December 2000 (20.12.2000) EP
01102732.3 7 February 2001 (07.02.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. [NL/NL]; Pietermaai 15, Curacao (AN).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): SOTO, Claudio [CL/CH]; 37 chemin des Méandres, CH-1287 Laconnex (CH). SABORIO, Gabriella [MX/FR]; 28 chemin de la Planchette Brûlée, F-01210 Ferney-Voltaire (FR).
- (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, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, ST, SV, TC, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: EARLY DIAGNOSIS OF CONFORMATIONAL DISEASES



(57) Abstract: A method for the diagnosis or detection of conformational diseases by assaying for a marker (the pathogenic conformer) of such diseases in a sample is described, which method comprises a cyclic amplification system to increase the levels of the pathogenic conformer which causes such diseases. In particular, such transmissible conformational diseases may be prion encephalopathies. Assays, diagnostic kits and apparatus based on such methods are also disclosed.

WO 02/04954 A2

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 89.75803	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/GB 01/ 02584	International filing date (day/month/year) 13/06/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 07/07/2000
Applicant APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

2
☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 01/02584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68

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 C07K

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, WPI Data, MEDLINE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAUGHEY B ET AL: "Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state." CHEMISTRY & BIOLOGY. ENGLAND DEC 1995, vol. 2, no. 12, December 1995 (1995-12), pages 807-817, XP008004297 ISSN: 1074-5521 page 808, column 1, line 26 -column 2, line 33 figure 2 page 815, column 2, line 35 - line 56	1,2,6-8, 10,11
X	EP 0 391 714 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 10 October 1990 (1990-10-10) claims 17,21 --- -/--	13

☒ 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***&*** document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 June 2002

Date of mailing of the international search report

31/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 01/02584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 16834 A (COLLINGE JOHN ;IMPERIAL COLLEGE (GB)) 23 Apr 11 1998 (1998-04-23) claim 11	13
X	WO 97 16728 A (UNIV CALIFORNIA) 9 May 1997 (1997-05-09) page 28, line 30 -page 29, line 6; claims 14,21,27,29	15
X	US 5 616 871 A (KENNEY JAMES W) 1 April 1997 (1997-04-01) figure 1	21
P,X	WO 01 00235 A (CAPRION PHARMACEUTICALS INC ;UNIV MCGILL (CA); CASHMAN NEIL R (CA)) 4 January 2001 (2001-01-04) claim 66	13
E	WO 01 46714 A (MISONIX INC) 28 June 2001 (2001-06-28) the whole document	21
A	SABORIO GABRIELA P ET AL: "Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 258, no. 2, 10 May 1999 (1999-05-10), pages 470-475, XP002156200 ISSN: 0006-291X the whole document	1-22
A	BESSEN R A ET AL: "Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein 'see comments!.' NATURE, (1995 JUN 22) 375 (6533) 698-700., XP002156201 the whole document	1-22
A	KOCISKO D A ET AL: "Partial unfolding and refolding of scrapie-associated prion protein: evidence for a critical 16-kDa C-terminal domain." BIOCHEMISTRY, (1996 OCT 15) 35 (41) 13434-42., XP002156202 the whole document	1-22
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 01/02584

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOCISKO DAVID A ET AL: "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." NATURE (LONDON), vol. 370, no. 6489, 1994, pages 471-474, XP002156203 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	1-22
A	COHEN FRED E ET AL: "Pathologic conformations of prion proteins." ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY, vol. 67, 1998, pages 793-819, XP000974751 1998 Annual Reviews Inc. P.O. Box 10139, 4139 El Camino Way, Palo Alto, California 94306, USA ISBN: 0-8243-0867-0 cited in the application the whole document	1-22
A	AGUZZI A ET AL: "PRION RESEARCH;THE NEXT FRONTIERS" NATURE,GB,MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 389, 23 October 1997 (1997-10-23), pages 795-798, XP000198867 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-22
T	INIGUEZ VOLGA ET AL: "Strain-specific propagation of PrPSc properties into baculovirus-expressed hamster PrPC." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 81, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 2565-2571, XP002156205 ISSN: 0022-1317 the whole document	1-22
T	SABORIO GABRIELA P ET AL: "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding." NATURE (LONDON), vol. 411, no. 6839, 2001, pages 810-813, XP002201227 ISSN: 0028-0836	1-22

-/--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	DATABASE MEDLINE 'Online! November 2001 (2001-11) MERLINI G ET AL: "Protein aggregation." Database accession no. NLM11831622 XP002203445 abstract & CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE: CCLM / FESCC. GERMANY NOV 2001, vol. 39, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 1065-1075, ISSN: 1434-6621	1-14,16
A	DATABASE MEDLINE 'Online! July 2000 (2000-07) GREGERSEN N ET AL: "Defective folding and rapid degradation of mutant proteins is a common disease mechanism in genetic disorders." Database accession no. NLM10947197 XP002203446 abstract & JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE. NETHERLANDS JUL 2000, vol. 23, no. 5, July 2000 (2000-07), pages 441-447, ISSN: 0141-8955.	1-14,16
A	SERPELL L C ET AL: "Direct visualisation of the beta-sheet structure of synthetic Alzheimer's amyloid." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY. ENGLAND 26 MAY 2000, vol. 299, no. 1, 26 May 2000 (2000-05-26), pages 225-231, XP002203442 ISSN: 0022-2836 the whole document	19
A	SOTO C: "Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches." JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (BERLIN, GERMANY) GERMANY MAY 1999, vol. 77, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 412-418, XP002203443 ISSN: 0946-2716 the whole document	19
-/-		

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	DUMERY L ET AL: "beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease." PATHOLOGIE-BIOLOGIE. FRANCE FEB 2001, vol. 49, no. 1, February 2001 (2001-02), pages 72-85, XP002203444 ISSN: 0369-8114 the whole document	19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 01/02584

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.: 18 and 20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Diagnostic method practised on the human or animal body
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 dependant 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:

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 01/02584

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0391714	A	10-10-1990	US 5262332 A	16-11-1993
			AU 633312 B2	28-01-1993
			AU 5292290 A	11-10-1990
			CA 2013396 A1	05-10-1990
			EP 0391714 A2	10-10-1990
			JP 2291965 A	03-12-1990
			NZ 233109 A	23-12-1992
			JP 3206958 A	10-09-1991
WO 9816834	A	23-04-1998	AU 4711597 A	11-05-1998
			DE 934531 T1	06-04-2000
			EP 0934531 A1	11-08-1999
			ES 2134749 T1	16-10-1999
			GB 2355074 A	11-04-2001
			WO 9816834 A1	23-04-1998
			GB 2333362 A ,B	21-07-1999
			JP 2001503141 T	06-03-2001
			NZ 335290 A	31-08-2001
			GB 2354946 A ,B	11-04-2001
WO 9716728	A	09-05-1997	US 5750361 A	12-05-1998
			AU 715659 B2	10-02-2000
			AU 7601296 A	22-05-1997
			BR 9611428 A	24-10-2000
			EP 1007964 A1	14-06-2000
			JP 2000500439 T	18-01-2000
			WO 9716728 A1	09-05-1997
US 5616871	A	01-04-1997	NONE	
WO 0100235	A	04-01-2001	AU 5778400 A	31-01-2001
			EP 1210110 A1	05-06-2002
			WO 0100235 A1	04-01-2001
WO 0146714	A	28-06-2001	WO 0146714 A1	28-06-2001

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 89.75803	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/GB01/02584	International filing date (day/month/year) 13/06/2001	Priority date (day/month/year) 07/07/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N33/68		
Applicant APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V. et al.		
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 3 sheets.		
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☐ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 31/01/2002	Date of completion of this report 21.11.2002	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel +31 70 340 - 2040 Tlx 31 651 epo nl Fax +31 70 340 - 3016	Authorized officer Gunster, M Telephone No. +31 70 340 4412 	

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/GB01/02584

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17):*
Description, pages:

1-35 as originally filed

Claims, No.:

1-7 as originally filed

8-20 as received on 14/10/2002 with letter of 14/10/2002

Drawings, sheets:

1/14-14/14 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/GB01/02584

- ☐ the description, pages:
☒ the claims, Nos.: 21,22
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, Inventive step and Industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
☒ claims Nos. 17 and 19.

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 17 and 19 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
see separate sheet
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 17 and 19.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, Inventive step or Industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/GB01/02584

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-13,16,18,20
	No:	Claims	14,15
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	3,4,12,13,16,18,20
	No:	Claims	1,2,5-11,14,15
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-16,18,20
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/GB01/02584

Re Item III

Claims 17 and 19 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT in the sense that it concerns diagnostic methods. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item V

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 97 16728 A (UNIV CALIFORNIA) 9 May 1997,
- D2: CAUGHEY ET AL: 'Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state.' CHEMISTRY & BIOLOGY (1995), vol. 2, pg. 807-817.

NOVELTY

The subject-matter of claims 1-13, 16, 18 and 20 is new in the sense of Article 33(2) PCT as it not known in the prior art.

The subject-matter of claim 14 and 15 is not new in the sense of Article 33(2) PCT. Document D1 (claims 27 and 29) discloses a method for identifying a compound which modulates the conformational transition of a prion protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer comprising:

- (i) contacting an amount of PrP^c (non-pathogenic conformer) protein with an amount of a peptide causing the PrP^c protein to undergo conformational changes (such as the pathogenic conformer PrP^{Sc}) in the presence of a test compound;
- (ii) performing protease K digestion;
- (iii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i) by SDS-page electrophoresis (page 28, line 30 - page 29, line 6); and
- (iv) determining the effect of the test compound on preventing the conformational changes.

Step (iv) of this method implies that the amount of pathogenic conformer in the presence and in the absence of said test compound is determined and therefore anticipates the subject-matter of claim 14 and 15. For this reason, the subject-matter of claim 14 and 15 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

INVENTIVE STEP

The subject-matter of claims 3, 4, 12, 13, 16, 18 and 20 involves an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT as it is not suggested or derivable from the prior art.

The subject-matter of claims 1, 2, 5-11, 14 and 15 is not inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

Document D2, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses (page 815, column 2, lines 35-56) a method of cell-free conversion of PrP^{Sc} by bringing it in contact with PrP^{Sc}, disaggregating the any aggregates formed by proteinase-K digestion and SDS page, followed by determining the amount of PrP^{Sc} in the sample.

The subject-matter of claim 1 differs from the method of document D2 in that the method is useful for detecting a conformational disease.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of an in vitro conversion method that is useful for detecting a conformational disease.

The solution proposed in claim 1 of the present application cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) because it does not solve the problem posed. The problem is not solved because in the method of claim 1 the number of converting units remains fixed, which is the cause of a low efficiency of the method which is therefore not useful for diagnosis (see page 4, lines 20-25 of the description). Thus, it appears that the feature, which is essential for carrying out the invention, repetition of the cycle comprising steps (ia) and (ii) is missing in claims 1,2,5-11,14 and 15, which results in a lack of inventive step of the subject-matter of these claims.

INTERNATIONAL PRELIMINARY

International application No. PCT/GB01/02584

EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET

INDUSTRIAL APPLICABILITY

The subject-matter of claims 1-16, 18 and 20 is industrially applicable in the field of detecting pathogenic conformers.

8. The method of any one of the preceding claims, wherein the sample to be analysed is subjected to a pre-treatment for selectively concentrating the pathogenic conformer in the sample.

9. The method of claim 8, wherein the pathogenic conformer is PrPSc and the pre-treatment is the extraction from the sample of a fraction which is insoluble in mild detergents.

10. An assay for a marker of a conformational disease which is characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, within a sample, which assay comprises the following steps:

- (i) contacting said sample with an amount of the non-pathogenic conformer;
- (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i); and
- (iii) determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the sample, the pathogenic conformer being a marker for the presence of said disease.

11. The assay of claim 10, wherein step (i) comprises step (ia) incubating said sample/non-pathogenic conformer.

12. The assay according to claim 11, wherein steps (ia) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii).

13. A diagnostic kit for use in the assay of any one of claims 10 to 12 which comprises a known amount of the non-pathogenic conformer, a multi-well microtitre plate and a multi-well sonicator.

14. A method for identifying a compound which modulates the conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, comprising:

- (i) contacting an amount of the non-pathogenic conformer with an amount of the pathogenic conformer (a) in the presence of said compound and (b) in the absence of said compound;
- (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i); and

(iii) determining the amount of the pathogenic conformer (a) in the presence of said compound and (b) in the absence of said compound.

15. The method of any one of claims 1 to 9 or 14 or the assay of any one of claims 10 to 12, wherein the pathogenic conformer is PrP^* , the non-pathogenic conformer is PrP^C and the underlying protein is the Prion Protein.

16. A method for detecting the presence of a pathogenic form of prion protein within a sample, comprising:

- (i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic prion protein;
- (ia) incubating the sample/non-pathogenic prion protein;
- (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of pathogenic prion protein within the sample.

17. A method for diagnosing CJD within a patient, comprising: taking a sample from the patient;

- (i) contacting the sample with an amount of PrP^C protein;
- (ia) incubating the sample/ PrP^C protein;
- (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of PrP^{Sc} within the sample.

18. A method for detecting the presence of a pathogenic form of β -amyloid protein within a sample, comprising:

- (i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic β -amyloid protein;
- (ia) incubating the sample/non-pathogenic β -amyloid protein;
- (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of pathogenic β -amyloid protein within the sample.

19. A method for diagnosing Alzheimer's disease in a patient, comprising:
taking a sample from the patient;
(i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic β -amyloid protein;
(ia) incubating the sample/non-pathogenic β -amyloid protein;
(ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
(iii) determining the presence and/or amount of pathogenic β -amyloid protein within the sample.
20. Apparatus for use in the method of any one of claims 1 to 9 or 14 or the assay of any one of claims 10 to 12, comprising a microtitre plate, multi-well sonicator and an amount of a non-pathogenic conformer.

EARLY DIAGNOSIS OF CONFORMATIONAL DISEASES

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to a method for the diagnosis or detection of conformational diseases by assaying for a marker (i.e. the pathogenic conformer) of such diseases within a sample, which method comprises a cyclic amplification system to increase the levels of the pathogenic conformer. In particular, such conformational diseases may be prion encephalopathies.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Conformational diseases are a group of disorders apparently unrelated to each other, but sharing a striking similarity in clinical presentations that reflect their shared molecular mechanisms of initiation and self-association, with consequent tissue deposition and damage.

15 The structural interest is due to the fact that these varied diseases each arise from an aberrant conformational transition in an underlying protein, characteristically leading to protein aggregation and tissue deposition. Medically, the presentation of these conformational diseases reflects this molecular mechanism, with typically a slow and insidious onset when the transition is occurring in a normal protein, but a more sudden onset when it occurs in an unstable variant of the protein. Two examples of special significance of such conformational diseases are the Transmissible Spongiform Encephalopathies and Alzheimer dementia, a disease that threatens to overwhelm health care systems in the developed world (for a review see Carrell et al., 1997).

25 Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) also known as prion diseases are a group of neurodegenerative diseases that affect humans and animals. Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), kuru, Gerstmann-Straussler-Scheiker disease (GSS) and fatal familial insomnia (FFI) in humans as well as scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE) in animals are some of the TSE diseases (Prusiner, 1991).

Although these diseases are relatively rare in humans, the risk for the transmissibility of BSE to humans through the chain food has taken the attention of the public health authorities and the scientific community (Cousens et al., 1997, Bruce et al., 1997).

These diseases are characterized by an extremely long incubation period, followed
5 by a brief and invariably fatal clinical disease (Roos et al., 1973). To date no therapy is available.

The key characteristic of the disease is the formation of an abnormally shaped protein named PrP^{Sc}, which is a post-translationally modified version of a normal protein, termed PrP^C (Cohen and Prusiner, 1998). Chemical differences have not been detected to
10 distinguish between PrP isoforms (Stahl et al., 1993) and the conversion seems to involve a conformational change whereby the α -helical content of the normal protein diminishes and the amount of β -sheet increases (Pan et al., 1993). The structural changes are followed by alterations in the biochemical properties: PrP^C is soluble in non-denaturing detergents, PrP^{Sc} is insoluble; PrP^C is readily digested by proteases, while PrP^{Sc} is partially resistant, resulting
15 in the formation of a N-terminally truncated fragment known as "PrPres" (Baldwin et al., 1995; Cohen and Prusiner, 1998), "PrP 27-30" (27-30 kDa) or "PK-resistant" (proteinase K resistant) form.

At present there is not an accurate diagnosis for TSE (WHO Report, 1998, Budka et al., 1995, Weber et al., 1997). Attempts to develop a diagnostic test for prion diseases are
20 hampered by the apparent lack of an immune response to PrP^{Sc}. The clinical diagnosis of CJD is currently based upon the combination of subacute progressive dementia (less than 2 years), myoclonus, and multifocal neurological dysfunction, associated with a characteristic periodic electroencephalogram (EEG) (WHO Report, 1998, Weber et al., 1997). However, variant CJD (vCJD), most of the iatrogenic forms of CJD and up to 40% of the sporadic
25 cases do not have the EEG abnormalities (Steinhoff et al., 1996). On average the accuracy of clinical diagnosis is around 60% for CJD and highly variable for other prion-related diseases. The clinical diagnosis is more accurate only at the late-stage of the disease when clear symptoms have developed (Weber et al., 1997).

Genetic analysis is useful for the diagnosis of inherited prion diseases, but these
30 represent only 15% of the cases. Neuroimaging is useful only to exclude other conditions of

rapidly progressive dementia due to structural lesions of the brain (Weber et al., 1997). The findings obtained by imaging of the brain by computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) depend mainly on the stage of the disease. CT is much less sensitive and in early phase no atrophy is detected in 80% of the cases (Galvez and Cartier, 1983). MRI hyperintense signals have been detected in the basal ganglia besides atrophy (Onofrji et al., 1993). Like the changes observed by CT, these alterations are by no means specific.

Recent data have identified several neuronal, astrocytic and glial proteins that are elevated in CJD (Jimi et al., 1992). The protein S-100, neuron specific isoenzyme and ubiquitin are significantly increased in the cerebrospinal fluid (CSF) in the early phase of disease with decreasing concentrations over the course of the illness (Jimi et al., 1992). A marker of neuronal death, the 14-3-3 protein, has been proposed as a specific and sensitive test for sporadic CJD (Hsich et al., 1996). However, it is not useful for the diagnosis of vCJD, and much less specific in the genetic forms. As the 14-3-3 protein may be present in the CSF of patients with other conditions, the test is not recommended by WHO as a general screening for CJD and is reserved to confirm the clinical diagnosis (WHO Report, 1998).

By combining clinical data with the biochemical markers a higher success in the diagnosis is achieved. However, according to the operational diagnosis currently in use in the European Surveillance of CJD, definitive diagnosis is established only by neuropathological examination and detection of PrP^{Sc} either by immunohistochemistry, histoblot or western blot (Weber et al., 1997, Budka et al., 1995).

Formation of PrP^{Sc} is not only the most likely cause of the disease, but it is also the best known marker. Detection of PrP^{Sc} in tissues and cells correlates widely with the disease and with the presence of TSE infectivity, and treatments that inactivate or eliminate TSE infectivity also eliminate PrP^{Sc} (Prusiner, 1991). The identification of PrP^{Sc} in human or animal tissues is considered key for TSE diagnosis (WHO Report, 1998). One important limitation to this approach is the sensitivity, since the amounts of PrP^{Sc} are high (enough for detection with conventional methods) only in the CNS at the late stages of the disease. However, it has been demonstrated that at earlier stages of the disease there is a generalized distribution of PrP^{Sc} (in low amounts), especially in the lymphoreticular system (Aguzzi,

1997). Indeed, the presence of PrP^{Sc} has been reported in palatine tonsillar tissue and appendix obtained from patients with vCJD (Hill et al., 1997). Although it is not known how early in the disease course tonsillar or appendix biopsy could be used in vCJD diagnosis, it has been shown that in sheep genetically susceptible to scrapie, PrP^{Sc} could be
5 detected in tonsillar tissue presymptomatically and early in the incubation period. However, PrP^{Sc} has not been detected in these tissues so far in any cases of sporadic CJD or GSS (Kawashima et al., 1997).

The normal protein is expressed in white blood cells and platelets and therefore it is possible that some blood cells may contain PrP^{Sc} in affected individuals (Aguzzi, 1997). This
10 raises the possibility of a blood test for CJD, but this would require an assay with a much greater degree of sensitivity than those currently available.

Prion replication is hypothesized to occur when PrP^{Sc} in the infecting inoculum interacts specifically with host PrP^C, catalyzing its conversion to the pathogenic form of the protein (Cohen et al., 1994). This process takes from many months to years to reach a
15 concentration of PrP^{Sc} enough to trigger the clinical symptoms.

The infective unit of PrP^{Sc} seems to be a β -sheet rich oligomeric structure, which converts the normal protein by integrating it into the growing aggregate (Figure 1). The conversion has been mimicked *in vitro* by mixing purified PrP^C with a 50-fold molar excess of previously denatured PrP^{Sc} (Kocisko et al., 1994).

20 The *in vitro* conversion systems described so far have low efficiency, since they require an excess of PrP^{Sc} and therefore are not useful for diagnostic purposes because they cannot monitor undetectable amounts of the marker. The reason for the low efficiency is that the number of PrP^{Sc} oligomers (converting units) remains fixed throughout the course of the assay. The converting units grow sequentially by the ends and as a result they become
25 larger, but do not increase in number (Figure 1).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

We have now found a method for the diagnosis or detection of a conformational
30 disease, wherein the disease is characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, by assaying a marker of said disease within a sample, which method comprises:

- (i) contacting said sample with an amount of the non-pathogenic conformer;
- (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i); and
- (iii) determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the sample.

5 Generally, the pathogenic conformer will be the marker for the presence of the said disease.

Preferably, step (i) comprises step (ia) incubating said sample/non-pathogenic conformer.

10 According to a preferred embodiment of the invention, steps (ia) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii). More preferably, the cycles are repeated from 5 to 40 times, and most preferably 5-20 times.

The conformational diseases to be detected or diagnosed are those that are characterised by a conformational transition of an underlying protein. This "underlying protein" is a protein which is capable of adopting a non-pathogenic conformation and a pathogenic conformation. One example of such a protein is the prion protein, PrP. A further example of such a protein is the protein involved in Alzheimer's disease, i.e. the β -amyloid protein.

The conformational diseases to be diagnosed or detected are preferably transmissible conformational diseases, such as TSE (as defined in the Background section).

20 In the case of diagnosis of TSE and according to a preferred embodiment of the invention, the marker of the disease as well as the pathogenic conformer is PrP^{Sc}, whereas the non-pathogenic conformer of the protein of interest is PrP^C.

The amount of the non-pathogenic conformer that is used in step (i) (and optionally in step (ib)) will generally be a known amount, although this need not be the case if one merely wishes to establish the presence or absence of the pathogenic conformer.

25 Preferably, the amount of non-pathogenic conformer that is used in step (i) (and optionally in step (ib)) will be an excess amount. Generally, the initial ratio of non-pathogenic conformer to pathogenic conformer (if present in the sample) will be greater than 100:1, preferably greater than 1000:1 and most preferably greater than 1000000:1.

In a further preferred embodiment of the invention, the non-pathogenic conformer in step (i) is present in a brain homogenate of a healthy subject and/or may be added to it, before carrying out step (i); in this case, therefore, the brain homogenate containing a (preferably known) excess of the non-pathogenic conformer is added during step (i).
5 Preferably, the brain homogenate of the healthy subject comes from the same species from which the sample to be analyzed comes (e.g. human brain homogenate for human sample to be analyzed, rat brain homogenate from rat sample to be analyzed). More preferably, the non-pathogenic conformer is present in a specific fraction of the brain homogenate, for example in the lipid-rafts from brain homogenate. The preparation of such fractions can be
10 carried out for example as described in Sargiacomo M et al., 1993.

Thus the invention further relates to a method or assay as described herein wherein a tissue or tissue fraction is added to the non-pathogenic conformer in step (i). Preferably, the tissue is brain tissue, or a homogenate or fraction derived therefrom, from a healthy subject (i.e. one where the pathogenic conformer is not present).

15 It has been reported (Kocisko et al., 1994) that less glycosylated forms of PrP^C are preferentially converted to the PrP^{Sc} form. In particular, PrP^C which was treated with phosphatidylinositol specific phospholipase C was routinely more efficiently converted to the pathogenic form than the complete, more heavily glycosylated PrP^C. A further embodiment of the invention therefore relates to a method or assay as herein described
20 wherein the non-pathogenic conformer is PrP^C which has a reduced level of glycosylation (in particular N-linked glycosylation) in comparison with the wild-type PrP^C. Preferably, the PrP^C has been treated to remove some, all or a significant amount of the glycosylation prior to its use as the non-pathogenic conformer in the methods and assays described herein; and more preferably, the non-pathogenic conformer is PrP^C which is essentially unglycosylated.

25 In the case of diagnosis of TSE, if aggregates of the pathogenic form are present within the sample, during step (i) they will induce the PrP^C → PrP^{Sc} transition and during step (ii) such aggregates will be broken down into smaller still infective units, each of which is still capable of inducing the conversion of other PrP^C. This kind of method is herein called "cyclic amplification" and is represented in Figure 2. This system results in an
30 exponential increase in the amount of PrP^{Sc} eventually present in the sample that can easily

be detected. According to a further preferred embodiment of the invention, it is therefore possible to calculate the amount of PrP^{Sc} initially present in the sample starting from the known amount of PrP^C, determining the amount of PrP^{Sc} present within the sample at the end of the assay and considering the number of cycles performed.

5 If, on the contrary, no PrP^{Sc} (either as such or in the form of aggregates) is present in the sample, no PrP^C molecule will be converted into PrP^{Sc} and at the end of the assay the marker will be completely absent (no pathogenic conformer detected in the sample).

It has been shown that the infective unit of PrP^{Sc} is a β -sheet rich oligomer, which can convert the normal protein by integrating it into the growing aggregate, where it
10 acquires the properties associated with the abnormal form (protease resistance and insolubility) (Jarrett and Lansbury, Jr., 1993, Caughey et al., 1997). After incubation of the two forms of PrP, the oligomeric species increases its size by recruiting and transforming PrP^C molecules. This process has low efficiency, since it depends on a fixed number of oligomers growing by the ends. The number of converting units is not increased in the
15 course of the reaction when they only become larger. It is assumed that this process is what happens in the animal or human body after infection; a process known to take months or even several years. In this invention we describe a procedure to break down the oligomers to a smaller ones, each of which is then capable of converting PrP^C.

Therefore, the system has direct applications to the diagnosis of conformational
20 diseases, and in particular transmissible conformational diseases, such as TSE by amplifying otherwise undetectable amounts of PrP^{Sc} in different tissues or biological fluids. The system may allow the early identification of people at risk of developing TSE and could also be very useful to follow biochemically the efficacy of TSE therapeutic compounds during clinical trials.

25 According to a preferred embodiment of the invention the sample to be analysed is subjected to a "pre-treatment" step, which has the purpose of "selectively concentrating" in the sample the pathogenic conformer that is to be detected. In the case of TSE both PrP^C and PrP^{Sc} have been reported to be located in a special region of the plasma membrane which is resistant to mild detergent treatment (such as ice-cold Triton X-100) due to the
30 relatively high content of cholesterol and glycosphingolipids (M. Vey et al., 1996). These membrane domains are named lipid-rafts or detergent-resistant membranes (DRM) or

caveolae-like domains (CLDs) and are rich in signaling proteins, receptors and GPI-anchored proteins. We have confirmed that 100% of PrP^C in brain is attached to this fraction, which contains <2% of the total proteins (see Example 6 and Figure 7). Thus, the simple step of lipid-raft isolation from the sample allows a dramatic enrichment in PrP^C.

5 Similar results were obtained by the Applicant in the isolation of lipid-rafts from scrapie brain homogenate, in which PrP^{Sc} was recovered in the rafts.

Thus one embodiment of the invention includes a step wherein the sample to be analysed is subjected to a pre-treatment step for selectively concentrating the pathogenic conformer in the sample. Preferably, the pathogenic conformer is PrP^{Sc} and the
10 pretreatment is the extraction from the sample of a fraction which is insoluble in mild detergents.

Steps (i) and (ia) are preferably performed under physiological conditions (pH, temperature and ionic strength) and, more preferably, protease inhibitors and detergents are also added to the solution. The conditions will be chosen so as to allow any pathogenic
15 conformer, if present in the sample, to convert the non-pathogenic conformer into pathogenic conformer thus forming an aggregate or oligomer of pathogenic conformers. Appropriate physiological conditions will readily be apparent to those skilled in the art.

The length of the incubation will be for a time which will allow some, all or a significant portion of the non-pathogenic conformer to be converted to pathogenic
20 conformer, assuming that the sample contains some pathogenic conformer. The time will readily be determinable by those skilled in the art. Preferably, each incubation will be between 1 minute to 4 hours, most preferably 30 minutes to 1 hour, and particularly preferably approximately 60 minutes.

Incubation step (ia) may also comprise the further step (ib) which comprises the
25 addition of a further amount of non-pathogenic conformer.

Various methods can be used for disaggregating the aggregates during step (ii) of the method of the present invention. They include: treatment with solvents (such as sodium dodecyl sulfate, dimethylsulfoxide, acetonitrile, guanidine, urea, trifluoroethanol, diluted trifluoroacetic acid, diluted formic acid, etc.), modification of the chemical-physical
30 characteristics of the solution such as pH, temperature, ionic strength, dielectric constant, and physical methods, such as sonication, laser irradiation, freezing/thawing, French press,

autoclave incubation, high pressure, stirring, mild homogenization, other kinds of irradiation, etc. Sonication is the preferred method according to the invention

Disaggregation may be carried out for a time which disaggregates some, all or a significant portion of the aggregates which have formed during step (ii). It is not necessary
5 for all of the aggregates to be disaggregated in any one disaggregation step. In this way, the number of converting units is increased in each disaggregation step.

The disaggregation time will readily be determinable by those skilled in the art and it may depend on the method of disaggregation used. Preferably, disaggregation is carried out for 1 second to 60 minutes, most preferably 5 seconds to 30 minutes and particularly
10 preferably, 5 seconds to 10 minutes. If disaggregation is carried out by sonication, sonication is preferably for 5 seconds to 5 minutes, and most preferably for 5 to 30 seconds.

Sonication has been used in the past as part of several methods to purify PrP with the goal of increasing solubility of large aggregates, but it has never been described to
15 amplify *in vitro* conversion of PrP.

The use of a traditional single-probe sonicator imposes a problem for handling many samples simultaneously, such as a diagnostic test will require. There are on the market some 96-well format microplate sonicators, which provide sonication to all the wells at the same time and can be programmed for automatic operation. These sonicators can be easily
20 adapted to be used in the diagnostic method of the present invention.

Thus one embodiment of the invention relates to the use, in step (ii), of a multi-well sonicator.

The detection of the newly converted pathogenic conformer, e.g. PrP^{Sc}, (iii) after the cyclic amplification procedure described in steps (i) to (ii) could be carried out according to
25 any of the known methods. Specific detection of PrP^{Sc} is usually (but not always, see below) done by a first step of separation of the two PrP isoforms (normal protein and pathogenic protein). Separation is done on the basis of the peculiar biochemical properties of PrP^{Sc} that distinguish it from most of the normal proteins of the body, namely: PrP^{Sc} is partially resistant to protease treatment and is insoluble even in the presence of non-denaturant
30 detergents. Therefore the first step after the amplification procedure is usually the removal or separation of PrP^C in the sample, either by treatment with proteases or by centrifugation

to separate the soluble (PrP^{C}) from the insoluble (PrP^{Sc}) protein. Thereafter, detection of PrP^{Sc} can be done by any of the following methods, *inter alia*:

5 A) Immunoblotting after SDS-PAGE. This is done through a routine procedure well known for those with skill in the art and using some of the many commercially available anti- PrP antibodies.

10 B) Elisa assay. Solid phase detection can be done by either a simple assay in which the sample is loaded on the plate and the amount of PrP^{Sc} detected afterwards by using anti- PrP antibodies or more preferably by using sandwich Elisa in which the plate is first coated with an anti- PrP antibody, that captures specifically PrP from the sample, which is finally detected by using a second anti- PrP antibody. Both forms of Elisa can also be used with labelled (radioactivity, fluorescence, biotin, etc) anti- PrP antibodies to further increase the sensitivity of the detection.

15 C) Radioactivity assays. Normal PrP^{C} used as a substrate for the amplification procedure can be radioactively labelled (^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , etc) before starting the procedure and after the removal of the non-converted PrP^{C} , radioactivity of newly converted PrP^{Sc} could be quantitated. This procedure is more quantitative and does not rely on the use of antibodies.

20 D) Fluorescence assays. Normal PrP^{C} used as a substrate for the amplification procedure can be labelled with fluorescent probes before starting the procedure and after the removal of non-converted PrP^{C} , fluorescence of the newly converted PrP^{Sc} could be quantitated. It is possible that the fluorescence assay might not require the removal of non-converted PrP^{C} , because the fluorescence properties of PrP^{C} and PrP^{Sc} might be different due to the distinct conformation of the two isoforms.

25 E) Aggregation assays. It is well known that PrP^{Sc} (and not PrP^{C}) is able to aggregate forming amyloid fibrils or rod-type structures. Therefore detection of PrP^{Sc} could be done by using the methods used to quantify the formation of these type of aggregates, including electron microscopy, staining with specific dyes (Congo red, Thioflavin S and T, etc), and turbidimetric assays. Aggregation assays do not require the step of separation of the two isoforms, because it is known that normal PrP^{C} does not aggregate.

30 F) Structural assays. The most important difference between the normal and the pathogenic PrP is their secondary and tertiary structures. Therefore, methods that allow the

structural evaluation of proteins can be used, including NMR, Circular dichroism, Fourier-transformed infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, intrinsic fluorescence, UV absorption, etc.

5 The most widely used PrP monoclonal antibody is "3F4" (Kascsak et al., 1987), which is a monoclonal antibody derived from a mouse immunized with hamster 263K PrPres (the protease-resistant conformer). This antibody is also able to recognize the non-pathogenic conformer from hamsters and humans, but not from bovine, mouse, rat, sheep or rabbit brains; it is also able to bind the human pathogenic conformer, but only after denaturation of the protein.

10 Such antibodies may be labeled to allow easy detection of the marker. For example time-resolved fluorescence measurements with europium-labeled 3F4 antibody has been used by some scientists (Safar et al., 1998).

The above-described methods of detection may be used for the detection of other pathogenic conformers, for example the pathogenic form of β -amyloid protein, *mutatis*
15 *mutandis*.

In an alternative embodiment the non-pathogenic conformer added in excess may be labeled and detectable so that the amount of the non-aggregated conformer at the end of the assay will allow a determination of the amount of pathogenic conformer initially present in the sample.

20 According to a further alternative embodiment, the pathogenic conformer (the marker) could be directly detected with an antibody directed against it.

In broader terms a label or labeling moiety may be added to the pathogenic conformer, to the non-pathogenic conformer or to an antibody against one of the conformers depending on the kind of assay that is performed.

25 Another object of the invention is an assay for a marker of a conformational disease which is characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, within a sample, which assay comprises the following steps: (i) contacting said sample with an amount of the non-pathogenic conformer, (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i) and (iii)

determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the sample. In general, the pathogenic conformer will be the marker for the presence of said disease.

Preferably, step (i) comprises step (ia) incubating said sample/non-pathogenic conformer.

5 According to a preferred embodiment of the invention, steps (ia) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii). More preferably, the cycles are repeated from 5 to 40 times, and most preferably 5 to 20 times.

A further object of the present invention is a diagnostic kit for use in the assay specified, which comprises an amount of the non-pathogenic conformer, and optionally
10 additionally a micro-titre plate and a multi-well sonicator.

Using the method of the invention, it is possible to detect 1 to 10fg of pathogenic conformer initially present in a sample, which is equivalent to 3 to 30 x 10⁻²⁰ moles.

The sample will generally be a biological sample or tissue, and any such biological sample or tissue can be assayed with the method of the present invention. In the case of a
15 tissue, the assay and method of the present invention may be carried out on homogenates or directly on *ex vivo* samples. The methods and assays will generally be carried out on *ex vivo* or *in vitro* samples. Preferably, the sample is a biological fluid, such as blood, lymph, urine or milk; brain tissue, spinal cord, tonsillar tissue or appendix tissue; a sample derived from blood such as blood cell ghosts or buffy coat preparations; or a plasma membrane
20 preparation such as lipid-rafts, detergent resistant membranes or caveolae-like domains. The sample might alternatively be a composition comprising a compound (particularly a protein) derived from a human or animal source, such as growth hormone, or a tissue extract, such as pituitary extract. Such a sample composition might be contaminated with a pathogenic conformer.

25 The sample might also comprise a food product or drink, or a portion of a food product or drink (either destined for human consumption or animal consumption) in order to establish the presence or absence of pathogenic conformer in that product or drink.

Preferably, the non-pathogenic conformer added in step (i) will be from the same species as the sample. It may, for example, be derived from a healthy (i.e. non-pathogenic)
30 form (e.g. tissue) of the biological sample to be tested. Alternatively, the non-pathogenic conformer may be produced synthetically or recombinantly, using means known in the art.

It will be understood, however, that the non-pathogenic conformer need not be in pure or even substantially pure form. In most cases, the non-pathogenic conformer will be in the form of a tissue homogenate or a fraction thereof which contains the relevant non-pathogenic conformer. Preferred examples include brain homogenates and fractions
5 derived therefrom, e.g. lipid rafts.

Preferably, the sample and/or the non-pathogenic conformer will be of human origin or from a domestic animal, e.g. a cow, sheep, goat or cat.

Another object of the present invention is to provide a method for identifying a compound which modulates the conformational transition of an underlying protein
10 between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, comprising:

- (i) contacting an amount of the non-pathogenic conformer with an amount of the pathogenic conformer in the presence and in the absence of said compound,
- (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i),
- (iii) determining the amount of the pathogenic conformer in the presence and in the
15 absence of said compound.

If desired, step (i) may comprise step (ia) incubating said sample/non-pathogenic conformer, and a cycle carried out between steps (ia) and (ii) as described above for the methods and assays of the invention, *mutatis mutandis*.

If the amount of pathogenic conformer measured in the presence of the compound
20 is higher than that measured in the absence, it means that the compound is a factor which "catalyzes" the conformational transition; if such amount is lower, it means that the compound is a factor which inhibits such transition.

According to the above method, "identifying" should also be interpreted to mean "screening" of a series of compounds.

25 A "label" or "labelling moiety" may be any compound employed as a means for detecting a protein. The label or labelling moiety may be attached to the protein via ionic or covalent interactions, hydrogen bonding, electrostatic interactions or intercalation. Examples of labels and labelling moieties include, but are not limited to fluorescent dye conjugates, biotin, digoxigenin, radionucleotides, chemiluminescent substances, enzymes
30 and receptors, such that detection of the labelled protein is by fluorescence, conjugation to

streptavidin and/or avidin, quantitation of radioactivity or chemiluminescence, catalytic and/or ligand-receptor interactions. Preferably it is a fluorescent or a phosphorescent label.

The term "conformational diseases" refers to that group of disorders arising from a propagation of an aberrant conformational transition of an underlying protein, leading to protein aggregation and tissue deposition. Such diseases can also be transmitted by an induced conformational change, propagated from a pathogenic conformer to its normal or non-pathogenic conformer and in this case they are called herein "transmissible conformational diseases". Examples of such kinds of diseases are the prion encephalopathies, including the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its human equivalent Creutzfeldt-Jakob (CJD) disease, in which the underlying protein is the PrP.

The term "sporadic CJD" abbreviated as "sCJD" refers to the most common manifestation of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD). This disease occurs spontaneously in individuals with a mean age of approximately 60 at a rate of 1 per million per year individuals across the earth.

The term "Iatrogenic CJD" abbreviated as "iCJD" refers to disease resulting from accidental infection of people with human prions. The most noted example of such is the accidental infection of children with human prions from contaminated preparations of human growth hormone.

The term "Familial CJD" refers to a form of CJD, which occurs rarely in families and is inevitably caused by mutations of the human prion protein gene. The disease results from an autosomal dominant disorder. Family members who inherit the mutations succumb to CJD.

The term "Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease" abbreviated as "GSS" refers to a form of inherited human prion disease. The disease occurs from an autosomal dominant disorder. Family members who inherit the mutant gene succumb to GSS.

The term "prion" shall mean a transmissible particle known to cause a group of such transmissible conformational diseases (spongiform encephalopathies) in humans and animals. The term "prion" is a contraction of the words "protein" and "infection" and the particles are comprised largely if not exclusively of PrP^{Sc} molecules.

Prions are distinct from bacteria, viruses and viroids. Known prions include those which infect animals to cause scrapie, a transmissible, degenerative disease of the nervous

system of sheep and goats as well as bovine spongiform encephalopathies (BSE) or mad cow disease and feline spongiform encephalopathies of cats. Four prion diseases known to affect humans are (1) kuru, (2) Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD), (3) Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease (GSS), and (4) fatal familial insomnia (FFI). As used herein prion
5 includes all forms of prions causing all or any of these diseases or others in any animals used and in particular in humans and in domesticated farm animals.

The terms "PrP gene" and "prion protein gene" are used interchangeably herein to describe genetic material which expresses the prion proteins and polymorphisms and mutations such as those listed herein under the subheading "Pathogenic Mutations and
10 Polymorphisms." The PrP gene can be from any animal including the "host" and "test" animals described herein and any and all polymorphisms and mutations thereof, it being recognized that the terms include other such PrP genes that are yet to be discovered.

The term "PrP gene" refers generally to any gene of any species which encodes any form of a PrP amino acid sequences including any prion protein. Some commonly known
15 PrP sequences are described in Gabriel et al., 1992, which is incorporated herein by reference to disclose and describe such sequences.

Abbreviations used herein include:

CNS for central nervous system;

BSE for bovine spongiform encephalopathy;

20 CJD for Creutzfeldt-Jakob Disease;

FFI for fatal familial insomnia;

GSS for Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease;

PrP for prion protein;

PrP^C for the normal, non-pathogenic conformer of PrP;

25 PrP^S for the pathogenic or "scrapie" isoform of PrP (which is also the marker for prion diseases).

Pathogenic mutations and Polymorphisms

There are a number of known pathogenic mutations in the human PrP gene. Further, there are known polymorphisms in the human, sheep and bovine PrP genes.

30 The following is a non-limiting list of such mutations and polymorphisms:

MUTATION TABLE

Pathogenic human mutations	Human polymorphisms	Sheep polymorphisms	Bovine polymorphisms
2 octarepeat insert	Codon 129	Codon 171	5 or 6 octarepeats
4 octarepeat insert	Met/Val	Arg/Glu	
5 octarepeat insert	Codon 219	Codon 136	
6 octarepeat insert	Glu/Lys	Ala/Val	
7 octarepeat insert			
8 octarepeat insert			
9 octarepeat Insert			
Codon 102 Pro-Leu			
Codon 105 Pro-Leu			
Codon 117 Ala-Val			
Codon 145 Stop			
Codon 178 Asp-Asn			
Codon 180 Val-Ile			
Codon 198 Phe-Ser			
Codon 200 Glu-Lys			
Codon 210 Val-Ile			
Codon 217 Asn-Arg			
Codon 232 Met-Ala			

The normal amino acid sequence, which occurs in the vast majority of individuals, is referred to as the wild-type PrP sequence. This wild-type sequence is subject to certain characteristic polymorphic variations. In the case of human PrP, two polymorphic amino acids occur at residues 129 (Met/Val) and 219 (Glu/Lys). Sheep PrP has two amino acid polymorphisms at residues 171 and 136, while bovine PrP has either five or six repeats of an eight amino acid motif sequence in the amino terminal region of the mature prion protein. While none of these polymorphisms are of themselves pathogenic, they appear to influence prion diseases. Distinct from these normal variations of the wild-type prion

proteins, certain mutations of the human PrP gene which alter either specific amino acid residues of PrP or the number of octarepeats have been identified which segregate with inherited human prion diseases.

In order to provide further meaning to the above chart demonstrating the mutations and polymorphisms, one can refer to the published sequences of PrP genes. For example, a chicken, bovine, sheep, rat and mouse PrP gene are disclosed and published within Gabriel et al., 1992. The sequence for the Syrian hamster is published in Baslet et al 1986. The PrP gene of sheep is published by Goldmann et al., 1990. The PrP gene sequence for bovine is published in Goldmann et al., 1991. The sequence for chicken PrP gene is published in Harris et al., 1991. The PrP gene sequence for mink is published in Kretzschmar et al., 1992. The human PrP gene sequence is published in Kretzschmar et al., 1986. The PrP gene sequence for mouse is published in Lochr et al., 1986. The PrP gene sequence for sheep is published in Westaway et al., 1994. These publications are all incorporated herein by reference to disclose and describe the PrP gene and PrP amino acid sequence.

The invention also provides a method for detecting the presence of a pathogenic form of prion protein within a sample (preferably a blood or brain sample) comprising:

- (i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic prion protein;
- (ia) incubating the sample/non-pathogenic prion protein;
- (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of pathogenic prion protein within the sample.

A further embodiment of the invention provides a method for diagnosing CJD within a patient, comprising: taking a sample from the patient (preferably a blood or brain sample);

- (i) contacting the sample with an amount of PrP^C protein;
- (ia) incubating the sample/PrP^C protein;
- (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of PrP^{Sc} within the sample.

The invention also provides a method for detecting the presence of a pathogenic form of β -amyloid protein within a sample (preferably a blood or brain sample), comprising:

(i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic β -amyloid protein;

5 (ia) incubating the sample/non-pathogenic β -amyloid protein;

(ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);

repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then

(iii) determining the presence and/or amount of pathogenic β -amyloid protein within the sample.

10 A further embodiment of the invention provides a method for diagnosing Alzheimer's disease in a patient, comprising:

taking a sample (preferably a blood or brain sample) from the patient;

(i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic β -amyloid protein;

(ia) incubating the sample/non-pathogenic β -amyloid protein;

15 (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);

repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then

(iii) determining the presence and/or amount of pathogenic β -amyloid protein within the sample.

20 The invention furthermore provides apparatus for use in the methods described above, particularly apparatus comprising a microtitre plate, multi-well sonicator and an amount of a non-pathogenic conformer.

A further embodiment of the invention provides a method for the diagnostic detection of a conformational disease, characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, by assaying a
25 marker of said disease within a sample, which method comprises (i) contacting said sample with a known amount of the non-pathogenic conformer, (ii) disaggregating the aggregates eventually formed during step (i) and (iii) determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the sample. Preferably, steps (i) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii), most preferably steps (i) and (ii) form a
30 cycle, which is repeated from 5 to 40 times before carrying out step (iii).

The invention also provides an assay for a marker of a conformational disease, characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, within a sample, which assay comprises the following steps: (i) contacting said sample with a known amount of the non-pathogenic conformer, (ii) disaggregating the aggregates eventually formed during step (i) and (iii) determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the sample. Preferably, the steps (i) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii).

The invention further provides a method for identifying a compound which modulates the conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, comprising:

- (i) contacting a known amount of the non-pathogenic conformer with a known amount of the pathogenic conformer in the presence and in the absence of said compound,
- (ii) disaggregating the aggregates eventually formed during step (i),
- (iii) determining the amount of the pathogenic conformer in the presence and in the absence of said compound.

The present invention has been described with reference to the specific embodiments, but the content of the description comprises all modifications and substitutions, which can be brought by a person skilled in the art without extending beyond the meaning and purpose of the claims.

The invention will now be described by means of the following Examples, which should not be construed as in any way limiting the present invention. The Examples will refer to the Figures specified here below.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Schematic representation of the conversion $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$. The infective unit of PrP^{Sc} is a β -sheet rich oligomer, which converts PrP^{C} by integrating it into the growing aggregate, where it acquires the properties associated with PrP^{Sc} .

Figure 2. Diagrammatic representation of the cyclic amplification procedure. The system is based on cycles of incubation of PrP^{Sc} in the presence of excess of PrP^{C} followed by cycles of sonication. During the incubation periods, oligomeric PrP^{Sc} is enlarged by incorporating PrP^{C} into the growing aggregate, while during sonication the aggregates are broken down with the aim of multiplying the converting units. In the figure, two cycles of sonication/incubation are shown.

Figure 3. Amplification of PrP^{Sc} by sonication cycles. A small amount of scrapie brain homogenate containing PrP^{Sc} was incubated with healthy rat brain homogenate (lane 1, control experiment) or with healthy hamster brain homogenate (lane 2 and 3). The latter sample was divided in two groups one of which was subjected to five cycles of incubation/sonication (lane 3). Half of the above samples were loaded directly in a gel and stained for total protein with Coomassie (panel A). The other half were treated with PK and immunoblotted using the anti-PrP antibody 3F4 (panel B). Panel C shows some controls in which healthy brain homogenate was incubated alone (lanes 1 and 2) or in the presence of diluted scrapie brain homogenate (lanes 3 and 4). Half of the samples (lanes 2 and 4) were subjected to 5 cycles of sonication/incubation. Lanes 2, 3 and 4 were treated with proteinase K.

Figure 4. Sensitivity of the cyclic amplification system. The minimum concentration of PrP^{Sc} that can be used for detection after amplification was studied by serially diluting the scrapie brain homogenate and incubating with healthy hamster brain homogenate with or without sonication cycles. Panel A shows the control experiment in which scrapie hamster brain was diluted serially in rat brain homogenate. Panel B corresponds to the experiment in which the serial dilutions of scrapie hamster brain were incubated with healthy hamster

brain and subjected to 5 cycles of incubation/sonication. Densitometric evaluation of the immunoblots in A and B is shown in panel C. The dilutions were done considering as starting material the brain and were the following: 100 (lane 1), 200 (lane 2), 400 (lane 3), 800 (lane 4), 1600 (lane 5) and 3200 (lane 6).

Figure 5. Relationship between the PrPres signal and the number of amplification cycles. Diluted scrapie brain homogenate was incubated with an excess of healthy hamster brain homogenate. Samples were subjected to 0, 5, 10, 20 or 40 cycles and the PrPres signal evaluated by immunoblot.

Figure 6. Amplification of PrP^{Sc} in blood samples. Heparinized rat blood was spiked with Scrapie hamster brain homogenate to reach a final dilution of 10:1. This mixture was incubated for 15 min at RT. 10 fold serial dilutions were made of this material using heparinized rat blood. Samples were subjected to 11 cycles of incubation-sonication and the PrPres signal evaluated by immunoblot.

Figure 7: Prion protein is present in lipid-rafts. Lipid-rafts (also called detergent-resistant membrane fraction or DRM) were isolated using a modification of previously described protocols. One-hundred mg of brain tissue was homogenized in 1 ml of PBS containing 1% triton X-100 and 1x complete cocktail of protease inhibitors (Boehringer). Tissue was homogenized with 10 passages through 22G syringe needle and incubated for 30 minutes at 4°C on a rotary shaker. The sample was diluted 1:2 in sucrose 60% and placed in the bottom of a centrifuge tube. 7ml of sucrose 35% were placed carefully over the sample. 1.5ml of sucrose 15% was layered in the top of the gradient. The tube was centrifuged at 150,000g for 18hrs at 4°C. The lipid rafts float to the 15%-35% sucrose interface (panel A). Different fractions were collected and analyzed by total protein staining with silver nitrate (panel B) and immunoblot to detect PrP (panel C). To remove sucrose from the sample, lipid raft fraction was recovered washed in PBS and centrifuged at 28,000 rpm during 1hr at 4°C. The pellet was washed and resuspended in PBS containing 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS and protease inhibitors. All PrPC was located in this fraction (panel D).

Figure 8: The factors needed for amplification are present in lipid-rafts. Lipid-rafts were isolated from healthy hamster brain as describe in Figure 2 and mixed with 700-fold diluted PrPSc highly purified from scrapie hamster brain. Samples were either frozen (line 3) or amplified for 20h (line 4). Lines 1 and 2 represent the same procedures but using total brain homogenate for amplification.

Figure 9: Presymptomatic detection of PrPSc in hamster brain. Hamsters were inoculated intra-cerebrally (i.c.) with saline (control group) or with 100-fold diluted scrapie brain homogenate. Every week 4 hamsters per group were sacrificed and brains were extracted and homogenized. Half of the samples were frozen immediately (white bars) and the other half subjected to 20 cycles of incubation/sonication (black bars). All samples were treated with PK and immunoblotted. The intensity of the bands was evaluated by densitometry. Each bar represent the average of samples from 4 animals. No detection was observed in any of the control brains either without or with amplification and these results are not shown in the Figure.

Figure 10: Amplification of human PrPSc. The studies were done using brain samples of 11 different confirmed cases of sporadic CJD, as well as 5 from familial CJD and 4 age-matched controls, which included patients affected by other neurological disorders. Brain was homogenized and subjected to 20 amplification samples. Representative results of a control (A) and three different sporadic CJD (B) cases (1, 2, 3) are shown in the Figure.

Figure 11: Detection of PrPSc in blood after preparation of blood cells ghosts. Cell ghosts from 0.5 ml of heparinized blood coming from healthy (C) and scrapie-affected hamsters (Sc) were prepared as described in the text. Half of the samples were not subjected to amplification and the other half were mixed with normal hamster brain homogenate and subjected to 20 amplification cycles. All samples were then treated with PK and analyzed by immunoblots. One representative experiment is shown in the Figure.

Figure 12: Detection of PrPSc in blood after sarkosyl extraction. 0.5 ml of heparinized blood coming from healthy (C) and scrapie-affected hamsters (Sc) was subjected to sarkosyl

extraction as described in the text. Half of the samples were not subjected to amplification and the other half were mixed with normal hamster brain homogenate and subjected to 20 amplification cycles. All samples were then treated with PK and analyzed by immunoblots. One representative sample of control animals and two for scrapie-affected animals is shown in the Figure.

Figure 13: Detection of PrP^{Sc} in blood after lipid rafts purification. Lipid-rafts were extracted as described in the text from 0.5 ml of heparinized blood coming from healthy (C) and scrapie-affected hamsters (Sc). Half of the samples were not subjected to amplification and the other half were mixed with normal hamster brain homogenate and subjected to 20 amplification cycles. All samples were then treated with PK and analyzed by immunoblots. One representative sample of control animals and two for scrapie-affected animals is shown in the Figure.

Figure 14: Detection of PrP^{Sc} in blood after preparation of buffy coats. The buffy coat fraction of blood was separated by centrifugation from 0.5 ml of heparinized blood coming from healthy (C) and scrapie-affected hamsters (Sc). Half of the samples were not subjected to amplification and the other half were mixed with normal hamster brain homogenate and subjected to 20 amplification cycles. All samples were then treated with PK and analyzed by immunoblots. One representative experiment is shown in the Figure.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Amplification of PK resistant PrP by cyclic in vitro conversion.

Hamster brain homogenate extracted from scrapie affected animals was diluted until the signal of PrP^{Sc} was barely detected by immunoblot after treatment with proteinase K (PK) (Figure 3B, lane 1). PK treatment is done routinely in the field to distinguish between the normal and abnormal forms of PrP, which differ in their sensitivity to protease degradation (PrP^{Sc} is partially resistant and PrP^C is degraded) (Prusiner, 1991). The form of

PrP that is resistant to PK treatment will be named from now on PrPres. Incubation of a sample of diluted scrapie brain homogenate with a healthy hamster brain homogenate containing an excess of PrP^C, resulted in the increase in PrPres signal (Figure 3B, lane 2).

5 This suggests that the incubation of the two brain homogenates resulted in the conversion of PrP^C to PrP^{Sc}. When the samples were incubated under the same conditions but subjected to five cycles of incubation/sonication, the amount of PrPres was dramatically increased (Figure 3B, lane 3). Densitometric analysis of the immunoblot indicates that the PrPres signal was increased 84-fold by cyclic amplification in comparison with the PrPres signal presented in the diluted scrapie brain homogenate (lane 1).

10 The conversion is dependent of the presence of PrP^{Sc} since no PrPres was observed when the normal hamster brain homogenate was incubated alone under the same conditions either with or without sonication (Figure 3C, lane 2). To rule out artifacts of the transfer, the total protein loaded in the gel was maintained constant (Figure 3A) by adding rat brain homogenate to the diluted scrapie sample, taking advantage of the fact that rat PrP
15 is not detected by the antibody used for the immunoblot.

EXAMPLE 2

Sensitivity of detection by cyclic amplification.

To evaluate the minimum concentration of PrP^{Sc} that can be used for detection
20 after amplification, the scrapie brain homogenate was serially diluted directly in healthy hamster brain homogenate. Without incubation, the signal of PrPres diminishes progressively until it was completely undetectable at 800-fold dilution (Figure 4A,C). In contrast when the same dilution was incubated with healthy hamster brain homogenate and subjected to 5 cycles of incubation/sonication, the limit of PrPres detection was decreased
25 dramatically. Indeed, clear signal was easily detected even at a 3200-fold dilution (Figure 4B,C).

EXAMPLE 3

Exponential increase in PrPres with number of cycles

30 To study whether the intensity of the PrPres signal after cyclic amplification depends on the number of cycles of incubation/sonication performed, diluted scrapie brain

homogenate was incubated with an excess of healthy hamster brain homogenate. Samples were subjected to 0, 5, 10, 20 or 40 cycles and the PrPres signal evaluated by immunoblot. The levels of PrPres increased exponentially with the number of incubation/sonication cycles (Figure 5). This result suggests that increasing the number of cycles could further diminish detection limits.

EXAMPLE 4

Sonication experiments in blood samples by spiking with PrP^{Sc}

Heparinized rat blood was spiked with Scrapie hamster brain homogenate to reach a final dilution of 10:1. This mixture was incubated for 15 min at RT.

10 fold serial dilutions were made of this material using heparinized rat blood. 50 µl of each dilution were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Plasma was separated from the pellet. 10 µl of plasma were mixed in 50 µl of healthy hamster brain homogenate containing the PrP^C substrate for the conversion reaction. Samples were subjected to 11 cycles of incubation-sonication. As a control same samples were mixed in 50 µl of healthy hamster brain homogenate and kept at -20°C until needed. 15 µl of sonicated and control samples were digested with proteinase K, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting and PrP^{Sc} was detected as disclosed in the "Methods" section.

The results are reported in Figure 6. These results show a clear increase in the detection of the protein after the amplification procedure, which is especially evident at the lower concentration of PrP^{Sc} (for example at the 1280 dilution). If we compare such results with those obtained on infected brain tissues, we have the confirmation that the amplification process works similarly in blood.

EXAMPLE 5

High throughput cyclic amplification

The use of a single-probe traditional sonicator imposes a problem for handling many samples simultaneously, as a diagnostic test will require. We have adapted the cyclic amplification system to a 96-well format microplate sonicator (Misonix 431MP- 20kHz), which provides sonication to all of the wells at the same time and can be programmed for

automatic operation. This improvement not only decreases processing time, but also prevents loss of material when compared to using a single probe. Cross contamination is eliminated since there is no direct probe intrusion into the sample. The latter is essential to handle infectious samples and minimize false positive results. Twenty cycles of 1h incubation followed by sonication pulses of 15 sec or 30 sec gave a significant amplification of PrPres signal, similar to that previously observed using a traditional sonicator.

EXAMPLE 6

The factors necessary for amplification are in a detergent-resistant membrane fraction

The subcellular location where the PrP conversion occurs during the disease pathogenesis is not yet ascertained. However, both PrP^C and PrP^{Sc} have been reported to be located in a special region of the plasma membrane which is resistant to mild detergent treatment due to the relatively high content of cholesterol and glycosphingolipids (Vey et al., 1996; Harmey et al., 1995). These membrane domains are named lipid-rafts or detergent-resistant membranes (DRM) and are rich in signaling proteins, receptors and GPI-anchored proteins. We have confirmed that 100% of PrP^C in brain is attached to this fraction, which contains <2% of the total proteins (Figure 7). Thus, the simple step of lipid-raft isolation allows a dramatic enrichment in PrP^C. Similar results were obtained in the isolation of lipid-rafts from scrapie brain homogenate, in which PrP^{Sc} was recovered in the rafts.

To evaluate whether the factors needed to amplify PrP are contained in lipid-rafts, we purified them from the brain of healthy animals and added minute quantities of highly pure PrP^{Sc} extracted from the brain of sick animals. Amplification in lipid-rafts was equivalent to that obtained with total brain extract (Figure 8), since the amount of PrPres produced after amplification was similar in both conditions. This result indicates that all elements required for PrP conversion and amplification (including the so-called "Factor X"; (Telling et al., 1995)) are contained in this specialized membrane domain. Therefore, identification and isolation of the factors needed for PrP conversion should be possible by further separation of proteins from the lipid-rafts and monitoring their activity by cyclic amplification. In addition, lipid-rafts constitute a possible replacement for the use of total

brain homogenate in the cyclic amplification procedure as a source of PrP^C substrate and other endogenous factors implicated in the conversion.

EXAMPLE 7

5 Pre-symptomatic diagnosis in experimental animals

To study the pre-symptomatic diagnosis of hamsters experimentally infected with scrapie, we screened 88 brain samples at different stages during the preclinical phase, half of which were non-infected controls. Brain was taken every week (4 per each group) and subjected to 20 cycles of amplification. The results showed that the method is able to detect
10 the abnormal protein in the brain even at the second week after inoculation, far before the animals develop any symptoms (Figure 9). Without cyclic amplification, PrP^{Sc} was detected in the brain at week six post-infection, only 4 weeks before the appearance of the clinical disease. No amplification was detected in any of the control animals that were not infected with scrapie.

15

EXAMPLE 8

Application of cyclic amplification to human brain samples

To analyze the application of the cyclic amplification procedure to human samples from brain of people (cadavers) affected by Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), we incubated
20 brain homogenates of several CJD patients (or normal controls) with healthy human brain homogenate and carried out the cyclic amplification procedure. The results show that there was significant amplification in samples of sporadic CJD brain analyzed and in none of the 4 control samples (Figure 10). Interestingly, amplification was obtained only in the samples that had shown to be infectious and thus able to convert non-mutated PrP^C, while it did not
25 work when the mutant protein is not capable to convert the wild type protein. These data support the conclusion that the method works in human samples similarly as shown before for animal samples.

EXAMPLE 9**Diagnosis in blood by cyclic amplification**

Infectivity studies suggested that at least in experimental animals PrP^{Sc} is present in blood in late-stage animals (Brown et al., 2001). In order to perform the blood detection of PrP^{Sc} by cyclic amplification, we preferred first to selectively concentrate the sample in the protein to be detected and to eliminate the bulk of very abundant blood proteins, such as albumin or hemoglobin. The following four different protocols have been shown effective for this purpose.

10 1. Preparation of blood cells ghosts

Heparinized hamster blood was centrifuged at 2,500 rpm at 4°C. The plasma and cellular fraction were separated and frozen at -80°C until needed. 0.5 ml of blood cell package was washed 3 times in 12-15 vol of fresh cold PBS, pH 7.6. The cells were resuspended in 12-15 vol of 20 mOsM sodium phosphate buffer pH 7.6 and stirred gently for 20 min on ice, then centrifuged at 30,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded, the pellet was washed 3 times in 20 mOsM sodium phosphate buffer. The final pellet was resuspended in PBS containing 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS and protease inhibitors. 15 µl of this suspension was mixed v/v with 10% healthy hamster brain homogenate and subjected to 20 cycles of incubation-sonication. 20 µl of sonicated and control samples were digested with proteinase K, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting and PrP^{Sc} was detected as disclosed in the "Methods" section. The results show the detection of the PrP^{Sc} after the amplification procedure in the blood samples from infected animals (Figure 11). In the blood samples from non-infected animals there is no signal after amplification. Without amplification is not possible to detect the presence of PrP^{Sc} (Figure 11).

2. Sarkosyl extraction

Heparinized hamster blood was centrifuged at 2,500 rpm at 4°C. 0.5 ml of blood cell package was diluted (v/v) in 20% sarkosyl and incubated for 30 minutes. The sample was centrifuged in Beckman TL100 ultracentrifuged at 85,000 rpm for 2 hrs at 4°C. The

pellet was washed and resuspended in PBS containing 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS and protease inhibitors. 15 µl of this suspension was mixed v/v with 10% healthy hamster brain homogenate and subjected to 20 cycles of incubation-sonication. 20 µl of sonicated and control samples were digested with proteinase K, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting and PrP^{Sc} was detected as disclosed in the "Methods" section. The results show the detection of the PrP^{Sc} after the amplification procedure in the blood samples from infected animals (Figure 12). In the blood samples from non-infected animals there is no signal after amplification. Without amplification is not possible to detect the presence of PrP^{Sc} (Figure 12).

3. Lipid raft extraction

Heparinized hamster blood was centrifuged at 2,500 rpm at 4°C. 0.5 ml of blood cell package was diluted (v/v) in PBS with 1% TritonX-100 and incubated for 30 minutes at 4°C. The sample was diluted 1:2 in sucrose 60% and placed in the bottom of a centrifuge tube. 7 ml of sucrose 35% were placed carefully over the sample. 1.5 ml of sucrose 15% was layered in the top of the gradient. The tube was centrifuged at 150,000 rpm for 18 hrs at 4°C. The lipid rafts were recovered washed in PBS and centrifuged at 28,000 rpm during 1hr at 4°C. The pellet was washed and resuspended in PBS containing 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS and protease inhibitors. 15 µl of this suspension was mixed v/v with 10% healthy hamster brain homogenate and subjected to 20 cycles of incubation-sonication. 20 µl of sonicated and control samples were digested with proteinase K, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting and PrP^{Sc} was detected as disclosed in the "Methods" section. The results show the detection of the PrP^{Sc} after the amplification procedure in the blood samples from infected animals (Figure 13). In the blood samples from non-infected animals there is no signal after amplification. Without amplification is not possible to detect the presence of PrP^{Sc} (Figure 13).

4. Buffy coat preparation.

Heparinized hamster blood was centrifuged at 1,500 rpm at 4°C for 10 min. The buffy coat was carefully recovered using standard procedures and kept at -80°C until

needed. The frozen buffy coat was resuspended in PBS containing 0.5% Triton X-100, 0.5% SDS and protease inhibitors. 15 μ l of this suspension was mixed v/v with 10% healthy hamster brain homogenate and subjected to 20 cycles of incubation-sonication. 20 μ l of sonicated and control samples were digested with proteinase K, separated by SDS-PAGE and analyzed by western blotting and PrP^{Sc} was detected as disclosed in the "Methods" section. The results show the detection of the PrP^{Sc} after the amplification procedure in the blood samples from infected animals (Figure 14). In the blood samples from non-infected animals there is no signal after amplification. Without amplification is not possible to detect the presence of PrP^{Sc} (Figure 14).

METHODS

Preparation of brain homogenates.

Brains from Syrian golden hamsters healthy or infected with the adapted scrapie strain 263 K were obtained after decapitation and immediately frozen in dry ice and kept at -80°C until used. Brains were homogenized in PBS and protease inhibitors (w/v) 10%. Detergents (0.5% Triton X-100, 0.05% SDS) were added and clarified with low speed centrifugation (10,000rpm) for 1 min.

Preparation of the samples and cyclic amplification.

Serial dilutions of the scrapie brain homogenate were made directly in the healthy brain homogenate. 30 μ l of these dilutions were incubated at 37°C with agitation. Each hour a cycle of sonication (5 pulses of 1 sec each) was done using a microsonicator with the needle immersed in the sample. These cycles were repeated several times (5-20).

PrP^{Sc} detection.

The samples were digested with PK 100 μ g/mL for 90 min at 37°C. The reaction was stopped with PMSF 50mM. Samples were separated by SDS-PAGE (under denaturing conditions) and electroblotted into nitrocellulose membrane in CAPS or tris-glycine transfer buffer with 10% methanol during 45 min at 400mA. Reversible total protein staining was

performed before blocking of the membrane with 5% non-fat milk. Thereafter, the membrane was incubated for 2hr with the monoclonal antibody 3F4 (1:50,000). Four washes of 5 min each were performed with PBS, 0.3% Tween20 before the incubation with the horseradish peroxidase labelled secondary anti-mouse antibody (1:5000) for 1hr. After
5 washing, the reactivity in the membrane was developed with ECL chemiluminescence Kit (Amersham) according to manufacturer's instructions.

REFERENCES

- Aguzzi, A. (1997). Neuro-immune connection in the spread of prions in the body? *Lancet* 349, 742-744.
- Baldwin, M.A., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1995). Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations. *J. Biol. Chem.* 270, 19197-19200.
- Baslet et al., *Cell* 46:417-428 (1986)
- Brown, P., Cervenakova, L., and Diringer, H. (2001). Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Lab. Clin. Invest.* 137, 5-13.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., and Sutcliffe, A. (1997). Transmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498-501.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J.M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J.J., Ironside, J.W., Jellinger, K., Kretzschmar, H.A., Lantos, P.L., Masullo, C., Schlote, W., Tateishi, J., and Weller, R.O. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (Prion diseases). *Brain Pathol.* 5, 459-466.
- Carrell, R.W., Lomas, D.A. (1997). Conformational diseases. *Lancet*, 350, 134-138.
- Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A., and Lansbury, P.T., Jr. (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.* 71, 4107-4110.
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J., and Prusiner, S.B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* 264, 530-531.

- Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 793-819.
- Cousens, S.N., Vynnycky, E., Zeidler, M., Will, R.G., and Smith, R.G. (1997). Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 385, 197-198.
- 5 Gabriel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9097-9101 (1992)
- Galvez, S. and Cartier, L. (1983). Computed tomography findings in 15 cases of Creutzfeldt-Jakob disease with histological verification. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47, 1244.
- Goldmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2476-2480 (1990).
- Goldmann et al., *J. Gen. Virol.* 72:201-204 (1991).
- 10 Harney, J.H., Doyle, D., Brown, V., and Rogers, M.S. (1995). The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 753-759.
- Harris et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7664-7668 (1991).
- Hill, A.F., Zeidler, M., Ironside, J.W., and Collinge, J. (1997). Diagnosis of new variant
- 15 Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99-100.
- Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C.J., Jr., Lee, K.H., and Harrington, M.G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Eng. J. Med.* 335, 924.
- Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of
- 20 amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.
- Jimi, T., Wakayama, Y., Shibuya, S., and et al (1992). High levels of nervous system specific protein in the cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Chim. Acta* 211, 37.

Kawashima, T., Furukawa, H., Doh-ura, K., and Iwaki, T. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 350, 68-69.

Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H, (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated
5 fibril proteins. *J. Virol.*, 61, 3688-3693.

Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474.

Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T., Jr., and Caughey, B.
10 (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3923-3927.

Kretzschmar et al., *DNA* 5:315-324 (1986).

Kretzschmar et al., *J. Gen. Virol.* 73:2757-2761 (1992).

Locht et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6377-6376 (1986).

15 Onofrii, M., Fulgente, T., Gambi, D., and Macchi, G. (1993). Early MRI findings in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol.* 240, 423.

Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., and Prusiner, S.B. (1993). Conversion of alpha-helices into β -sheets features in the formation
of scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90, 10962-10966.

20 Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.

Roos, R., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J., Jr. (1973). The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 96, 1-20.

Saborio, G.P., Soto, C., Kascsak, R.J., Levy, E., Kascsak, R., Harris, D.A., and Frangione, B. (1999). Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 470-475.

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB, (1998).

5 Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157-1165.

Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. (1993), Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells, *J Cell Biol.* Aug;122(4):789-807

10

Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochem.* 32, 1991-2002.

Steinhoff, B.J., Racker, S., Herrendorf, G., and et al (1996). Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 53, 162

15

Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.

20

Martin Vey et al (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14945-9

Weber, T., Otto, M., Bodemer, M., and Zerr, I. (1997). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and related human spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.* 51, 381-387.

Westaway et al., *Genes Dev.* 8:959-969 (1994).

WHO/EMC/ZDI/98.9, Global Surveillance, Diagnosis and Therapy of Human

25

Transmissible Spongiform Encephalopathies: Report of a WHO Consultation, Geneva, Switzerland 9-11 February 1998, WHO.

CLAIMS

1. A method for the diagnosis or detection of a conformational disease which is characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, by assaying a marker of said disease within a sample, which method comprises:
 - (i) contacting said sample with an amount of the non-pathogenic conformer;
 - (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i); and
 - (iii) determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the sample, the pathogenic conformer being a marker for the presence of said disease.
2. The method of claim 1, wherein step (i) comprises step (ia) incubating said sample/non-pathogenic conformer.
3. The method of claim 2, wherein steps (ia) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii).
4. The method of claim 3, wherein the cycle is repeated from 5 to 40 times before carrying out step (iii).
5. The method of any one of the preceding claims, wherein step (i) is carried out under physiological conditions.
6. The method of any one of the preceding claims wherein the amount of the non-pathogenic conformer in step (i) is an excess amount.
7. The method of any one of the preceding claims, wherein the conformational disease is a transmissible conformational disease.

8. The method of any one of the preceding claims, wherein the sample to be analysed is subjected to a pre-treatment for selectively concentrating the pathogenic conformer in the sample.

5 9. The method of claim 8, wherein the pathogenic conformer is PrPSc and the pre-treatment is the extraction from the sample of a fraction which is insoluble in mild detergents.

10 10. An assay for a marker of a conformational disease which is characterized by a conformational transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, within a sample, which assay comprises the following steps:

(i) contacting said sample with an amount of the non-pathogenic conformer;
(ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i); and
(iii) determining the presence and/or amount of said pathogenic conformer within the
15 sample, the pathogenic conformer being a marker for the presence of said disease.

11. The assay of claim 10, wherein step (i) comprises step (ia) incubating said sample/non-pathogenic conformer.

20 12. The assay according to claim 11, wherein steps (ia) and (ii) form a cycle which is repeated at least twice before carrying out step (iii).

13. A diagnostic kit for use in the assay of any one of claims 10 to 12 which comprises a known amount of the non-pathogenic conformer.

25

14. A diagnostic kit as claimed in claim 13, which additionally comprises a multi-well microtitre plate and a multi-well sonicator.

15. A method for identifying a compound which modulates the conformational
30 transition of an underlying protein between a non-pathogenic and a pathogenic conformer, comprising:

- (i) contacting an amount of the non-pathogenic conformer with an amount of the pathogenic conformer (a) in the presence of said compound and (b) in the absence of said compound;
- (ii) disaggregating any aggregates eventually formed during step (i); and
- 5 (iii) determining the amount of the pathogenic conformer (a) in the presence of said compound and (b) in the absence of said compound.

16. The method of any one of claims 1 to 9 or 15 or the assay of any one of claims 10 to 12, wherein the pathogenic conformer is PrP^{Sc}, the non-pathogenic conformer is PrP^C and the underlying protein is the Prion Protein.

17. A method for detecting the presence of a pathogenic form of prion protein within a sample, comprising:

- (i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic prion protein;
- 15 (ia) incubating the sample/non-pathogenic prion protein;
- (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of pathogenic prion protein within the sample.

20

18. A method for diagnosing CJD within a patient, comprising:
taking a sample from the patient;

- (i) contacting the sample with an amount of PrP^C protein;
- (ia) incubating the sample/PrP^C protein;
- 25 (ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
- repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
- (iii) determining the presence and/or amount of PrP^{Sc} within the sample.

19. A method for detecting the presence of a pathogenic form of β -amyloid protein
30 within a sample, comprising:

- (i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic β -amyloid protein;
(ia) incubating the sample/non-pathogenic β -amyloid protein;
(ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
5 (iii) determining the presence and/or amount of pathogenic β -amyloid protein within the sample.

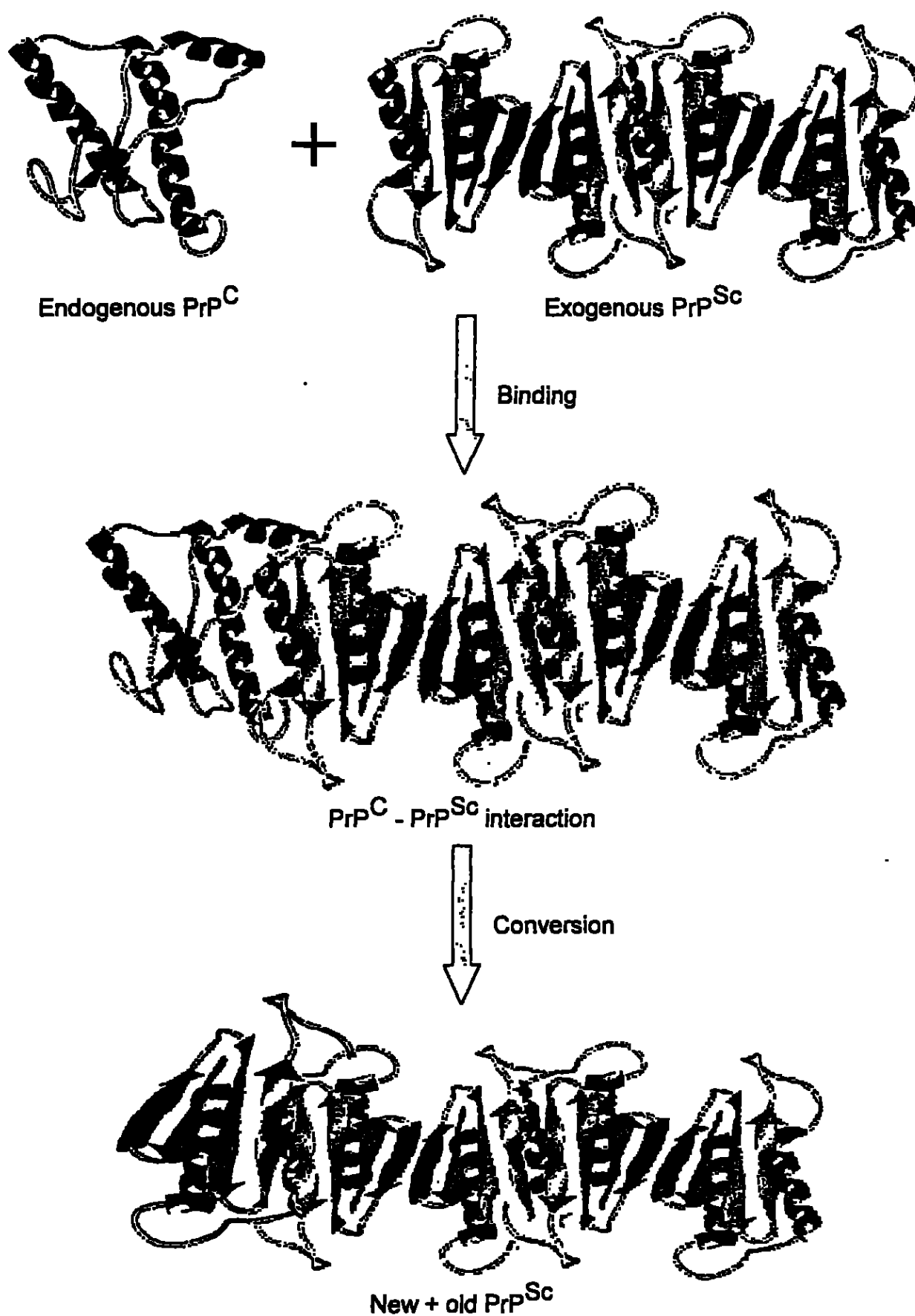
20. A method for diagnosing Alzheimer's disease in a patient, comprising:
taking a sample from the patient;
10 (i) contacting the sample with an amount of non-pathogenic β -amyloid protein;
(ia) incubating the sample/non-pathogenic β -amyloid protein;
(ii) disaggregating any aggregates formed during step (ia);
repeating steps (ia)-(ii) two or more times; and then
(iii) determining the presence and/or amount of pathogenic β -amyloid protein within the
15 sample.

21. Apparatus for use in the method of any one of claims 1 to 9 or 15 or the assay of any one of claims 10 to 12.

- 20 22. Apparatus for use in the method of any one of claims 1 to 9 or 15 or the assay of any one of claims 10 to 12, comprising a microtitre plate, multi-well sonicator and an amount of a non-pathogenic conformer.

1 / 13

FIG. 1

Schematic representation of PrP^C → PrP^{Sc} conversion

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

92/

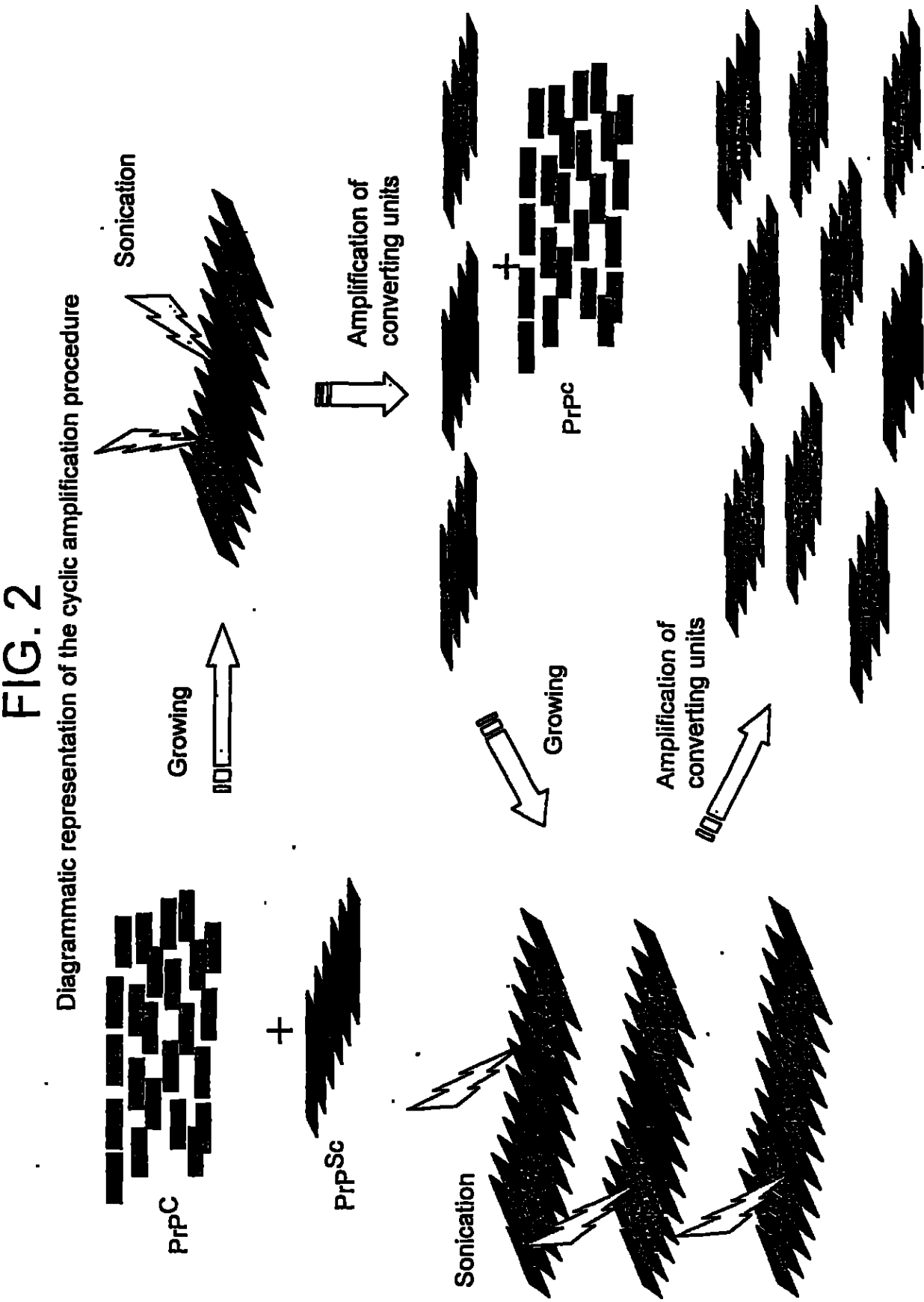


FIG. 3
Amplification of PrP^{Sc} by sonication cycles

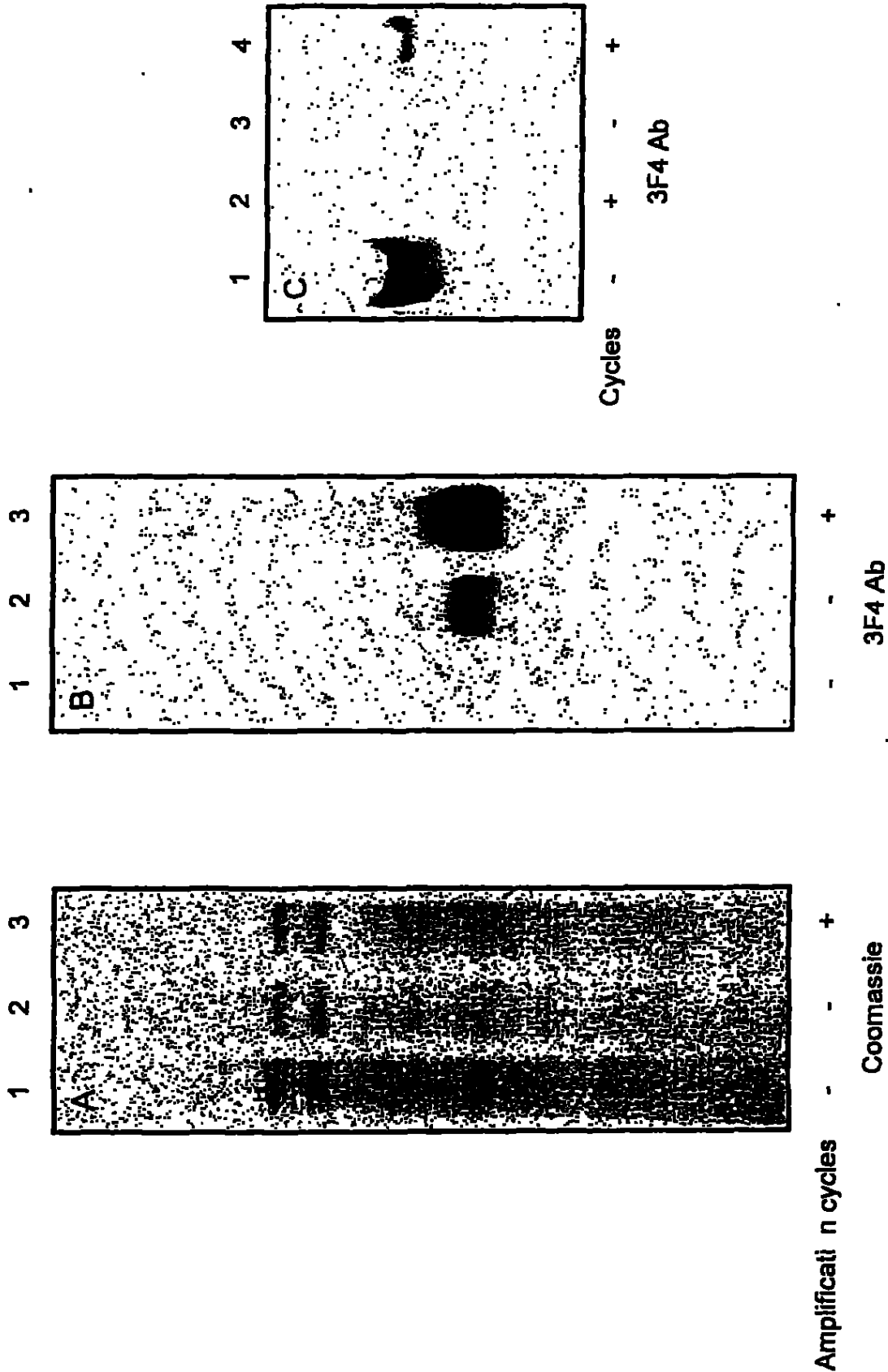
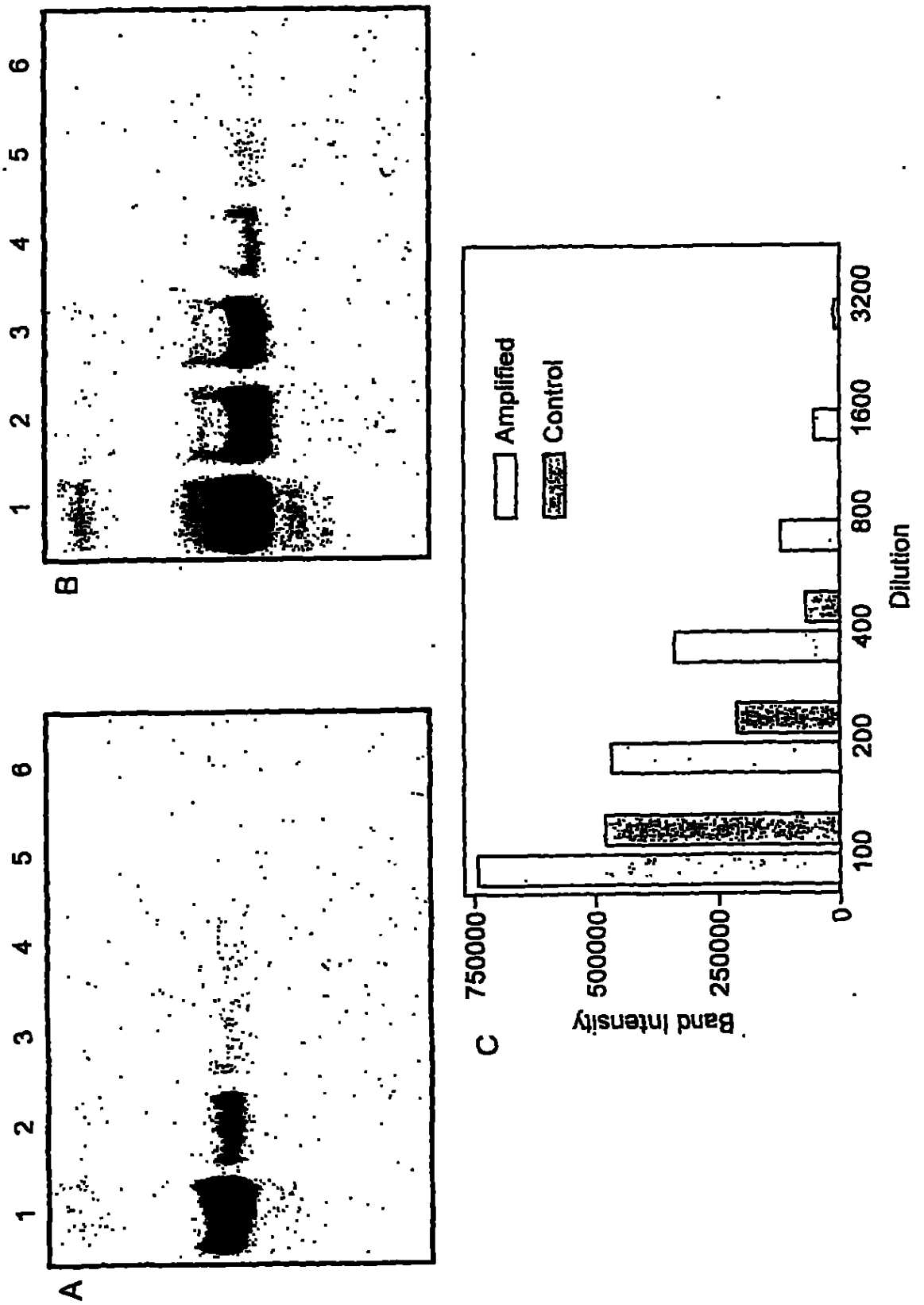


FIG. 4

Sensitivity of the cyclic amplification system



47

FIG. 5

Relationship between the PrPres signal and the number of amplification cycles

Scrapie brain homogenate diluted 10^{-2} in healthy hamster brain homogenate

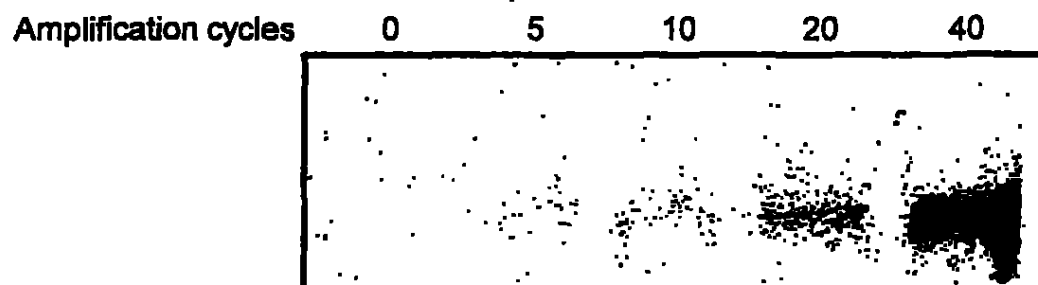


FIG. 6

Amplification of PrP^{Sc} in blood

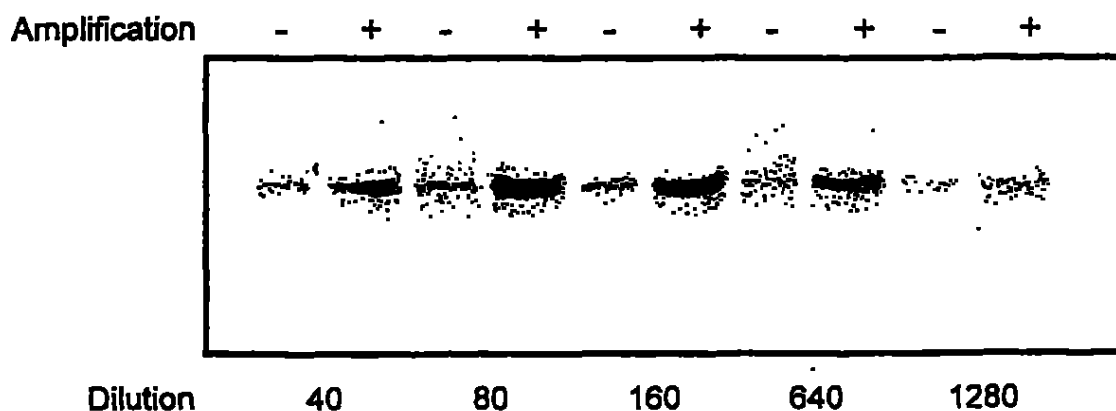


FIG. 7

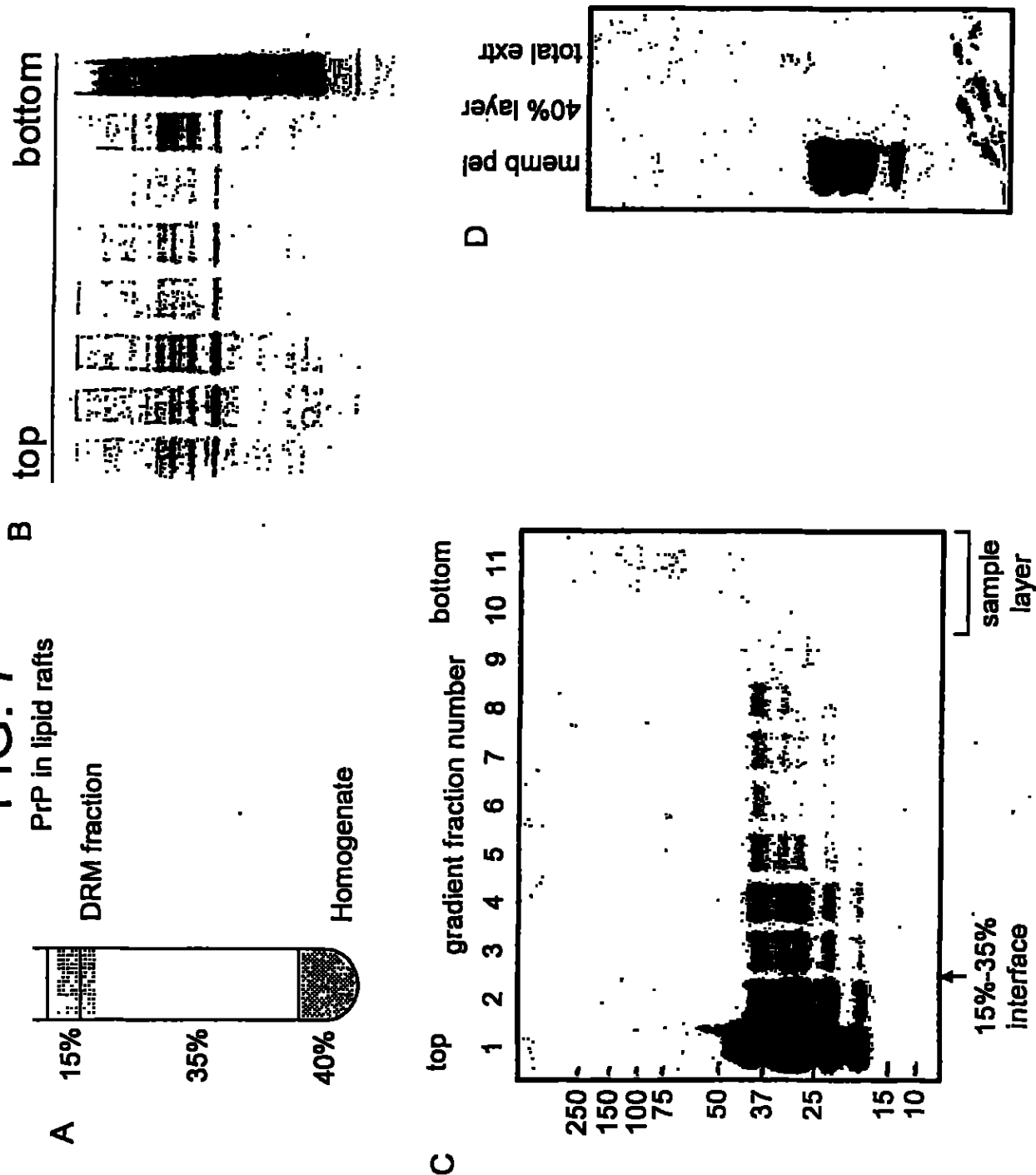


FIG. 8

The elements needed for amplification are in lipid rafts

Pure PrP^{Sc} incubated with

Brain extract DRM

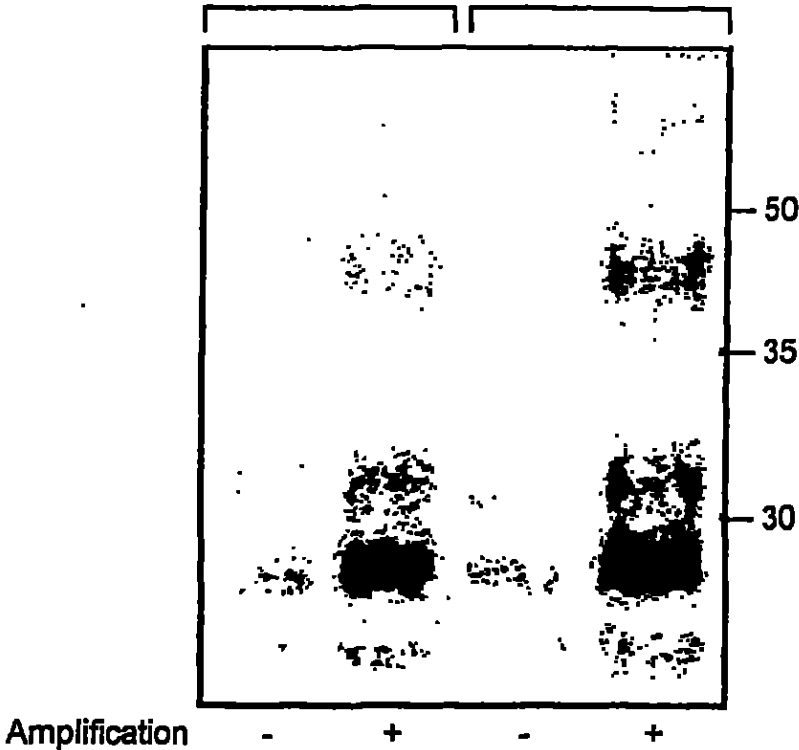
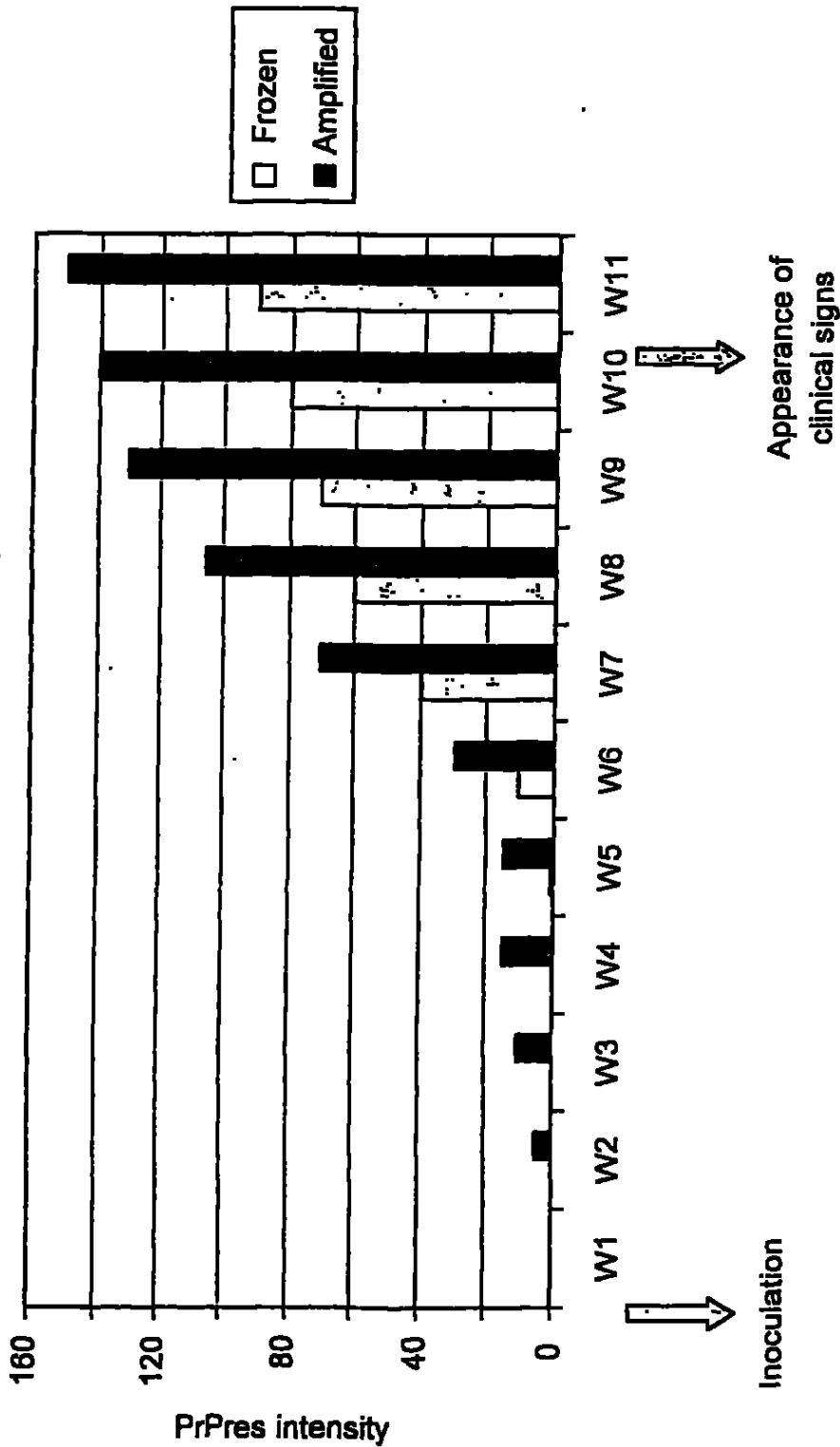


FIG. 9
Pre-symptomatic diagnosis in scrapie brains



51

51

FIG. 10
Cyclic amplification of human PrPSc

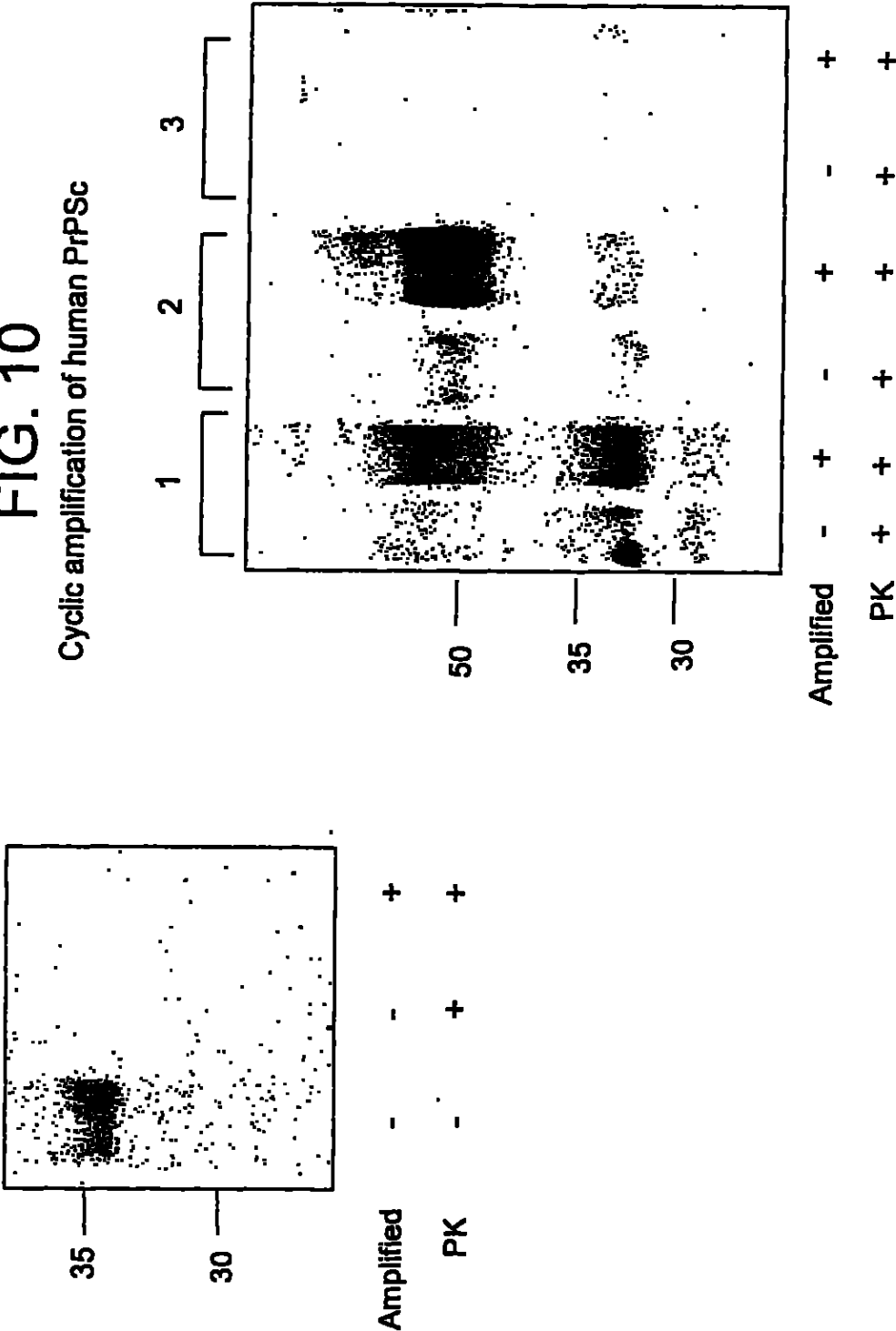


FIG. 11

Blood detection of PrPSc after preparation of blood cells ghosts

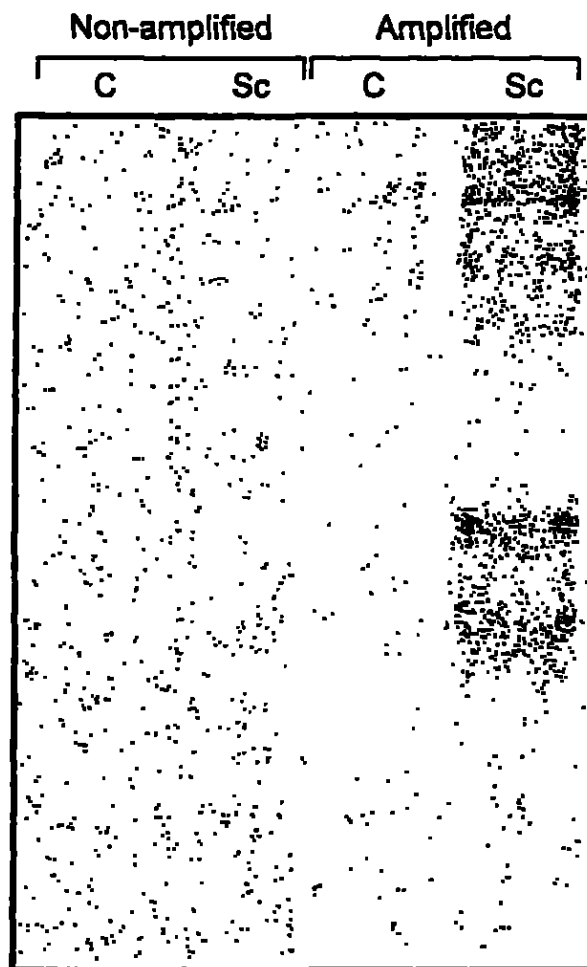
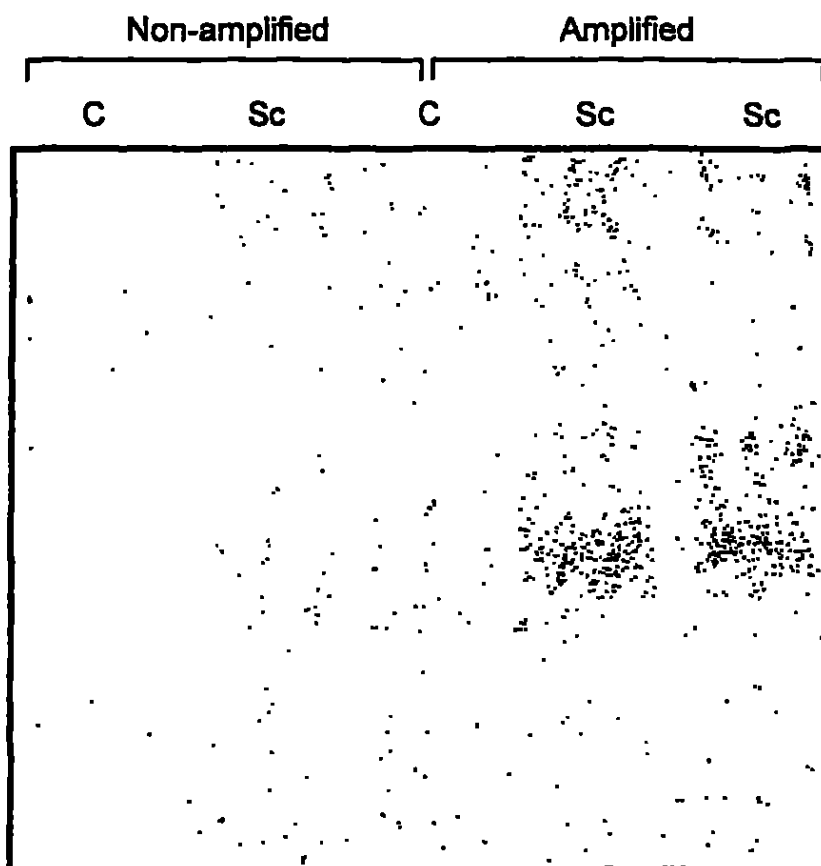


FIG. 12

Blood detection of PrPSc after sarkosyl extraction



54

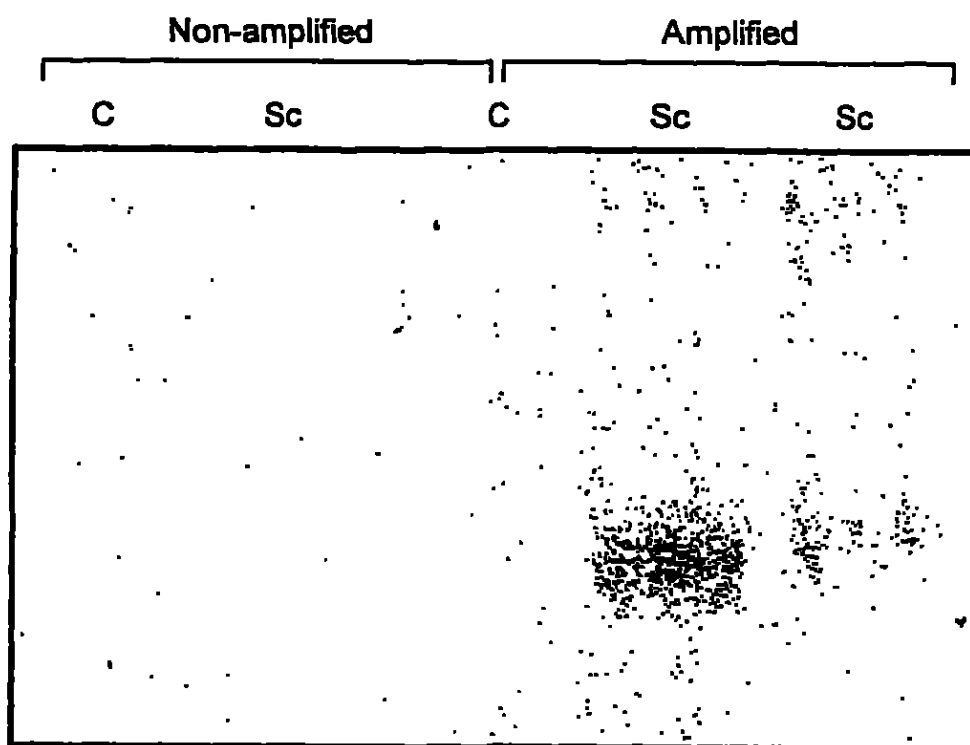
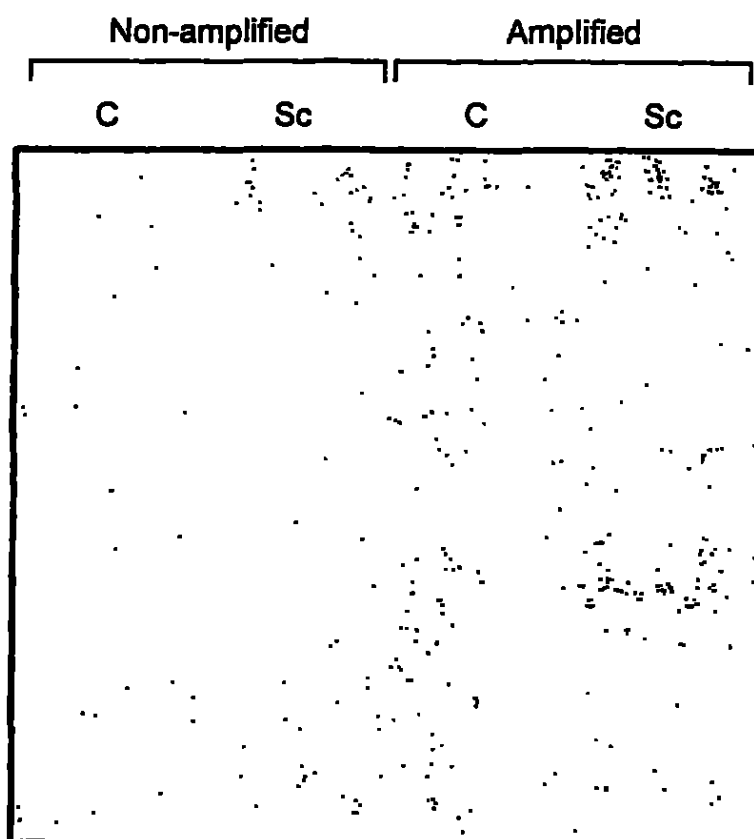
FIG. 13**Blood detection of PrPSc after lipid raft purification**

FIG. 14**Blood detection of PrPSc after preparation of buffy coats**

DIAGNOSTICO TEMPRANO DE ENFERMEDADES CONFORMACIONALES

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para la diagnosis o detención de enfermedades conformacionales por medio del ensayo con un marcador (por ejemplo el conformador patogénico) de tales enfermedades dentro de una muestra, dicho método comprende un sistema de amplificación cíclica para incrementar los niveles del conformador patogénico. En particular, tales enfermedades conformacionales pueden ser encefalopatías prion.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades convencionales son un grupo de desordenes aparentemente no relacionados uno con el otro, pero comparten una similitud golpeante en presentaciones clínicas que reflejan su mecanismo molecular compartido de la iniciación y auto asociación, con la deposición y daño del tejido consecuente.

El interés estructural es debido al hecho de que estas enfermedades variadas tienen inicio a partir de una transición conformacional aberrante en una proteína subyacente, característicamente lleva a la agregación de proteína y a la deposición de tejido. Médicamente, la presentación de estas enfermedades conformacionales refleja este mecanismo molecular, con típicamente un establecimiento insidioso y lento cuando la transición esta ocurriendo en una proteína normal, pero un establecimiento mucho más súbito cuando ocurre en una variante inestable de la proteína. Dos ejemplos de significación especial de tales enfermedades conformacionales son las encefalopatías espongiformes transmisibles y la demencia de Alzheimer, una enfermedad que amenaza la salud general en los sistemas de cuidado en el mundo desarrollado (para una revisión ver Carrel et al., 1997).

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE) también conocidas como enfermedades prion son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan a los humanos y a los animales. La enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), kuru, la enfermedad Gersmann-Straussler-Scheiker (GSS) y las insomnias familiares fatales (FFI) en humanos lo mismo que

la encefalopatía espongiforme scrapie y de bovinos (BSE)
En animales son algunas de las enfermedades TSE
(Prusiner, 1991).

Aunque estas enfermedades son relativamente raras en humanos, el riesgo de la transmisibilidad del BSE a los humanos por medio de la cadena alimenticia ha llamado la atención a las autoridades de salud pública y a la comunidad científica (Cousen et al., 1997, Bruce et al., 1997).

Estas enfermedades están caracterizadas por un periodo de incubación extremadamente largo, seguido de una enfermedad clínica breve e invariablemente fatal (Roos et al., 1973). Hasta la fecha no hay ninguna terapia disponible.

La clave característica de la enfermedad es la formación de una proteína anormalmente formada llamada PrP^{Sc} , que es una versión modificada post translacionalmente de una proteína normal. Determinada como PrP^{C} (Cohen y Prusiner, 1998). Las diferencias químicas no habían sido detectadas para distinguir entre las iso formas PrP (Stahl et al., 1993) y la conversión

parece involucrar un cambio conformacional mientras que el contenido de la hélice α -de la proteína normal disminuye y la cantidad de láminas β -incrementa (Pan et al., 1993). Los cambios estructurales son seguidos por alteraciones en las propiedades bioquímicas: PrP^c soluble en detergentes no desnaturalizados, PrP^{sc} es insoluble; PrP^c es fácilmente digerida por las proteasas, mientras que el PrP^{sc} es parcialmente resistente, resultando de la formación de un fragmento truncado terminalmente en N conocido como "PrPres" (Baldwin et al., 1995; Cohen y Prusiner, 1998), "PrP 27-30" (27-30 kDa) o "PK-resistente" (resistente a la proteinasa K) en su forma.

Hasta el momento no ha habido un diagnóstico preciso para el TSE (reporte de la WHO, 1998, Budka et al., 1995, Weber et al; 1997). Intentos para desarrollar una prueba de diagnóstico para enfermedades prion han sido desestimuladas por la carencia aparente de una respuesta inmune al PrP^{sc} . Los diagnósticos clínicos del CJD se basan corrientemente en la combinación de la demencia progresiva sub aguda (menos de 2 años), mioclonu, y la disfunción neurológica multifocal, asociada con un electroencefalograma periódico característico (EEG) (reporte de la WHO, 1998, Weber et al., 1997). Sin

embargo, la variante CJD (vCJD), la mayoría de las formas iatrogénicas del CJD y hasta el 40% de los casos esporádicos no tienen las anormalidades EEG (Steinhoff et al., 1996). En promedio la precisión del diagnóstico clínico esta alrededor del 60% para CJD y es altamente variable para otras enfermedades relacionadas prion. El diagnóstico clínico es más preciso solamente en etapas tardías de la enfermedad cuando los síntomas claros se han desarrollado (Weber et al., 1997).

El análisis genético es útil para el diagnostico de las enfermedades prion hereditarias, pero esto representa solamente el 15% de los casos. La neuroimagen es útil solamente para excluir otras condiciones de demencia progresiva rápidamente debido a las lesiones estructurales del cerebro (Weber et al., 1997). Los hallazgos obtenidos por imagen del cerebro por tomografía computarizada (CT) de imágenes de resonancia magnética (MRI) dependen principalmente del estado de la enfermedad. El CT es mucho menos sensible y en las fases tempranas no hay atrofia detectada en el 80% de los casos (Gálvez y Cartier, 1983). Las señales hiperintensas el del MRI han sido detectadas en los ganglios basales aparte de la atrofia (Onofrji et al., 1993). Como los

cambios observados por el CT estas alteraciones no son de ninguna manera específicas.

Datos recientes han identificado varias proteínas neuronales, astrocíticas y gliales que son elevadas en el CJD (IIMI et al., 1992). La proteína S-100, iso enzima específica de neurona y la ubiquitina se incrementan significativamente en el fluido cerebro espinal (CSF) en la fase temprana de la enfermedad con unas concentraciones disminuidas en el curso de la enfermedad (IIMI et al., 1992). Un marcador de muerte neuronal, la proteína 14-3-3, ha sido propuesta como un ensayo específico y sensible para el CJD esporádico (Hsich et al., 1996). Sin embargo, esto no es útil para el diagnóstico del vCJD, y mucho menos específico en las formas genéticas. Aunque la proteína 14-3-3 puede estar presente en el CSF de los pacientes con otras condiciones, el ensayo no es recomendado por la WHO como un tamizado general para el CJD y se reserva para confirmar diagnósticos clínicos (reporte de la WHO, 1998).

Por medio de combinar datos clínicos con los marcadores bioquímicos un alto éxito en el diagnóstico se

ha logrado. Sin embargo, de acuerdo con el diagnóstico operacional usualmente en uso en la vigilancia europea del CJD, el diagnóstico definitivo se establece solamente por exámenes neuro patológicos y la detección del PrP^{sc} sea por inmunohistoquímica, histoblot o el western blot (Weber et al., 1997, Budk et al., 1995).

La formación del PrP^{sc} no es solamente posible causa de la enfermedad, sino que también es el mejor marcador conocido. La detección de PrP^{sc} en tejidos y células se correlaciona ampliamente con la enfermedad y con la presencia de infectividad TSE, y los tratamientos que inactivan o eliminan la infectividad TSE también eliminan el PrP^{sc} (Prusiner 1991). La identificación del PrP^{sc} en tejidos humanos o animales es considerada clave para el diagnóstico TSE (reporte de la WHO, 1998). Una limitación importante de esta enseñanza es la sensibilidad, ya que las cantidades de PrP^{sc} son altas (suficiente para su detección con métodos convencionales) solamente ene. CNS en las etapas tardías de la enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado que en las etapas tempranas de la enfermedad hay una distribución generalizada de PrP^{sc} (en cantidades pequeñas), especialmente en el sistema linforetico (Aguzzi,

1997). Aunque, la presencia de PrP^{Sc} ha sido reportada en tejidos de amígdalas palatinas y el apéndice obtenido de pacientes con vCJD (Hill et al., 1997). Aunque esto no es conocido en cuanto a que tan temprano en la enfermedad el curso de la biopsia de amígdalas o apéndice puede ser usado en el diagnóstico de vCJD, se ha mostrado que en ovejas genéticamente susceptibles al scrapie, el PrP^{Sc} puede ser detectado en tejido de amígdalas re sintomáticamente y tempranamente en el periodo de incubación. Sin embargo, el PrP^{Sc} no ha sido detectado en estos tejidos solamente en algunos casos de CJD esporádico o de GSS (Kawashima et al., 1997).

La proteína normal es expresada en células de sangre blancas y plaquetas y por lo tanto es posible que algunas células de sangre puedan contener PrP^{Sc} en individuos afectados (Aguzzi, 1997). Esto plantea la posibilidad de un ensayo de sangre para CJD, pero esto requeriría un ensayo con un grado mucho mayor de sensibilidad que aquellos corrientemente disponibles.

La replicación prion es hipotetizada de que ocurre cuando el PrP^{Sc} en el inoculado infectado interactúa específicamente con el huésped PrP^C catalizando su

conversión a la forma patogénica de la proteína (Cohen et al., 1994). Este proceso toma entre varios meses a años para alcanzar la concentración PrP^{sc} suficiente para disparar los síntomas clínicos.

La unidad infectiva de PrP^{sc} parece ser una estructura oligomérica rica en laminas β , que convierte la proteína normal por medio de integrarla dentro del agregado en crecimiento (figura 1). La conversión ha sido mimetizada in Vitro por medio de mezclar PrP^{c} purificado con un exceso de 50 veces molar del PrP^{sc} previamente desnaturalizado (Kosisko et al., 1994).

Los sistemas de conversión in Vitro descritos hasta ahora tienen baja eficiencia ya que ellos requieren un exceso de PrP^{sc} y por lo tanto no son útiles para propósitos de diagnostico debido a que no pueden monitorear cantidades no detectables del marcador. La razón para la baja eficiencia es que el número de oligómeros PrP^{sc} (unidades de conversión) permanecen fijos dentro del curso del ensayo. Las unidades de conversión crecen secuencialmente por los extremos y como resultado ellas se vuelven más grandes, pero no se incrementan en número (figura 1).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Hemos encontrado ahora un método para la diagnosis o detención de una enfermedad conformacional, en donde la enfermedad está caracterizada por una transición conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, ensayando un marcador de dicha enfermedad dentro de una muestra, dicho método comprende:

- (i) poner en contacto dicha muestra con una cantidad del conformador no patogénico;
- (ii) disgregar cualesquier agregados eventualmente formados durante la etapa (i);
- (iii) determinar la presencia y/o cantidad de dicho conformador patogénico dentro de la muestra.

Generalmente, el conformador patogénico será el marcador para la presencia de dicha enfermedad.

Preferiblemente, la etapa (i) comprende la etapa (ia) incubar dicha muestra/conformador no patogénico.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, las etapas (ia) y (ii) forman un ciclo que es repetido por lo menos 2 veces antes de llevar a cabo la etapa (iii). Más preferiblemente, los ciclos son repetidos entre 5 a 40 veces, y más preferiblemente entre 5 a 20 veces.

Las enfermedades conformacionales al ser detectadas o diagnosticadas son aquellas que son caracterizadas por una transición conformacional de una proteína subyacente. Esta "proteína subyacente" es una proteína que es capaz de adoptar una conformación no patogénica y una conformación patogénica. Un ejemplo de tal proteína es la proteína prion, PrP. Un ejemplo adicional de tal proteína es la proteína que involucrada en la enfermedad de Alzheimer por ejemplo, la proteína β -amiloide.

Las enfermedades conformacionales al ser diagnosticadas o detectadas son preferiblemente enfermedades conformacionales transmisibles, tal como TSE (según se definió en la sección de antecedentes).

En el caso del diagnóstico de TSE y de acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el marcador de

la enfermedad lo mismo que el conformador patogénico es el PrP^{sc} mientras que el conformador no patogénico de la proteína de interés es PrP^c.

La cantidad de conformador no patogénico que es usada en la etapa (i) (y opcionalmente en la etapa (ib)) generalmente será una cantidad conocida, aunque no necesariamente este es el caso si uno desea meramente establecer la presencia o ausencia del conformador patogénico.

Preferiblemente, la cantidad de conformador no patogénico que es usada en la etapa (i) (y opcionalmente en la etapa (ib)) será una cantidad en exceso. Generalmente, la proporción inicial del conformador no patogénico al conformador patogénico (si esta presente en la muestra) será mayor de 100:1, preferiblemente mayor de 1000:1 y más preferiblemente mayor de 1000000:1.

En una modalidad adicional preferida de la invención, el conformador no patogénico en la etapa (i) está presente en un homogenato de cerebro y de un sujeto saludable y/o puede ser agregado a este, antes de llevar a cabo la etapa (i); en este caso, por lo tanto, el

homogenato de cerebro contiene un (preferiblemente conocido) exceso de conformador no patogénico que es agregado durante la etapa (i). Preferiblemente, el homogenato de cerebro del sujeto saludable viene de la misma especie de la cual la muestra a ser analizada viene (por ejemplo homogenato de cerebro humano para la muestra humana que va ser analizada, homogenato de cerebro de rata para la muestra de rata que va ser analizada). Más preferiblemente, el conformador no patogénico está presente en una fracción específica del homogenato de cerebro, por ejemplo en las estructuras de lípidos del homogenato de cerebro. La preparación de tales fracciones pueden ser llevadas a cabo por ejemplo, como se describió en Sargiacomo M et al., 1993.

Así la invención se relaciona adicionalmente con un método o ensayo como se describió aquí en donde un tejido fracción de tejido es agregado a u conformador no patogénico en la etapa (i). Preferiblemente, el tejido es un tejido de cerebro, o un homogenato o fracción derivado del mismo, venido de un sujeto sano (por ejemplo uno en donde el conformador patogénico no está presente).

Se ha reportado (Kocisko et al., 1994) que menos formas glicosilatadas de PrP^c son convertidas preferencialmente a la forma PrP^{sc} . en particular PrP^c que fue tratada con la fosfolipasa específica fosfatidilinositol se fue rutinariamente más eficientemente convertida a la forma patogénica que la PrP^c glicosilatada más pesada completa. Una modalidad adicional de a invención por lo tanto se relaciona con un método o ensayo como se describió aquí en donde el conformador no patogénico es PrP^c el cual tiene un nivel reducido de glicosilación (en particular glicosilación lkiigada a N) en comparación tonel tipo natural PrP^c . Preferiblemente, el PrP^c ha sido tratado para remover algo, todo o una cantidad significativa de la glicosilación antes de su uso como conformador no patogénico en los métodos y ensayos descritos aquí; y más preferiblemente, el conformador no patogénico es PrP^c que es esencialmente no glicosilatado.

En el caso de diagnosis de TSE, i los agregados de la forma patogénica están presentes dentro de la muestra, durante la etapa (i) ellos inducirán en la transición $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{sc}}$ y durante la etapa (ii) tales agregados serán rotos en unidades infectivas todavía más pequeñas, cada

una de las cuales todavía es capaz de inducir la conversión de otro PrP^c . Esta clase de método es llamada aquí "amplificación cíclica" y esta representada en la figura 2. Este sistema resulta en un incremento exponencial en la cantidad de PrP^{sc} eventualmente presente en la muestra que puede ser fácilmente detectado. De acuerdo con una modalidad adicional preferida de la invención, es por lo tanto posible calcular la cantidad de PrP^{sc} inicialmente presente en la muestra de partida de la cantidad conocida de PrP^c determinando la cantidad presente de PrP^{sc} dentro de la muestra al final del ensayo y considerando el número de ciclos llevados a cabo.

Si, por el contrario, no hay PrP^{sc} presente en la muestra (se tal o en la forma de agregado), ninguna molécula de PrP^c será convertida en PrP^{sc} y al final del ensayo el marcador estará completamente ausente. (ningún conformador patogénico detectado en la muestra).

Se ha mostrado que la unidad infectiva de PrP^{sc} es un oligomérico en láminas β , el cual puede convertir la proteína normal integrándola dentro del agregado en crecimiento, en donde este adquiere las propiedades asociadas con las formas anormales (resistencia a la

proteasa e insolubilidad) (Jarret and Lansbury, Jr., 1993, Caughey et al., 1997). Después de la incubación de las 2 formas de PrP, las especies oligoméricas incrementan su tamaño por medio de reclutar y transformar moléculas PrP^c. Este proceso tiene una baja eficiencia, ya que depende de un número fijo de oligómeros en crecimiento que crecen por los extremos. El número de unidades de conversión no se incrementa en el curso de la reacción en donde ellos solamente se vuelven más grandes. Se asume que este proceso es lo que sucede en el cuerpo animal o del humano después de la infección. Un proceso conocido que lleva meses o aún varios años. En esta invención nosotros describimos un procedimiento para romper los oligómeros a unos más pequeños, cada uno de los cuales es entonces capaz de convertir el PrP^c.

Por lo tanto el sistema tiene aplicaciones directas en el diagnostico de enfermedades conformacionales, y en particular enfermedades conformacionales transmisibles, tales como el TSE por medio de amplificar o de otra manera cantidades indetectables de PrP^{sc} en diferentes tejidos o fluidos biológicos. El sistema puede permitir la identificación temprana de gente e riesgo de desarrollar TSE y también podría ser muy útil para seguir

bioquímicamente la eficacia de los compuestos terapéuticos del TSE durante los ensayos clínicos.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención la muestra al ser analizada es sometida a una etapa "de pre tratamiento", la cual tiene el propósito de "concentrar de manera selectiva" en la muestra el conformador patogénico que va a ser detectado. En este caso de TSE tanto PrP^c y PrP^{sc} han sido reportados de estar localizados en la región especial de la membrana de plasma que es resistente al tratamiento de detergente suave (tal como hielo fríotritón X-100) debido al contenido relativamente alto de colesterol y glicosfingolípidos (M. Vey et al., 1996). Estos dominios de membrana son llamados porciones de elidido o membranas asistentes a detergente (DRM) o dominios similares a caveolae (CLD) y son ricos en proteínas de señalización, receptores y proteínas ancladas con GPI. Hemos conformado que el 100% del PrP^c en el cerebro se liga a esta fracción, la cual contiene menos de 2% del total de proteínas (ver ejemplo 6 y figura 7). Así, la etapa simple de aislamiento de la porción de lípido de la muestra permite un enriquecimiento dramático en PrP^c. Resultados similares fueron obtenidos por la solicitante

en el aislamiento en las porciones de lípidos del homogenato de cerebro ver homogenato de prurito lumbar de cerebro, en el cual el PrP^{sc} fue recuperado en las porciones.

Así una modalidad de la invención incluye una etapa en donde la muestra al ser analizada esta sometida a una etapa de pre tratamiento para concentrar de manera selectiva el conformador patogénico en la muestra. Preferiblemente, el conformador patogénico es PrP^{sc} y el pre tratamiento es la extracción a partir de la muestra de una fracción que es insoluble en detergentes suaves.

Las etapas (i) y (ia) se llevan a cabo preferiblemente bajo condiciones fisiológicas (pH, temperatura y esfuerzo iónico) y, más preferiblemente, los inhibidores de proteasa y detergentes son también agregados a la solución. Las condiciones serán escogidas de manera que se permite que cualquier conformador patogénico, si esta presente en la muestra, se convierta a conformador no patogénico dentro del conformador patogénico así formando un agregado u oligómero de conformadores patogénicos. Las condiciones fisiológicas

apropiadas serán fácilmente evidentes para aquellos versados en la técnica.

La longitud de la incubación será durante un tiempo la que permitirá algo, todo o una porción significativa del conformador no patogénico convertido a conformador patogénico, asumiendo que la muestra contiene algún conformador patogénico. El tiempo será fácilmente determinable por aquellos versados en la técnica. Preferiblemente, cada incubación durará entre 1 minuto a 4 horas, más preferiblemente entre 30 minutos a 1 hora, y particularmente preferible aproximadamente 60 minutos.

Ç

La etapa de incubación (ia) puede también comprender una etapa adicional (ib) que comprende la adición de una cantidad adicional de conformador no patogénico.

Diversos métodos pueden ser usados para disgregar los agregados durante la etapa (ii) del método de la presente invención. Estos incluyen: el tratamiento con disolventes (tales como sulfato de sodio dodecil, dimetilsulfoxida, acetonitrilo, guanidina, urea, trifluoroetanol, ácido trifluoroacético diluido, ácido fórmico diluido, etc.), modificación de las

características químico físicas de la solución tales como pH, temperatura, esfuerzo iónico, constante dieléctrica, y métodos físicos tales como, sonicación, y radiación con láser, congelamiento/deshielo, prensa francesa, incubación en autoclave, alta presión, agitación, homogenización suave, y otras clase de irradiación, etc. La Sonicación es el método preferido de acuerdo con la invención.

La disgregación puede ser llevada a cabo durante un tiempo en el cual los disgregados algunos, todos o una porción significativas de los agregados que se han formado durante la etapa (ii). No es necesario para todos los agregados ser desagregados en una cualquiera de las etapas de disgregación. De esta manera, el numero de unidades de conversión se incrementa en cada etapa de disgregación.

El tiempo de disgregación será fácilmente determinable por aquellos basados en la técnica y este puede depender del método de disgregación usado. Preferiblemente, la disgregación se lleva a cabo durante 1 segundo a 60 minutos más preferiblemente 5 segundos a 30 minutos y particularmente preferible 5 segundos a 10

minutos. Si la disgregación se lleva a cabo por sonicación, la sonicación preferiblemente toma 5 segundos a 5 minutos, y más preferiblemente entre 5 a 30 segundos.

La Sonicación ha sido usada en el pasado como parte de diversos métodos para purificar el PrP con el objetivo de incrementar la solubilidad de agregados grandes, pero nunca ha sido descrito para amplificar in Vitro la conversión del PrP.

El uso de un sonicador de probeta única tradicional impone un problema para el manejo de muchas muestras simultáneamente, tal como lo requiere un ensayo de diagnóstico. No hay en el mercado sonicadores con formato de micro placa de 96 pozos, el cual suministraría sonicación a todos los pozos al mismo tiempo y pueden ser programados por operación automática. Estos sonicadores pueden fácilmente ser adaptados para ser usados en el método de diagnóstico de la presente invención.

Así una modalidad de la invención se relaciona con el uso, en la etapa (ii) de un sonicador multi pozo.

La detección de un conformador patogénico convertido nuevamente, por ejemplo PrP^{sc} , (iii) después de el procedimiento de amplificación cíclica descrito en las etapas (i) a (ii) puede llevarse a cabo de acuerdo con uno cualquiera de los métodos conocidos. La detección específica del PrP^{sc} es usualmente (pero no siempre, ver más abajo) hecha por una primera etapa de separación de dos isoformas de PrP (proteína normal y proteína patogénica). La separación se hace sobre la base de las propiedades bioquímicas peculiares del PrP^{sc} que lo distingue de la mayoría de las proteínas normales del cuerpo, particularmente: el PrP^{sc} es parcialmente resistente al tratamiento con proteasa y es insoluble aún en la presencia de detergentes no desnaturalizados. Por lo tanto la primera etapa después del procedimiento de amplificación es usualmente la remoción o separación del PrP^{c} en la muestra, sea por tratamiento con proteasas o por centrifugación para separar el soluble PrP^{c} de la proteína insoluble (PrP^{sc}). De hay en adelante, la detección del PrP^{sc} puede ser hecha por cualquiera de los métodos conocidos, inter alia:

(A) Inmunosecado después de SDS-PAGE. Este es hecho por medio de un procedimiento de rutina bien conocido por

aquellos con experticio y que usa algunos de los anticuerpos anti-PrP comercialmente disponibles.

(B) El ensayo Elisa. Detección de fase sólida puede hacerse sea por un ensayo simple en el cual el ensayo es cargado sobre una placa y la cantidad de PrP^{sc} es detectada después usando anticuerpos anti PrP o más preferiblemente usando el emparejado Elisa en el cual la placa es primeramente recubierta con un anticuerpo anti-PrP que captura el PrP específicamente de la muestra, el cual es finalmente detectado usando un segundo anticuerpo anti-PrP. Ambas formas de Elisa pueden ser usadas con marcadores de anticuerpos anti-PrP (radioactividad, fluorescencia, biotina, etc.) para incrementar adicinamente la sensibilidad de la detección.

(C) Ensayos de radioactividad. EL PrP^c normal usado como un sustrato para el procedimiento de amplificación puede ser marcado radio activamente (3H, 14C, 35S, 125I, etc.,) antes de iniciar el procedimiento y después de la remoción del PrP^c no convertido radioactividad del PrP^{sc} recientemente convertido puede ser cuantificada. Este procedimiento es más cuantitativo y no descansa en el uso de anticuerpos.

(D) Ensayos de fluorescencia. El PrP^c normal usado como un sustrato para el procedimiento de amplificación puede ser marcado con probetas fluorescentes antes de iniciar el procedimiento y después de la remoción del PrP^c no convertido, la fluorescencia en el recientemente PrP^{sc} puede ser cuantificada. Es posible que el ensayo de fluorescencia no requiera la remoción del PrP^c no convertido, por que las propiedades de fluorescencia del PrP^c y el PrP^{sc} pueden ser diferentes debido a la conformación distinta de las dos isoformas.

(E) Ensayos de agregación. Es bien conocido que el PrP^{sc} (y no el PrP^c) es capaz e agregarse formando fibrilos amiloides o estructuras tipo varilla. Por lo tanto la detección del PrP^{sc} puede ser hecha usando los métodos usados para cuantificar la formación de estos tipos de agregados, incluyendo microscopia electrónica, marcado con tintas específicas (rojo congo, tioflavina S y T, etc.) y ensayos turbidimétricos. Los ensayos de agregación no requieren la etapa de separación de las dos isoformas, por que es conocido que el PrP^c normal no se agrega.

(F) Ensayos estructurales. La diferencia más importante entre el PrP normal y el patogénico son sus estructuras secundaria y terciaria. Por lo tanto, los métodos que permitan la evaluación estructural de la proteína pueden ser usados, incluyendo NMR, dicroísmo circular, espectroscopia de infrarrojos con transformación de Fourier, espectroscopia Raman, Fluorescencia intrínseca, absorción UV, etc.

El más ampliamente usado anticuerpo monoclonal PrP es "3F4" (Kascsak et al., 1987), que es un anticuerpo monoclonal derivado de un ratón inmunizado con la PrPres 263K del hámster (conformado resistente a la proteasa). Este anticuerpo también es capaz de reconocer al conformador no patogénico del hámster y de los humanos, pero no de los bovinos, ratones, ratas, ovejas y cerebro de conejo; también es capaz de ligar al conformador patogénico humano, pero solamente después de la desnaturalización de la proteína.

Tales anticuerpos pueden ser marcados para permitir más fácil detección del marcador. Por ejemplo las medidas de fluorescencia resueltas en tiempo con el anticuerpo

3F4 marcado con europium han sido usadas por algunos científicos (Safar et al., 1998).

Los métodos anteriormente descritos de detección pueden ser usados para la detección de otros conformadores patogénicos, por ejemplo, la forma patogénica de la proteína β -amiloide, *mutatis mutandis*.

En una modalidad alternativa el conformador no patogénico agregado en exceso puede ser marcado detectable de modo que la cantidad del conformador no agregado al final del ensayo permitirá una determinación de la cantidad de conformador patogénico inicialmente presente en la muestra.

De acuerdo con una modalidad alternativa adicional, el conformador patogénico (el marcador) puede ser detectado directamente con un anticuerpo dirigido contra este.

En términos más amplios una parte de marca puede ser agregada al conformador patogénico, al conformador no patogénico o al anticuerpo contra uno de los

conformadores dependiendo de la clase de ensayo que se lleve a cabo.

Otro objeto de la invención es un ensayo para un marcador de una enfermedad conformacional que esta caracterizada por una transición, conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, dentro de una muestra, dicho ensayo comprende las siguientes etapas: (i) poner en contacto dicha muestra con una cantidad de conformador no patogénico (ii) disgregar cualesquier agregados eventualmente formados durante la etapa (i) y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de dicho conformador patogénico dentro de la muestra. En general, el conformador patogénico será el marcador para la presencia de dicha enfermedad.

Preferiblemente, la etapa (i) comprende la etapa (ia) de incubar dicha muestra/conformador no patogénico.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención las etapas (ia) y (ii) forman un ciclo que es repetido por lo menos dos veces antes de llevar a cabo la etapa (iii). Más preferiblemente, los ciclos son

repetidos entre 5 a 40 veces y más preferiblemente 5 a 20 veces.

Un objeto adicional de la presente invención es un kit de diagnostico para ser usado en el ensayo especificado, el cual comprende una cantidad de conformador no patogénico, y opcionalmente adicionalmente una capa micro titulo y un sonicador multipozo.

Usando el método de la invención, es posible detectar 1 a 10fg de conformador patogénico inicialmente presente en una muestra, lo que es equivalente a 3 a 30 x 10^{-20} moles.

La muestra generalmente será una muestra biológica o tejido, y cualesquier tal muestra biológica tejido puede ser ensayada tonel método de la presente invención. En el caso de un tejido, el ensayo y método de la presente invención puede ser llevado a cabo sobre homogenatos o directamente sobre muestras ex vivo. Los métodos y ensayos generalmente se llevarán a cabos obre muestras ex vivo o in Vitro. Preferiblemente, la muestra es un fluido biológico, tal como la sangre el linfo, la orina o la leche; el tejido de cerebro o la medula espinal o tejido

e amígdalas o tejido de apéndice; una muestra derivada de sangre tal como fantasmas de células de sanguíneas o preparaciones de recubrimiento de tejido; o una preparación de membrana de plasma tal como parte de lípido, membranas resistentes a detergentes o dominios similares a caveolae. La muestra puede alternativamente ser una composición que comprende un compuesto (particularmente una proteína) derivada de una fuente humana o animal, tal como una hormona de crecimiento, o un extracto de tejido, tal como un extracto de pituitaria. Tal composición de muestra puede estar contaminada con un conformador patogénico.

La muestra también puede comprender un producto de comida o una bebida, o una porción de un producto de comida o una bebida (que este destinada para consumo humano o consumo animal) para poder establecer la presencia o ausencia del conformador patogénico en ese producto o bebida.

Preferiblemente, el conformador no patogénico agregado en la etapa (i) será proveniente de la misma especie de la muestra. Esta puede por ejemplo, ser derivado de una forma (por ejemplo tejido) saludable (por

ejemplo no patogénica) de la muestra biológica que va a ser ensayada. Alternativamente, el conformador no patogénico puede ser producido sintéticamente o recombinantemente, usando medios conocidos en la técnica.

Debe entenderse, sin embargo que el conformador no patogénico no requiere estar en forma pura o aun en forma sustancialmente pura. En muchos casos, el conformador no patogénico estará en la forma de un homogenato de tejido o una fracción del mismo que contiene el conformador no patogénico relevante. Ejemplos preferidos incluyen los homogenatos de cerebro y fracciones derivadas del mismo, por ejemplo porciones de lípidos.

Preferiblemente, la muestra y/o el conformador no patogénico serán de origen humano o de animal domestico por ejemplo una vaca, oveja, cabra o gato.

Otro objeto de la presente invención es suministrar un método para identificar un compuesto que module la transición conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, que comprende:

- (i) poner e contacto una cantidad del conformador no patogénico con una cantidad del conformador patogénico en la presencia y en la ausencia de dicho compuesto,
- (ii) disgregar cualesquier agregados eventualmente formados durante la etapa (i),
- (iii) determinar la cantidad del conformador patogénico en la presencia y en la ausencia de dicho compuesto.

Si se desea, la etapa (i) puede comprender la etapa (ia) incubar dicha muestra/conformador no patogénico, y un ciclo llevado a cabo entre las etapas (ia) y (ii) como se describió anteriormente para los métodos y ensayos de las invención, mutatis mutandis.

Si la cantidad de conformador patogénico medida en la presencia del compuesto es mayor que la mediada en la ausencia, esto significa que el compuesto es un factor que "cataliza" la transición conformacional; si tal cantidad es menor, esto significa que el compuesto es un factor que inhibe tal transición.

De acuerdo con el método anterior, "identificar" también debe interpretarse que significa "tamizar" una serie de compuestos.

Una "marca" o parte marcada será cualquier compuesto empleado como medio para detectar una proteína. La marca o parte marcada puede ser ligada a la proteína vía interacciones iónicas o covalentes, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o intercalaciones. Ejemplos de marcas partes marcadas incluyen, pero no se limitan a conjugados de tintas fluorescentes, biotina, digoxigenina, radio nucleótidos, sustancias quimiolumiscentes, enzimas y receptores, tal que la detección de la proteína marcada sea por fluorescencia, conjugación al streptavidin y/o avidina, cuantificación de radioactividad o quimioluminiscencia, interacciones ligando receptor y/o catalíticas. Preferiblemente es una marca fluorescente o fosforescente.

El termino "enfermedades conformacionales" se refiere aquel grupo de desordenes que surgen de una propagación de una transición conformacional aberrante de una proteína subsayacente, que lleva a la agregación de proteína y a la deposición de tejido. Tales enfermedades

pueden también ser transmitidas por un cambio conformacional inducido, propagado por un conformador patogénico a su conformador normal o no patogénico y en este caso ellos son llamados aquí "enfermedades conformacionales transmisibles". Ejemplos de tales clases de enfermedades son las encefalopatías prion, incluyendo la encefalopatía spongiforme bovina (BSE) y su equivalente humano la enfermedad Creutzfeld-Jakob (CJD), en la cual la proteína subyacente es la PrP.

El término "CJD esporádico" abreviado como "sCJD" se refiere a la manifestación mas común de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob(CJD). Esta enfermedad ocurre espontáneamente en individuos con una edad media de aproximadamente 60 a una proporción de 1 por un millón por año de individuos en toda la tierra.

El termino "CJD laterogenica" abreviado como "iCJD" se refiere a la enfermedad resultante de la infección accidental de gente priones humanos. Los ejemplos mas notorios de tal es la infección accidental de niños con priones humanos de preparaciones contaminadas de hormona de crecimiento humana.

El termino "CJD familiar" se refiere a una forma de CJD que ocurre raramente en familias y es inevitablemente causada por mutaciones en el gen de proteína prion humano. La enfermedad resulta de un desorden dominante autosomal. Los miembros de la familia que heredan las mutaciones sucumben al CJD.

El termino "enfermedad Gerstman-Strassler-Scheinker" se refiere a una forma de enfermedad prion humana hereditaria. La enfermedad ocurre de un desorden dominante autosomal. Los miembros de las familias que heredan el gen mutante sucumben al GSS.

El termino "prion" quiere decir una partícula transmisible conocida para causar un grupo de tales enfermedades conformacionales transmisibles (encefalopatías espongiformes) en humanos y animales. El termino "prion" es una contracción de las palabras "proteínas" y "infección" y las partículas están contenidas grandemente sino exclusivamente en las moléculas PrP^{Sc}.

Los priones son distintos de la bacteria virus tiroides. Priones conocidos incluyen aquellos que infecta animales para causar prurito lumbar, una enfermedad degenerativa transmisible del sistema nervioso de las ovejas y cabras lo mismo que las encefalopatías espongiformes bovinas (BSE) o la enfermedad de las vacas locas y las encefalopatías espongiformes felinas de los gatos. Cuatro enfermedades prion conocidas que afectan a los humanos son (1)kuru, (2)enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJD), (3)enfermedad Gerstman-Strassler-Scheinker (GSS), y (4)insomnia familiar fatal (FFI). Como se usa aquí prion incluye todas las formas de priones que causan todas o cualquiera de estas enfermedades u otras en animales usados y en particular en humanos y en animales de finca domesticados.

Los términos "gen PrP" y "gen de proteína prion" son usados e intercambiamente aquí para describir material genético que expresa las proteínas prion y los polimorfismos y mutaciones tales como aquellos listados aquí bajo el subtitulo "mutaciones patogénicas y polimorfismos". El gen PrP puede ser de cualquier animal incluyendo animales "huésped" y "de prueba" descritos aquí y cualquiera y todos los polimorfismos y mutaciones

del mismo, siendo reconocidos que los términos incluyen otros genes PrP que todavía no han sido descubiertos.

El termino "gen PrP" se refiere generalmente a cualquier gen de cualquier especie que codifica cualquier forma de una secuencias de aminoácidos PrP incluyendo cualquier proteína prion. Algunas secuencias PrP comúnmente conocidas se describen en Gabriel et al., 1992, que se incorpora aquí como referencia para describir y divulgar tales secuencias.

Abreviaciones usadas aquí incluyen:

CNS para sistema nervioso central;

BSE para encefalopatías spongiforme bovina;

CJD para enfermedad de Creutzfeldt-Jakob;

FFI para insomnia familiar fatal;

GSS para enfermedad Gerstmann-Strassler-Scheinker;

PrP para proteína prion;

PrP^c Para el conformador no patogénico normal de PrP;

PrP^{sc} Para la isoforma patogénica "prurito" lumbar" del PrP (que también es el marcador para las enfermedades prion).

Mutaciones y polimorfismos patogénicos

Existe un número de mutaciones patogénicas conocidas en el gen PrP humano. Adicionalmente hay polimorfismos conocidos en los genes PrP humanos, de ovejas y bovinas.

La siguiente es una lista no limitativa de tales mutaciones y polimorfismos:

TABLA DE MUTACIONES

Mutaciones humanas patogénicas	Polimorfismos humanos	Polimorfismos de oveja	Polimorfismos bovinos
2 insertos octarepeat	Codon 129 Met /Val	Codon 171 Arg/Glu	5 o 6
4Insertos octarepea 5insertos octarepeat t	Codon 219 Glu/Lys	Codon 136 Ala/Val	Octarepeats
6Insertos octarepeat			
7Insertos octarepeat			
8Insertos octarepeat			
9Insertos octarepeat			
Codones 102Pro-Leu			

Codones Pro-Leu	105			
Codones Ala-Val	117			
Codones Stop	145			
Codones Asp-Asn	178			
Codones Val-Ile	180			
Codones Phe-Ser	198			
Codones Glu-Lys	200			
Codones Val-Ile	210			
Codones Asn-Arg	217			
Codones Met-Ala	232			

La secuencia de aminoácido normal, que ocurre en la basta mayoría de individuos se refiere como la secuencia PrP tipo natural. Esta secuencia tipo natural está sometida a ciertas variaciones polimorficas características. En el caso del PrP humano, dos aminoácidos polimorficos ocurren en los residuos 129 (Met/Val) y 219 (Glu/Lys). El PrP de oveja tiene os polimorfismos de aminoácido en los residuos 171 y 136, mientras que el PrP bovino tiene 5 o 6 repeticiones de una secuencia de motivo de 8 aminoácidos en la región terminal amino en la proteína prion madura. Mientras que ninguno de estos polimorfismos son en si mismos patogénicos, ellos parecen influenciar las enfermedades priona. Distinto de estas variaciones normales de las

proteínas prion tipo natural ciertas mutaciones del gen PrP humano que alteran sean los residuos de aminoácidos específicos del PrP o el número de opta repeticiones que han sido identificadas que segregan con enfermedades prion humanas hereditarias.

Con el objeto de suministrar un significado adicional a la tabla anterior demostrando las mutaciones y polimorfismos, uno puede referirse a las secuencias publicadas de genes PrP. Por ejemplo, un gen PrP de pollo, bovino, oveja, rata o ratón se describe y se publica en Gabriel et al., 1992. La secuencia para el hámster Syrian esta publicada en Baslet et al., 19986. El gen PrP de oveja se publicó en Goldmann et al., 1990. La secuencia del gen PrP para bovinos fue publicada en Goltmann et al., 1991. La secuencia para el gen PrP de pollo se publica en Harris et al., 1991. La secuencia del gen PrP para la comadreja se publicó en Kretzschmar et al., 1992. La secuencia de gen PrP humana se publicó en Kretzschmar et al., 1986. La secuencia de gen PrP para ratón fue publicada en Loch et al., 1986, La secuencia de gen Prp para oveja fue publicada en Westaway et al., 1994. Estas publicaciones se incorporan todas aquí como

referencia para divulgar y escribir el gen PrP y la secuencia de aminoácido PrP.

La invención también suministra un método para detectar la presencia de una forma patogénica de una proteína prion dentro de una muestra (preferiblemente una muestra de sangre o de cerebro) que comprende:

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de proteína prion no patogénica;

(ia) incubar la muestra/proteína prion no patogénica;

(ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);

repetir las etapas (ia)-(ii) dos o más veces;

(iii) determinar la presencia y/o cantidad de proteína prion patogénica dentro de la muestra.

Una modalidad adicional de la invención suministra un método para diagnosticar CJD dentro de un paciente, que comprende: tomar una muestra del paciente (preferiblemente una muestra de sangre o cerebro);

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de proteína PrP^C;

- (ia) incubar la muestra/proteína PrP^C;
 - (ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);
- repetir las etapas (ia)-(ii) dos o más veces; y luego
- (iv) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^C dentro de la muestra.

La invención también suministra un método para detectar la presencia de una forma patogénica de la proteína β -amiloide dentro de una muestra (preferiblemente una muestra de sangre o de cerebro), que comprende:

- (i) poner en contacto la muestra con una cantidad de proteína β -amiloide no patogénica;
- (ia) incubar la muestra /proteína β -amiloide no patogénica;
 - (ii) disgregar cualesquier agregado formados durante la etapa (ia);

Repetir las etapas (ia)-(ii) dos o más veces; y luego

- (iii) determinar la presencia y/o cantidad de proteína β -amiloide patogénica dentro de la muestra.

Una modalidad adicional de la invención suministra un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, comprende:

Tomar una muestra (preferiblemente muestra de sangre o de cerebro) de un paciente;

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de proteína β -amiloide no patogénica;

(ia) incubar la muestra/proteína β -amiloide no patogénica;

(ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);

Repetir las etapas (ia)-(ii) dos o mas veces; y luego

(iii) determinar la presencia y/o cantidad de proteína β -amiloide patogénica dentro de la muestra.

La invención adicionalmente suministra un aparato para ser usado en los métodos descritos anteriormente, particularmente un aparato que comprende una placa micro titulo, un sonicador multipozo y una cantidad de un conformador no patogénico.

Una modalidad adicional de la invención suministra un método para el diagnostico o detección de una

enfermedad conformacional, caracterizada por una transición conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, por medio de ensayar un marcador de dicha enfermedad dentro de una muestra, dicho método comprende (i) poner en contacto dicha muestra con una cantidad conocida del conformador no patogénico, (ii) disgregar los agregados eventualmente formados durante la etapa (i) y (ii) determinar la presencia y/o cantidad de dicho conformador patogénico dentro de la muestra. Preferiblemente, las etapas (i) y (ii) forman un ciclo que es repetido al menos dos veces antes de llevar a cabo la etapa (iii), más preferiblemente las etapas (i) y (ii) forman un ciclo, que es repetido entre 5 a 40 veces antes de llevar a cabo la etapa (iii).

La invención también suministra un ensayo para un marcador de una enfermedad conformacional, caracterizado por una transición conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, dentro de una muestra, dicho ensayo comprende las siguientes etapas: (i) poner en contacto dicha muestra con una cantidad conocida de un conformador no patogénico, (ii) disgregar cualesquiera de los agregados

eventualmente formados durante la etapa (i) y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de dicho conformador patógeno y dentro de la muestra. Preferiblemente, las etapas (i) y (ii) forman un ciclo que es repetido por lo menos dos veces antes de llevar a cabo la etapa (iii).

La invención suministra adicionalmente un método para identificar un compuesto que module la transición conformacional de la proteína subsayente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, comprende:

- (i) poner en contacto una cantidad conocida del conformador no patogénico con una cantidad conocida del conformador patogénico en la presencia y en la ausencia de dicho compuesto,
- (ii) disgregar los agregados eventualmente formados durante la etapa (i),
- (iii) determinar la cantidad del conformador patogénico en la presencia y en la ausencia de dicho compuesto.

La presente invención ha sido descrita con referencia a las modalidades específicas, pero el contenido de la descripción comprende todas las modificaciones y sustituciones, que pueden ser traídas

por una persona versada en la técnica sin salirse más allá del significado y propósito de las reivindicaciones.

La invención será ahora descrita por medio de los siguientes ejemplos, que no deben ser tomados como limitativos de la presente invención. Los ejemplos se refieren a las figuras especificadas de aquí en adelante.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

figura 1. representación esquemática de la conversión $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{SC}}$. La unidad infectiva de PrP^{SC} es un oligomérico en láminas β , que convierte el PrP^{C} integrándolo dentro del agregado en crecimiento, en donde este adquiere las propiedades asociadas con el PrP^{SC} .

Figura 2. Representación diagramático del procedimiento de amplificación cíclica. El sistema está basado en ciclos de incubación del PrP^{SC} en la presencia de exceso de PrP^{C} seguido por ciclos de sonicación. Durante los periodos de incubación, el PrP^{SC} oligomérico es magnificado por medio de incorporar PrP^{C} dentro del agregado en crecimiento, mientras que durante la sonicación los agregados son rotos con el propósito de

multiplicar las unidades de conversión. En la figura, dos ciclos de sonicación/incubación se muestran.

Figura 3. Amplificación del PrP^{sc} por ciclos de sonicación. Una pequeña cantidad de homogenato de cerebro con prurito lumbar que contiene PrP^{sc} fue incubado con homogenato de cerebro de rata saludable (pista 1, experimento de control) o con homogenato de cerebro de hámster saludable (pistas 2 y 3). La última muestra fue dividida en dos grupos una de las cuales fue sometida a cinco ciclos de incubación/sonicación (pista 3). La mitad de las anteriores muestras fueron cargadas directamente en un gel y marcadas para proteína total con Coomassie (panel A). La otra mitad fue tratada con PK y inmunosecada usando el anticuerpo 3 f4 anti PrP (panel B). El panel C muestra algunos controles en los cuales el homogenato de cerebro saludable fue incubado solo (pistas 1 y 2) o en la presencia de homogenato de cerebro con prurito lumbar diluido (pistas 3 y 4). La mitad de las muestras (pistas 2 y 4) fueron sometidas a cinco ciclos de sonicación/incubación. Las pitas 2, 3 y 4 fueron tratadas con proteínas acá.

Figura 4. Sensibilidad del sistema de amplificación cíclica. La concentración mínima del PrP^{Sc} que puede ser usada para detección después de amplificación fue estudiada por dilución seriada de el homogenato de cerebro con prurito lumbar e incubada con homogenato de cerebro de hámster saludable con o sin ciclos de sonicación. El panel A muestra el experimento de control en el cual el cerebro de hámster con prurito lumbar fue diluido seriadamente en homogenato de cerebro de rata. El panel B corresponde al experimento en el cual las diluciones seriales del cerebro de hámster con prurito lumbar fueron incubadas con cerebro de hámster saludable y sometidas a cinco ciclos de incubación/sonicación. La evaluación densitométrica de los inmunosecados en A y B se muestran en el panel C. Las diluciones fueron hechas considerando como material de partida el cerebro y fueron las siguientes: 100 (pista 1), 200 (pista 2), 400 (pista 3), 800 (pista 4), 1600 (pista 5) y 3200 (pista 6).

FIGURA 5. Relación entre la señal PrPres y el número de ciclos de amplificación. El homogenato de cerebro con prurito lumbar diluido fue incubado con un exceso de homogenato de cerebro de hámster saludable. Las muestras

fueron sometidas a 0, 5, 10, 20 o 40 ciclos y la señal PrPres evaluada por inmunosecado.

Figura 6. Amplificación de PrP^{sc} en muestras de sangre. La sangre de ratas heparinizada fue salpicada con homogenato de cerebro de hámster con prurito lumbar para alcanzar una dilución final de 10:1. Esta mezcla fue incubada durante 15 minutos a RT a temperatura ambiente. 10 diluciones seriales fueron hechas de este material usando sangre de ratas heparinizada. Las muestras fueron sometidas a 11 ciclos de incubación-sonicación y la señal PrPres fue evaluada por inmunosecado.

Figura 7: proteína Prion esta presente en estructuras lípidas. Las estructuras lípidas (también llamadas fracciones de membrana resistentes a detergente o DRM) fueron aisladas usad una modificación de los protocolos descritos anteriormente. Una centésima de mg de tejido de cerebro fue homogenizado en un ml de PBS que contenía 1% de tritón X-100 y 1X de cocktail completo de inhibidores de proteasa (Boehringer). El tejido fue homogenizado con 10 pasajes por aguja de jeringa 22G e incubados durante 30 minutos a 4°C en un agitador giratorio. La muestra fue diluida 1:2 en sucrosa de 60% y colocada en el fondo

de un tubo centrífugo. 7 ml de sacarosa al 35% fue colocada cuidadosamente sobre la muestra. 1,5 ml de sacarosa al 15% fue colocada o dejada descansar en la parte superior del gradiente. El tubo fue centrifugado a 150000g durante 18 horas a 4°C. Las estructuras lípidas flotaron hasta la interfase de sacarosa de 15% a 35% (panel A). Reacciones diferentes fueron recolectadas y analizadas por marcado o manchado de proteína total con nitrato de plata (panel B) y el inmunosecado para detectar el PrP (panel C). Para remover la sucrosa de las muestras la fracción de la estructura lipida fue recubierta lavada en PBS y centrifugada a 28000 rpm durante 1 hora a 4°C. Las pepitas fueron lavadas y resuspendidas en PBS que contenía 0,5% de triton X-100, 0,5% SDS y e inhibidores de proteasa. Toda la PrPC fue localizada en esta fracción (panel D).

Figura 8: Los factores necesarios para la amplificación están presentes en las estructuras lípidas. Las estructuras lípidas fueron aisladas del cerebro de hámster saludable como se describió en la figura 2 y mezcladas con 700 veces de dilución de PrPSc altamente purificado del cerebro del hámster con prurito lumbar. Las muestras fueron congeladas 8linea 3) amplificadas

durante 20 horas (línea 4). Las líneas 1 y 2 representan los mismos procedimientos pero usando el homogenato de cerebro total para amplificación.

Figura 9: Detección presintomática del PrPSc en cerebro de hámster. Los hámster fueron inoculados intracerebralmente con una solución salina (con un grupo de control) o con homogenato de cerebro con prurito lumbar diluidos 100 veces. Cada semana 4 hámster por grupos fueron sacrificados y sus cerebros fueron extraídos y homogenizados. La mitad de los cerebros fueron congelados inmediatamente (barras blancas) y la otra mitad suspendida a 20 ciclos de incubación barra sonicación (barras negras). Todas las muestras fueron tratadas con Pk e inmunosecadas. La intensidad de las bandas fue evaluada por densitometría. Cada barra representa el promedio de las muestras de 4 animales. Ninguna detección fue observada en ninguno de los cerebros de control sea con o sin amplificación y esos resultados no son mostrados en la figura.

Figura 10: Amplificación del PrPSc humano. Los estudios fueron hechos usando muestras de cerebro de 11 diferentes casos confirmados de CJD esporádica, lo mismo que 5 CJD

familiar y 4 controles de edades iguales, los cuales incluyeron pacientes afectados por otros desordenes neurológicos. Los cerebros fueron homogenizados y sometidos a 20 muestras de amplificación. Los resultados representativos de un control (A) y 3 diferentes CJD esporádicos (B) (1, 2, 3) se muestran en la figura.

Figura 11: Detección del PrPSc en la sangre después de a preparación de fantasmas de células de sangre. Los fantasmas de células a partir de 0,5 ml de sangre heparinizada que venían de hámster afectados con prurito lumbar y (Sc) y hámster saludables (C) fueron preparados y descritos en el texto. La mitad de las muestras no fueron sometidas a amplificación y la otra mitad fueron mezcladas con cerebros de hámster normal homogenato de cerebro de hámster normal y sometidas a 20 ciclos de amplificación. Todas las muestras fueron entonces tratadas con PK y analizadas por inmunosecados. Un experimento representativo se muestra en la figura.

Figura 12: Detección del PrPSc en la sangre después de la extracción sarkosil. 0,5 ml de sangre heparinizada que venia de hámster saludables (C) y Hámster afectados de prurito lumbar (Sc) fueron sometidos a extracción

sarkosil como se describió en el texto. La mitad de las muestras no fueron sometidas a amplificación y la otra mitad fueron mezcladas con homogenato de cerebro de hámster normal y sometidas a 20 ciclos de amplificación. Todas las muestras fueron tratadas con PK y analizadas por inmunosecados. Una muestra representativa de control de animales y dos de animales afectados con prurito lumbar se muestran en la figura.

Figura 13: Detección del PrPSc en sangre después de la purificación de las estructuras lipídicas. Las estructuras lipídicas fueron extraídas como se describió en el texto a partir de 0,5 ml de sangre heparinizada que venia de hámster saludable (C) Y hámster afectados con prurito lumbar (Sc). La mitad de las muestras no fueron sometidas a amplificación y la otra mitad fueron mezcladas con homogenatos de cerebro de hámster normal y sometidas a 20 ciclos de amplificación. Todas las muestras fueron tratadas con PK y analizadas por inmunosecados. Una muestra representativa de los animales de control y 2 para animales afectados con prurito lumbar se muestran en la figura.

Figura 14: Detección del PrP^{Sc} en sangre después de preparación de recubrimientos de carga. La fracción de recubrimiento de carga de sangre fue separada por centrifugación a partir de 0,5 ml de sangre heparinizada que venia de hámster saludables (C) y hámster afectados con prurito lumbar (Sc). La mitad de las muestras no fueron sometidas a amplificación y la otra mitad fueron mezcladas con homogenato de cerebro de hámster normal y sometidas a 20 ciclos de amplificación. Todas las muestras fueron tratadas con PK y analizadas por inmunosecado. Un experimento representativo se muestra en la figura.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Amplificación de PrP resistente PK por conversión cíclica in Vitro.

El homogenato de cerebro de hámster extraído de animales afectados con prurito lumbar fue diluido bajo la señal de PrP^{Sc} fue vagamente detectada por inmunosecado después del tratamiento con proteinasa K (PK) (figura 3 B, pista 1). El tratamiento con PK se hace rutinariamente

en el campo para distinguir entre las formas normales y anormales de PrP, que difiere en su sensibilidad a la degradación de proteasa (PrP^{sc} es parcialmente resistente y PrP^c es degradada) (Prusine, 1991). La forma de PrP que es resistente al tratamiento PK será llamada de ahora en adelante PrPres. La incubación de una muestra o homogenato de cerebro con prurito lumbar diluido con un homogenato de cerebro de hámster saludable que contiene un exceso de PrP^c, resultó en el incremento en la señal PrPres (figura 3 B, pista 2).

Esto sugiere que la incubación de los dos homogenatos de cerebro resultó en la conversión de PrP^c en PrP^{sc}. Cuando las muestras fueron incubadas bajo las mismas condiciones pero sometidas a 5 ciclos de incubación/sonicación la cantidad de PrPres fue incrementada dramáticamente (figura 3 B, pista 3). El análisis densitométrico de los inmunosecados indica que la señal PrPres fue incrementada 84 veces por la amplificación cíclica en comparación con la señal PrPres presentada en el homogenato de cerebro con prurito lumbar diluido (pista 1).

La conversión es dependiente de la presencia de PrP^{sc} ya que ningún PrPres fue observado cuando el homogenato de cerebro de hámster normal fue incubado solo bajo las mismas condiciones sea con o sin sonicación (figura 3C, pista 2). Para determinar los artefactos de la transferencia, la proteína total cargada en el gel fue mantenida constante (figura 3 A) agregando homogenato de cerebro de rata a la muestra de prurito lumbar diluida, tomando la ventaja del hecho de que el PrP de rata no es detectado por el anticuerpo usado en el inmunosecado.

EJEMPLO 2

Sensibilidad de detección por amplificación cíclica.

Para evaluar la mínima concentración de PrP^{sc} que puede ser usada para la detección después de la amplificación, el homogenato de cerebro con prurito lumbar fue diluido seriadamente directamente en homogenato de cerebro de hámster saludable. Sin incubación, la señal de PrPres disminuyó progresivamente hasta que fue completamente indetectable en la dilución numero 800 (figura 4A, C). En contraste con la misma dilución fue incubado con homogenato de cerebro de

hámster saludable y sometido a 5 ciclos de incubación/sonicación, el límite de detección PrPres fue disminuido dramáticamente. Aún así señal clara fue fácilmente detectable aún en la dilución 3200 (figura 4B, C).

EJEMPLO 3

Incremento exponencial en el PrPres con número de ciclos

Para estudiarse la intensidad de la señal PrPres después de la amplificación cíclica depende del número de ciclos de incubación/sonicación llevados a cabo, el homogenato de cerebro con prurito lumbar diluido fue incubado con un exceso de homogenato de cerebro de hámster saludable. Las muestras fueron sometidas a 0,5, 10, 20, 0 40 ciclos y la señal PrPres fue evaluada por inmunosecado. Los niveles de PrPres incrementados exponencialmente con el número de ciclos de incubación/sonicación (figura 5). Este resultado sugiere que al incrementar el número de ciclos se puede disminuir adicionalmente los límites de detección.

EJEMPLO 4

Experimentos de sonicación en muestras de sangre por rociado con PrP^{sc}.

La sangre de rata heparinizada fue rociada con homogenato de cerebro de hámster con prurito lumbar para alcanzar una dilución final de 10:1. Esta mezcla fue incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente.

10 diluciones seriales fueron hechas de este material usando sangre de rata heparinizada. 50 µl de cada dilución fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. El plasma fue separado de los granitos, 10 µl de plasma fueron mezclados en 50 µl de homogenato de cerebro de hámster saludable que contenía el sustrato de PrP^C para la reacción de conversión. Las muestras fueron sometidas a 11 ciclos de incubación/sonicación. Como un control las mismas muestras fueron mezcladas en 50 µl de homogenato de cerebro de hámster saludable y mantenidas a -20°C hasta que se requirieron. 15 µl de muestras sonicadas y de control fueron digeridas con proteinasa K, separadas por SDS-PAGE y analizadas por el western blotting y PrP^{sc} fue detectado como se describió en la sección "métodos". Los resultados son reportados en la figura 6. Estos resultados muestran un claro incremento en la detección

de la proteína luego del procedimiento y amplificación que es especialmente evidente en concentraciones bajas de PrP^{Sc} (por ejemplo en la dilución 1280). Si se comparan estos resultados con aquellos obtenidos sobre tejido de cerebro infectado, tenemos la confirmación de que el proceso de amplificación trabaja similarmente en la sangre.

EJEMPLO 5

Producción alta con amplificación cíclica.

El uso de un sonicador tradicional de probeta única impone un problema de manejo para las muchas muestras que se tiene que hacer simultáneamente, como lo requiere un ensayo de diagnóstico. Hemos adaptado el sistema de amplificación cíclica a un sonicador de microplaca de formato de 96 pozos (Misonix 431MP-20Khz), que suministra sonicación a todos los pozos al mismo tiempo y puede ser programado para operación automática. Esta mejora no solamente disminuye el tiempo de procesamiento, sino también impide la pérdida de material cuando es comparado usando una probeta única. La contaminación cruzada es eliminada ya que no ha una intrusión de probeta directa

dentro de la muestra. Esto último es esencial para manejar muestras infecciosas y minimizar los resultados positivos falsos. Los 20 ciclos de 1 hora de incubación seguidos por pulsos de sonicación a 15 segundos o a 30 segundos dieron una amplificación significativa de la señal PrPres, similar a la observada previamente usando un sonicador tradicional.

EJEMPLO 6

Los factores necesarios para la amplificación están en una fracción de membrana resistente al detergente.

La localización subcelular en donde la conversión PrP ocurre durante la patogénesis de la enfermedad no ha sido determinada. Sin embargo, tanto el PrP^C y el PrP^{sc} han sido reportados de que están localizados en una región especial de la membrana de plasma que es resistente a tratamientos con detergente suave debido al contenido relativamente alto de colesterol y glicosfingolípidos (Vey et al, 1996; Harmey et al., 1995). Estos dominios de membrana son llamados estructuras lipidas o membranas resistentes a detergente (DRM) y son ricas en proteínas de señalización,

receptores y proteínas ancladas con GPI. Hemos confirmado que el 100% del PrPC en cerebro esta ligado a esta fracción, la cual contiene menos del 2% de las proteínas totales (figura 7). Así, la simple etapa de aislar estructuras lípidas permite un enriquecimiento dramático en el PrP^C. Resultados similares fueron obtenidos en el aislamiento de estructuras lípidas de homogenato de cerebro con prurito lumbar, en el cual el PrP^{Sc} fue recuperado en las estructuras.

Para evaluar si los factores requeridos para amplificar PrP están contenidos en las estructuras lípidas, nosotros las purificamos a partir del cerebro de animales saludables y se agregaron cantidades pequeñas de PrP^{Sc} extraído de cerebro de animales enfermos. La amplificación en las estructuras lípidas fue equivalente a la obtenida con el extracto de cerebro total (figura 8), ya que la cantidad de PrP^{Sc} producida después de amplificación fue similar en ambas condiciones. Este resultado indica que todos los elementos requeridos para la conversión PrP y la amplificación (incluido el llamado "factor x"; (Telling et al., 1995) están contenidos en este dominio de membrana especializado. Por lo tanto, la identificación y aislamiento de los factores requeridos

para la conversión PrP debe ser posible por la separación especial de proteínas a partir de las estructuras lípidas y monitorear su actividad por amplificación cíclica. En adición las estructuras lípidas constituyen un reemplazo posible para el uso de homogenato de cerebro total en el procedimiento de amplificación cíclica como una fuente de sustrato PrP^C y otros factores endógenos implicados en la conversión.

EJEMPLO 7

Diagnóstico presintomático en animales experimentales

Para estudiar el diagnóstico presintomático de hámster experimentalmente infectados con prurito lumbar, se tamizaron 88 muestras de cerebro en diferentes etapas durante la fase preclínica, la mitad de las cuales fueron controles no infectados. El cerebro fue tomada cada cuatro semanas (4 por cada grupo) y sometidos a 20 ciclos de amplificación. Los resultados mostraron que el método es capaz de detectar la proteína anormal en el cerebro aún en la segunda semana después de la inoculación, mucho antes de que los animales desarrollen cualquier síntoma (figura 9). Sin la amplificación cíclica el PrP^{sc} se

detecto en el cerebro en la semana sexta después de infección, solamente cuatro semanas antes la aparición de la aparición de la enfermedad clínica. Ninguna amplificación fue detectada en ninguno de los animales de control que no estaban infectados con prurito lumbar.

EJEMPLO 8

Aplicación de amplificación cíclica a muestra de cerebro humano

Para analizar la aplicación del procedimiento de amplificación cíclica a muestra humanas del cerebro de personas (cadáveres) afectados con enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), incubamos homogenatos de cerebro de diversos pacientes con CJD (o controles normales) con homogenato de cerebros humanos saludables y se llevó a cabo el procedimiento de amplificación cíclica. Los resultados muestran que hubo una amplificación significativa en las muestras del cerebro con CJD esporádico analizado y en ninguna de las cuatro muestras de control (figura 10). De manera muy interesante, la amplificación fue obtenida sólo en las muestras que habían mostrado tener infección y por lo tanto capaces de

convertir el PrP^C no mutado, mientras que no trabajó con la proteína mutante que no es capaz de convertir la proteína tipo natural. Estos datos soportan la conclusión de que el método trabaja en muestras humanas similarmente como se mostró para muestras animales.

EJEMPLO 9

Diagnóstico en sangre por amplificación cíclica

Los estudios de infectividad sugieren que al menos en animales experimentales el PrP^{sc} está presente en la sangre en animales en la etapa tardía (Brown et al., 2001). Con el fin de efectuar la detección en sangre del PrP^{sc} por amplificación cíclica, nosotros preferimos primero concentrar de manera selectiva la proteína a ser detectada y eliminar el resto de las proteínas de sangre abundante, tales como albúmina y hemoglobina. Los siguientes cuatro protocolos diferentes se han mostrado efectivos para este propósito.

1. Preparación de fantasmas de células de sangre

La sangre de hámster heparinizada fue centrifugada a 2.500 rpm a 4° C. El plasma y la fracción celular fueron separadas y congeladas a -80° C hasta que se necesitara. 0,5 ml de empaques de células de sangre fueron lavados 3 veces en 12 a 15 volúmenes de PBS frío, fresco, pH 7,6. Las células fueron resuspendidas en 12 a 15 volúmenes de amortiguador de fosfato de sodio 20 mOsM pH 7,6 y agitado suavemente durante 20 minutos sobre hielo, luego fue centrifugado a 30.000 rpm durante 10 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado, los granitos fueron lavados 3 veces con una carga de amortiguador de fosfato de sodio 20mOsM. Los granitos finales fueron resuspendidos en PBS que contenía 0,5 % de Triton X-100, 0,5 % SDS e inhibidores de proteasa. 15 µl de esta suspensión fue mezclado v/v con 10% de homogenato de cerebro de hámster saludable y sometido a 20 ciclos de incubación/sonicación. 20 µl de las muestras sonicadas y de control fueron digeridas con proteínas aca, separadas por SDS-PAGE y analizadas por el western blotting y el PrP^C fue detectad como se describió en la sección "métodos". Los resultados muestran la detección del PrP^{Sc} después del procedimiento de amplificación en las muestras de sangre a partir de animales infectados (figura 11). En las muestras de sangre a partir de

animales no infectados no hubo ninguna señal después de la amplificación. Sin amplificación no s posible detectar la presencia de PrP^{sc} figura (11).

2. Extracción Sarkosil

La sangre de hámster heparinizada fue centrifugada a 2500 rpm a 4°C. 0,5 ml de paquetes de células de sangre fueron diluidos (v/v) en 20% de sarkosil e incubados durante 30 minutos. La muestra fue centrifugada en Beckman TL100 ultra centrifugada a 85,000 rpm durante 2 horas a 4°C. Los granitos fueron lavados y resuspendidos en PBS que contenía 0,5% de Triton X-100 0,5% de SDS e inhibidores de proteasa. 15 µl de esta suspensión fue mezclada de v/v con 105 de homogenato de cerebro de hámster saludable y sometida a 20 ciclos de incubación/sonicacion. 20 µl de las muestras sonicadas y de control fueron digeridas con proteinaza k separadas por SDS-PAGE y analizadas por western blotting y el PrP^{sc} fue detectado como se describió en la sección "métodos". Los resultados muestran la detección del PrP^{sc} después del procedimiento de amplificación en las muestras de sangre de animales infectados (figura 12). Las muestras de sangre de animales no infectados no hubo señal después

de la amplificación. Sin amplificación no es posible detectar la presencia de PrP^{Sc} (figura 12).

3. Extracción de estructuras de lípidos.

La sangre de hámster heparinizada fue centrifugada a 2,500 rpm a 4°C. 0,5 ml de paquetes de células de sangre fueron diluidos (v/v) en PBS en 1% de Triton X-100 e incubados durante 30 minutos a 4°C. La muestra fue diluida 1:2 en sucrosa al 60% y colocada en el fondo de un tubo centrífugo. 7 ml de sucrosa al 35% fueron colocados cuidadosamente sobre la muestra. 1,5 ml de sucrosa al 15% fue cubierta sobre la parte superior del gradiente. El tubo fue centrifugado a 150,000 rpm durante 18 horas a 4°C. Las estructuras lipídicas fueron recuperadas lavadas en PBS y centrifugadas a 28,000 rpm durante 1 hora a 4°C. Los granitos fueron lavados y resuspendidos en PBS que contenía 0,5% de Triton X-100, 0,5% DE SDS e inhibidores de proteasa. 15µl de esta suspensión fue mezclada v/v con 10% de homogenato de cerebro de hámster saludable y sometido a 20 ciclos de incubación/sonicación. 20Ml de las muestras sonicadas y de control fueron digeridas con proteínas k, separadas por SDS-PAGE y analizadas por western blotting y el PrP^{Sc} fue detectado según se describió en la sección "métodos".

Los resultados muestran que la detección del PrP^{sc} después del procedimiento de amplificación en las muestras de sangre a partir de animales infectados (figura 13). En las muestras de sangre de animales no infectados no hubo señal después de la amplificación. Sin amplificación no es posible detectar la presencia de PrP^{sc} (figura 13).

4. Preparación de recubrimiento de carga

La sangre de hámster heparinizada fue centrifugada a 1,500 rpm a 4°C durante 10 minutos. El recubrimiento de carga fue cuidadosamente recuperado usando procedimientos estándar y mantenido a -80°C hasta que se requirió. El recubrimiento de carga congelado fue resuspendido en PBS que contenía 0,5% de Triton X-100, 0,5% de SDS e inhibidores de proteasa. 15µl de esta suspensión fue mezclada v/v con 10% de homogenato de cerebro de hámster saludable y sometido a 20 ciclos de incubación/sonicación. 20 µl de las muestras sonicadas y de control fueron digeridas con proteínas K separadas por SDS-PAGE y analizadas por western blotting y el PrP^{sc} fue detectado según se describió "métodos". Los resultados

muestran que la detección de PrP^{sc} después del procedimiento de amplificación en las muestras de sangre de animales infectados (figura 14). Las muestras de sangre de animales no infectados no hubo señal después de la amplificación. Sin amplificación no es posible detectar la presencia de PrP^{sc} (figura 14).

MÉTODOS

Preparación de homogenatos de cerebro.

Los cerebros de hámster Goleen Syrian saludables o infectados con la sepa de prurito lumbar 263 K adaptada fueron obtenidos después de decapitación y congelamiento inmediato en hielo seco y mantenidos a -80°C hasta que se usaron. Los HOMOGENATOS fueron homogenizados en PBS y los inhibidores de proteasa 8P/V) 10%. Detergentes (0,5% Triton X-100, 0,05% de SDS) fueron agregados y clarificados con centrifugación de baja velocidad (10,000 rpm) durante 1 minuto.

Preparación de las muestras y amplificación cíclica

Las diluciones seriales de los homogenatos de cerebro con prurito lumbar fueron hechas directamente en el homogenato de cerebro saludable. 30 Ml de estas diluciones fueron incubadas a 37°C con agitación. Cada hora un ciclo de sonicación (5 pulsos de un segundo cada uno) fue hecha usando un microsonicador con la aguja inmersa en la muestra. Estos ciclos fueron repetidos varias veces (50 a 20).

Detección de PrP^{sc}

Las muestras fueron digeridas con Pk 100 µg /ml durante 90 minutos a 37°C. La reacción fue detenida con PMSF 50 mM. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE (bajo condiciones desnaturalizadas) el electro secado en membrana de nitrocelulosa en CAPS o carga de transferencia de tris-glicina con 10% de metanol durante 45 minutos a 400 mA. El manchado de la proteína total reversible fue llevado a cabo antes del bloqueo de la membrana con 5% de leche no grasosa. De hay en adelante la membrana fue incubada durante 2 horas con el anticuerpo 3F4 monoclonal (1:50,000). 4 lavados de 5 minutos cada uno fueron llevados a cabo con PBS, 0,3%

Tween 20 antes de la incubación con el anticuerpo antiratón secundario marcado con peroxidasa de horseradish (1:5,000) durante 1 hora. Después del lavado, la reactividad en la membrana fue desarrollada con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

REFERENCIAS

- Aguzzi, A. (1997). Neuro-immune connection in the spread of prions in the body? *Lancet* 349, 742-744.
- Baldwin, M.A., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1995). Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations. *J. Biol. Chem.* 270, 19197-19200.
- Baslet et al., *Cell* 46:417-428 (1986)
- Brown, P., Cervenakova, L., and Diringer, H. (2001). Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Lab. Clin. Invest.* 137, 5-13.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., and Suttie, A. (1997). Transmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498-501.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J.M., Bugiani, O., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J.J., Ironside, J.W., Jellinger, K., Kretzschmar, H.A., Lantos, P.L., Masullo, C., Schlote, W., Tateishi, J., and Weller, R.O. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (Prion diseases). *Brain Pathol.* 5, 459-466.
- Carrell, R.W., Lomas D.A. (1997). Conformational diseases. *Lancet*, 350, 134-138.
- Caughey, B., Raymond, G.J., Kocisko, D.A., and Lansbury, P.T., Jr. (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.* 71, 4107-4110.
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J., and Prusiner, S.B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* 264, 530-531.

- Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 793-819.
- Cousens, S.N., Vynnycky, E., Zeidler, M., Will, R.G., and Smith, R.G. (1997). Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 385, 197-198.
- 5 Gabriel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9097-9101 (1992)
- Galvez, S. and Cartier, L. (1983). Computed tomography findings in 15 cases of Creutzfeldt-Jakob disease with histological verification. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47, 1244.
- Goldmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2476-2480 (1990).
- Goldmann et al., *J. Gen. Virol.* 72:201-204 (1991).
- 10 Harney, J.H., Doyle, D., Brown, V., and Rogers, M.S. (1995). The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 753-759.
- Harris et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7664-7668 (1991).
- Hill, A.F., Zeidler, M., Ironside, J.W., and Collinge, J. (1997). Diagnosis of new variant
- 15 Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99-100.
- Hsich, G., Kenney, K., Gibbs, C.J., Jr., Lee, K.H., and Harrington, M.G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Eng. J. Med.* 335, 924.
- Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of
- 20 amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.
- Jimii, T., Wakayama, Y., Shibuya, S., and et al (1992). High levels of nervous system specific protein in the cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Chim. Acta* 211, 37.

- Kawashima, T., Furukawa, H., Doh-ura, K., and Iwaki, T. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 350, 68-69.
- Kascsak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fersko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringer H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated
5 fibril proteins. *J. Virol.*, 61, 3688-3693.
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474.
- Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T., Jr., and Caughey, B.
10 (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3923-3927.
- Kretzschmar et al., *DNA* 5:315-324 (1986).
- Kretzschmar et al., *J. Gen. Virol.* 73:2757-2761 (1992).
- Locht et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6372-6376 (1986).
- 15 Onofrii, M., Fulgente, T., Gambi, D., and Macchi, G. (1993). Early MRI findings in Creutzfeld-Jakob disease. *J. Neurol.* 240, 423.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Njuyen, J., Gassett, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., and Prusiner, S.B. (1993). Conversion of alpha-helices into β -sheets features in the formation of scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90, 10962-10966.
- 20 Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.
- Roos, R., Gajdusek, D.C., and Gibbs, C.J., Jr. (1973). The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 96, 1-20.

- Saborio, G.P., Soto, C., Kascsak, R.J., Levy, E., Kascsak, R., Harris, D.A., and Frangione, B. (1999). Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 470-475.
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB, (1998).
 5 Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157-1165.
- Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. (1993), Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells., *J Cell Biol.* Aug;122(4):789-807
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochem.* 32, 1991-2002.
- Steinhoff, B.J., Racker, S., Herrendorf, G., and et al (1996). Accuracy and reliability of
 15 periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 53, 162.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.
- 20 Martin Vey et al. (1996) , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14945-9
- Weber, T., Otto, M., Bodemer, M., and Zerr, I. (1997). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and related human spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.* 51, 381-387.
- Westaway et al., *Genes Dev.* 8:959-969 (1994).
- WHO/EMC/ZDI/98.9, Global Surveillance, Diagnosis and Therapy of Human
 25 Transmissible Spongiform Encephalopathies: Report of a WHO Consultation, Geneva, Switzerland 9-11 February 1998, WHO.

REIVINDICACIONES

① Un método para el diagnóstico o detección de una enfermedad conformacional la cual esta caracterizada por una transición conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, por medio de ensayar un marcador de dicha enfermedad dentro de una muestra, dicho método comprende:

(i) poner en contacto dicha muestra con una cantidad del conformador no patogénico;

(ii) disgregar cualesquier agregado eventualmente formado durante la etapa (i), y

(iii) determinar la presencia y/o cantidad de dicho conformador patogénico dentro de la muestra, el conformador patogénico es un marcador para la presencia de dicha enfermedad.

② El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa (i) comprende la etapa (ia) de incubar dicha muestra (conformador no patogénico).

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las etapas (ia) y (ii) forman un ciclo que es repetido al menos 2 veces antes de llevar a cabo la etapa (iii).
4. El método de la reivindicación 3, en donde el ciclo repetido entre 5 a 40 veces antes de llevar a cabo la etapa (iii).
- 5.) El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la etapa (i) se lleva a cabo bajo condiciones fisiológicas.
- 6.) El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la cantidad de conformador no patogénico en la etapa (i) es una cantidad en exceso.
- 7.) El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la enfermedad conformacional es una enfermedad conformacional transmisibile.
- 8.) El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra al ser analizada esta

sometida a un pre tratamiento para concentrar selectivamente el conformador patogénico en la muestra.

9. El metodo de la reivindicación 8, en donde el conformador patogenico es PrPSC y el pre tratamiento es la extracción de la muestra de una fracción que es insoluble en detergentes suaves.

10. Un ensayo para un marcador de una enfermedad conformativa que es caracterizada por una transición conformativa de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, dentro de una muestra, dicho ensayo comprende las siguientes etapas: (i) poner en contacto dicha muestra con una cantidad de conformador no patogénico; (ii) disgregar cualesquier agregado eventualmente formado durante la etapa (i); y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de dicho conformador patogénico dentro de la muestra, el conformador patogénico es un marcador para la presencia de dicha enfermedad.

11. El ensayo de la reivindicación 10, en donde la etapa (i) comprende la etapa (ia) e incubar dicha muestra/conformador no patogénico.

12. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, en donde las etapas (ia) y (ii) forman un ciclo que es repetido al menos dos veces antes de llevar a cabo la etapa (iii).

13. Un kit de diagnostico para ser usado en el ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que comprende una cantidad conocida de un conformador no patogénico.

14. Un kit de diagnostico según la reivindicación 13, que adicionalmente comprende una placa micro titulo multipozo y un sonicador multipozo.

15. Un método para identificar un compuesto que modula la transición conformacional de una proteína subyacente entre un conformador no patogénico y uno patogénico, comprende:

- (i) poner en contacto una cantidad del conformador no patogénico con una cantidad del conformador patogénico (a) en la

presencia de dicho compuesto y (b) en la ausencia de dicho compuesto;

(ii) disgregar cualesquier agregado eventualmente formado durante la etapa (i);

(iii) determinar la cantidad del formador patogénico (a) en la presencia de dicho compuesto y (b) en la ausencia de dicho compuesto.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15 o el ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el conformador patogénico es PrP^{Sc} el conformador no patogénico es PrP^C y la proteína subyacente es la proteína Prion.

17. Un método para detectar la presencia de una forma patogénica de proteína prion dentro de una muestra comprende:

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de la proteína prion no patogénica;

(ia) incubar la muestra/proteína prion no patogénica;

(ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);

repetir las etapas (ia)-(ii) 2 o mas veces; y luego

(iii) determinar la presencia y/o cantidad de proteína-patogénica dentro de la muestra.

18. Un método para el diagnóstico de CJD dentro de un paciente, comprende:

tomar una muestra del paciente;

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de proteína PrP^C;

(ia) incubar la muestra para/proteína PrP^C;

(ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);

repetir las etapas (ia)-(ii) dos o mas veces; y luego

(iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} dentro de la muestra.

19. Un método para detectar la presencia de una forma patogénica de la proteína β -amiloide dentro de una muestra comprende:

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de la proteína β -amiloide no patogénica;

(ia) incubar la muestra/proteína β -amiloide no patogénica;

(ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);

repetir las etapas (ia)-(ii) dos o mas veces; y luego

(iii) determinar la presencia y/o cantidad de proteína β -amiloide patogénica dentro de la muestra.

20. Un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende:

tomar una muestra del paciente;

(i) poner en contacto la muestra con una cantidad de la proteína β -amiloide no patogénica;

(ia) incubar la muestra/proteína β -amiloide no patogénica;

(ii) disgregar cualesquier agregados formados durante la etapa (ia);

repetir las etapas (ia)-(ii) dos o mas veces; y luego

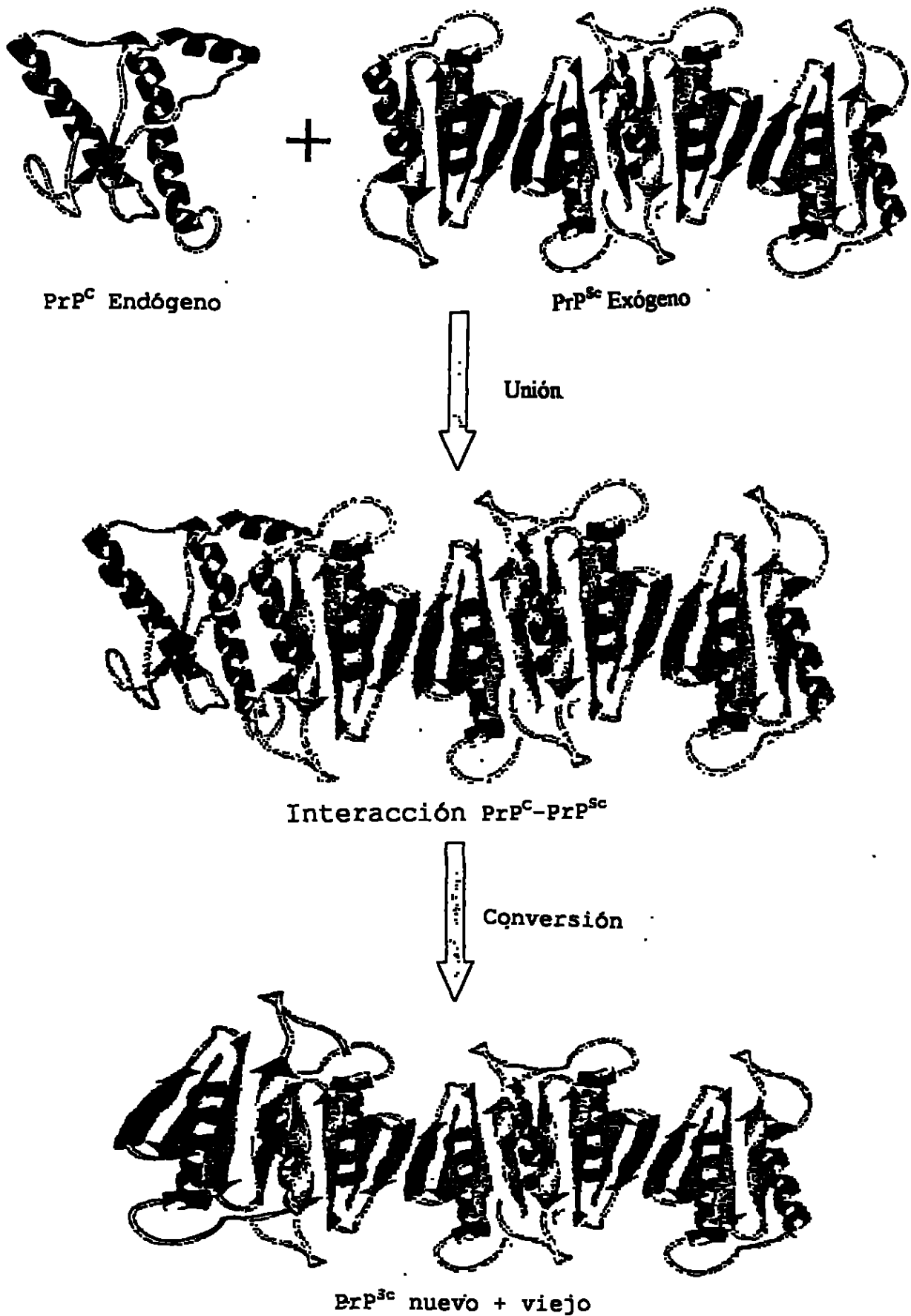
(iii) determinar la presencia y/o cantidad de proteína β -amiloide patogénica dentro de la muestra.

21. Un aparato para ser usado en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15 o el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

22. El aparato usado en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15 o el ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende una placa micro titulo, un sonicador multipozo y una cantidad de un conformador no patogénico.

1/13

FIG. 1

Representación esquemática de la conversión $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ 

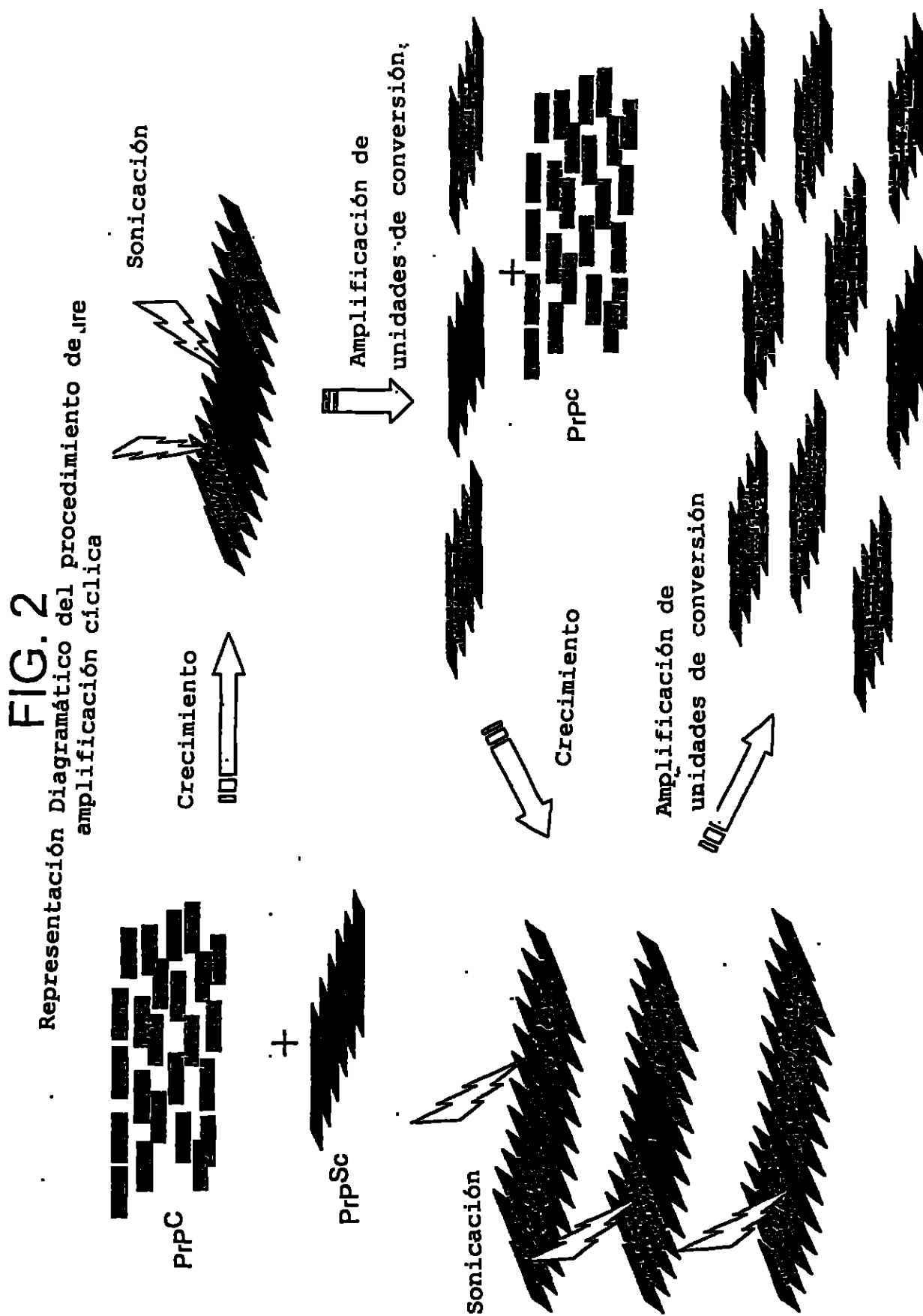


FIG. 3
Amplificación de Prp^{sc} por ciclos de sonicación

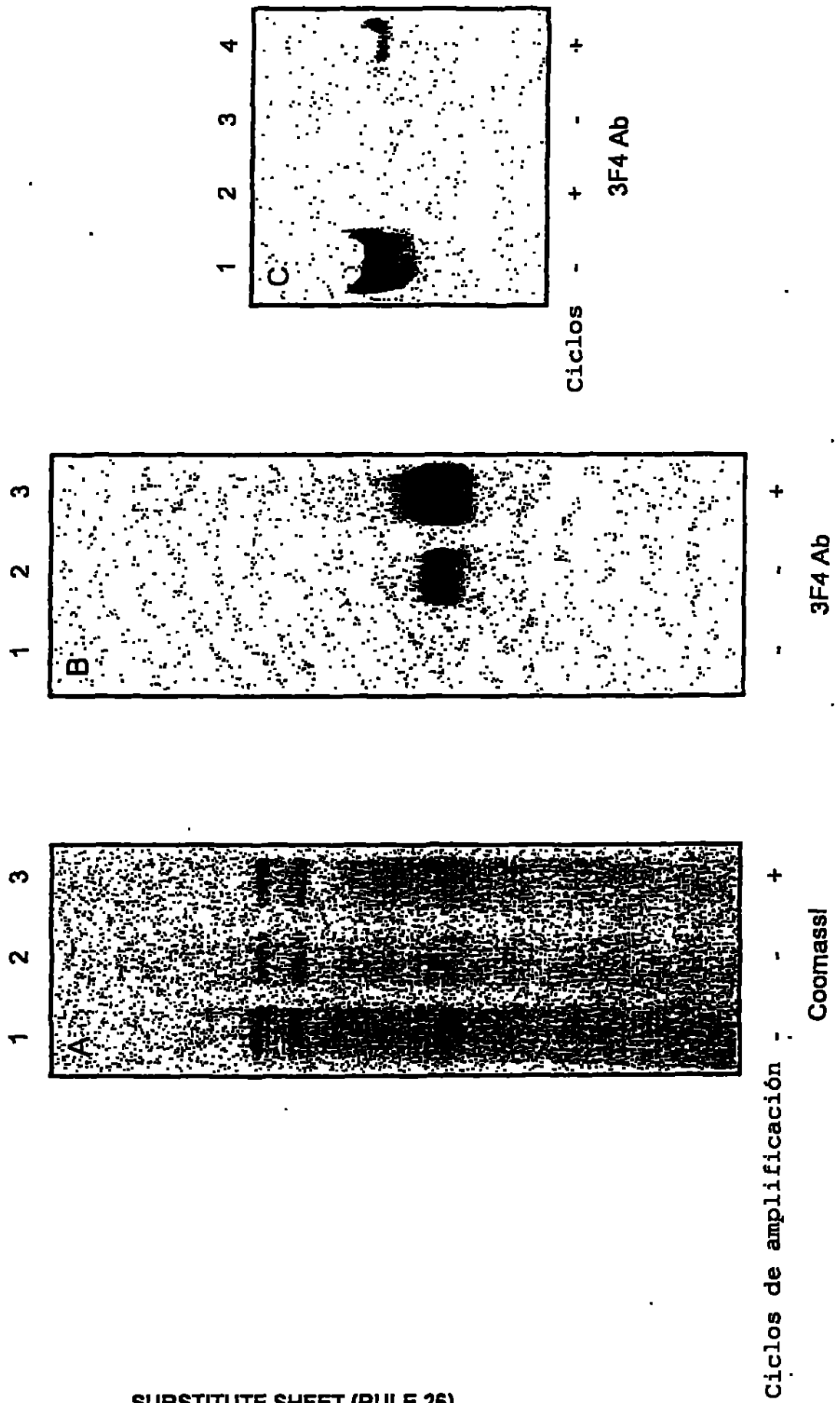


FIG. 4

Sensibilidad del sistema de amplificación cíclica

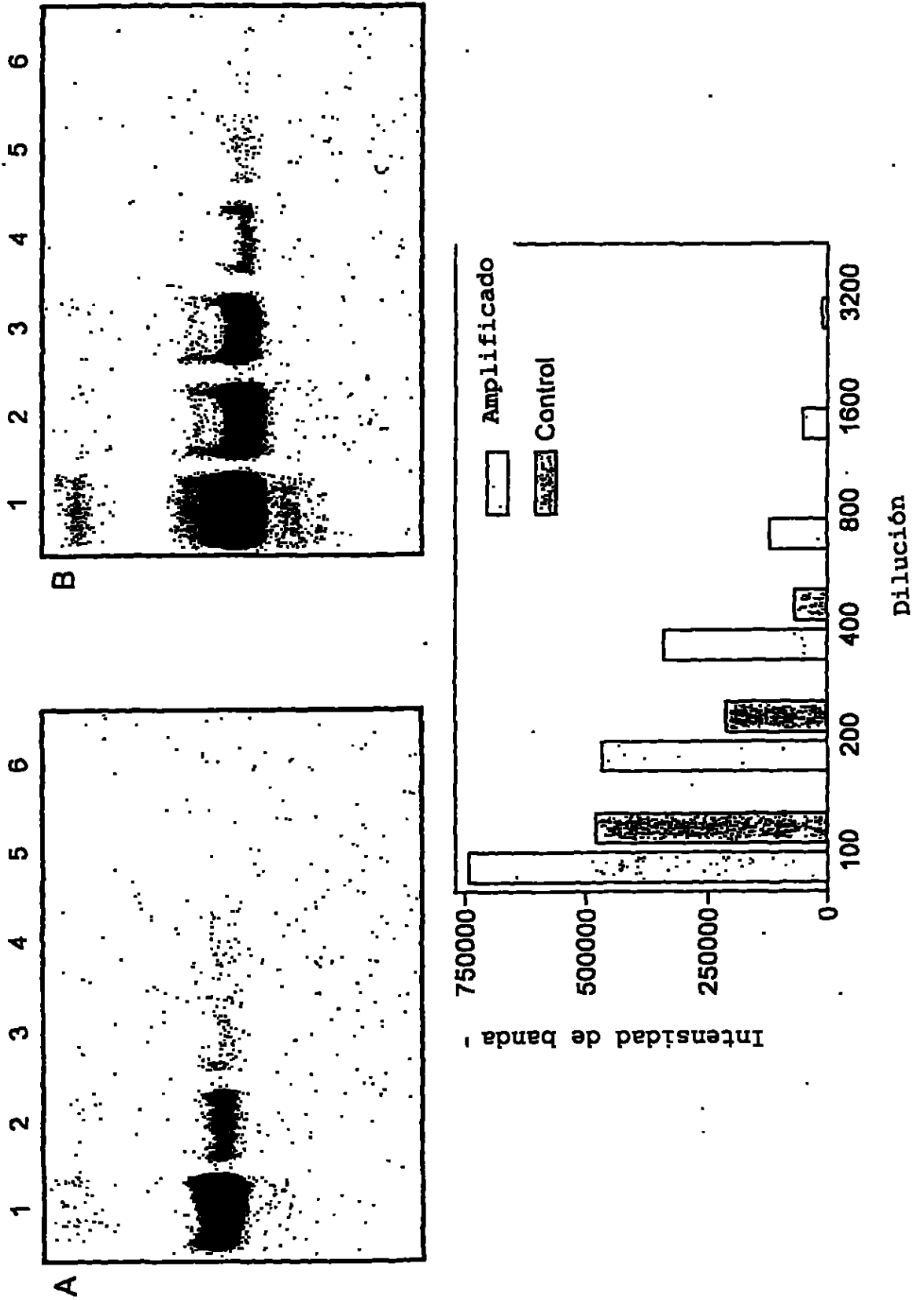


FIG. 5

Relación entre la señal PrPres y el número de ciclos de
amplificación

Homogenato de cerebro con prurito lumbar diluido 10⁻² en homogenato
de cerebro de hámster saludable

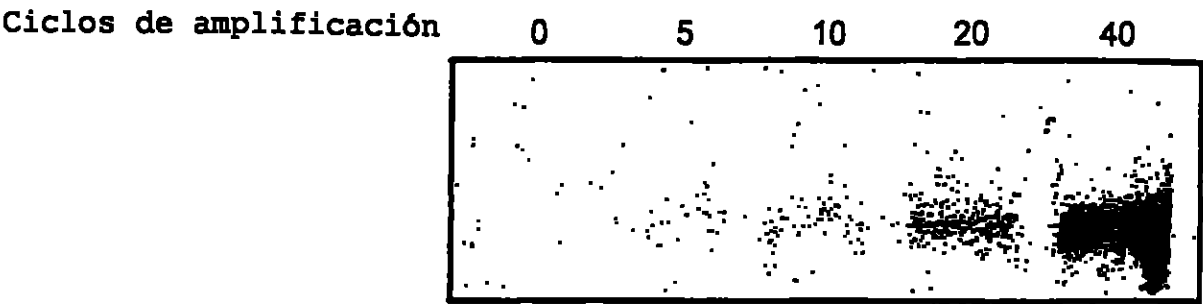
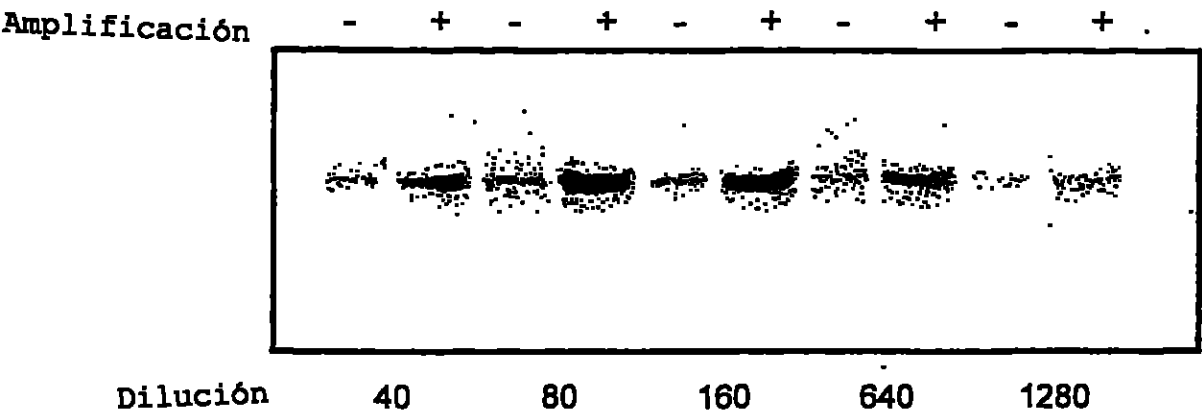


FIG. 6

Amplificación de PrP^{Sc} en la sangre



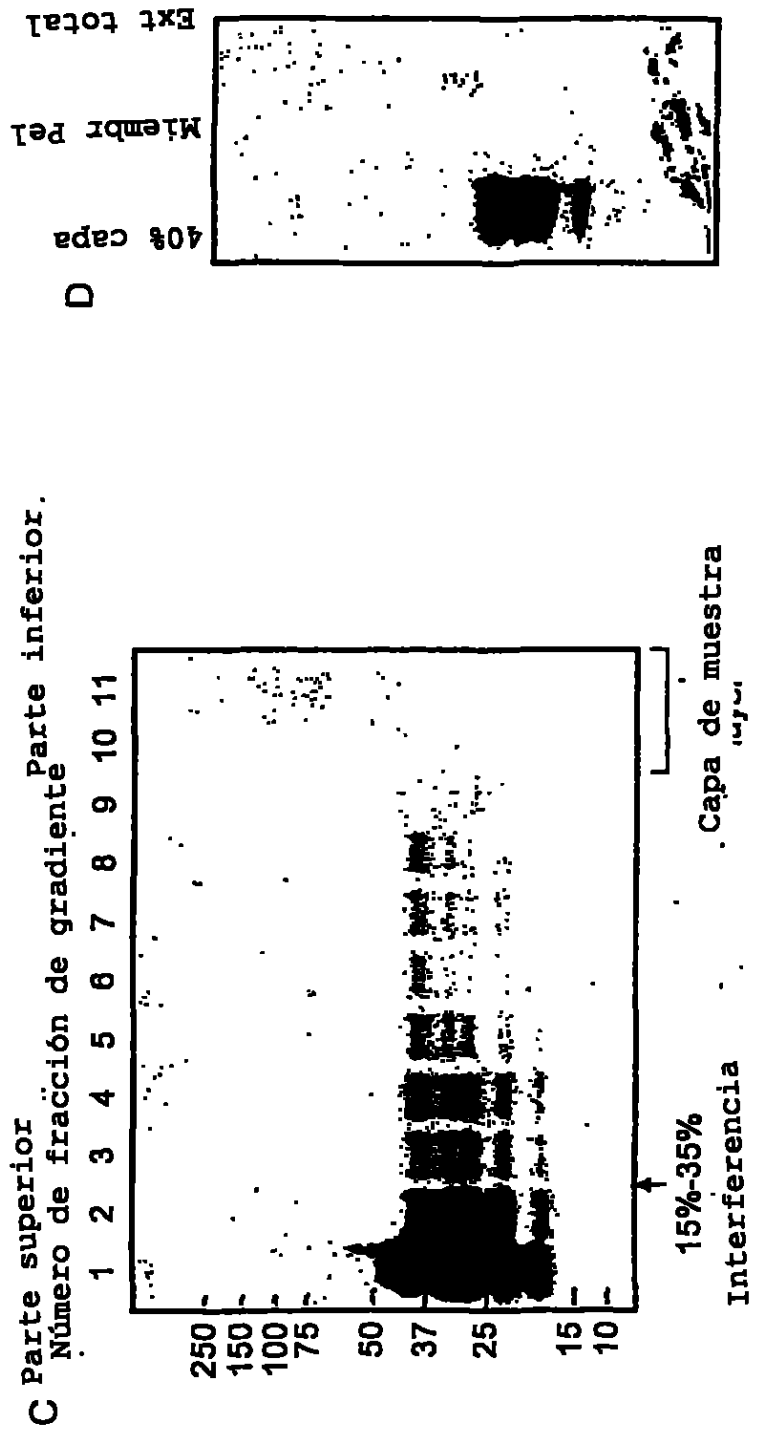
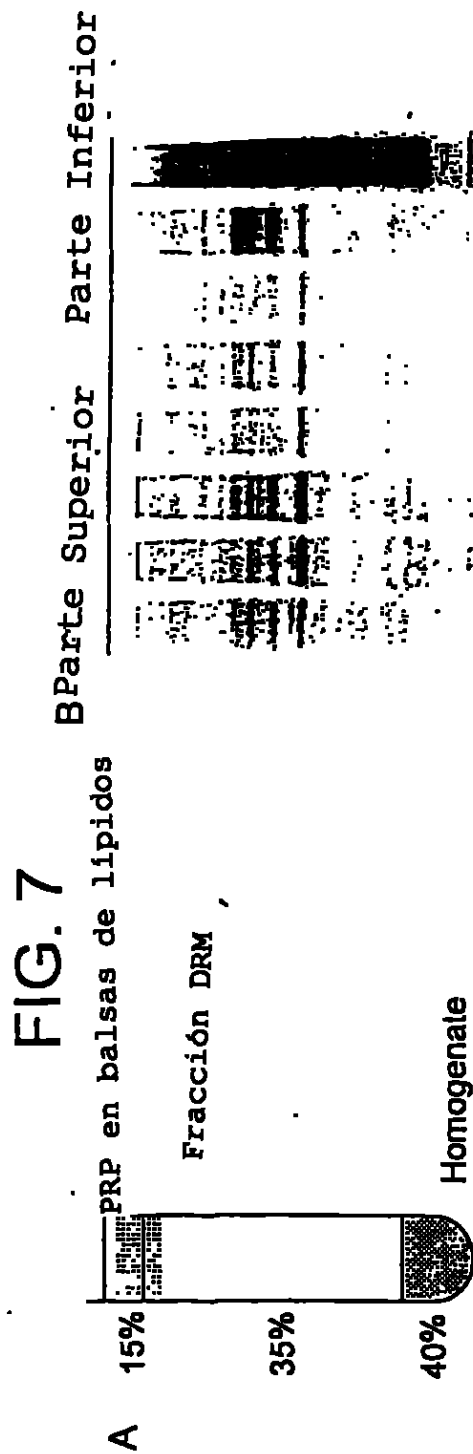


FIG. 8

Los elementos necesarios para la amplificación etab en balsas
de lípido

Prp^{sc} puro encubada con
Extracto cerebral DRM



FIG. 9

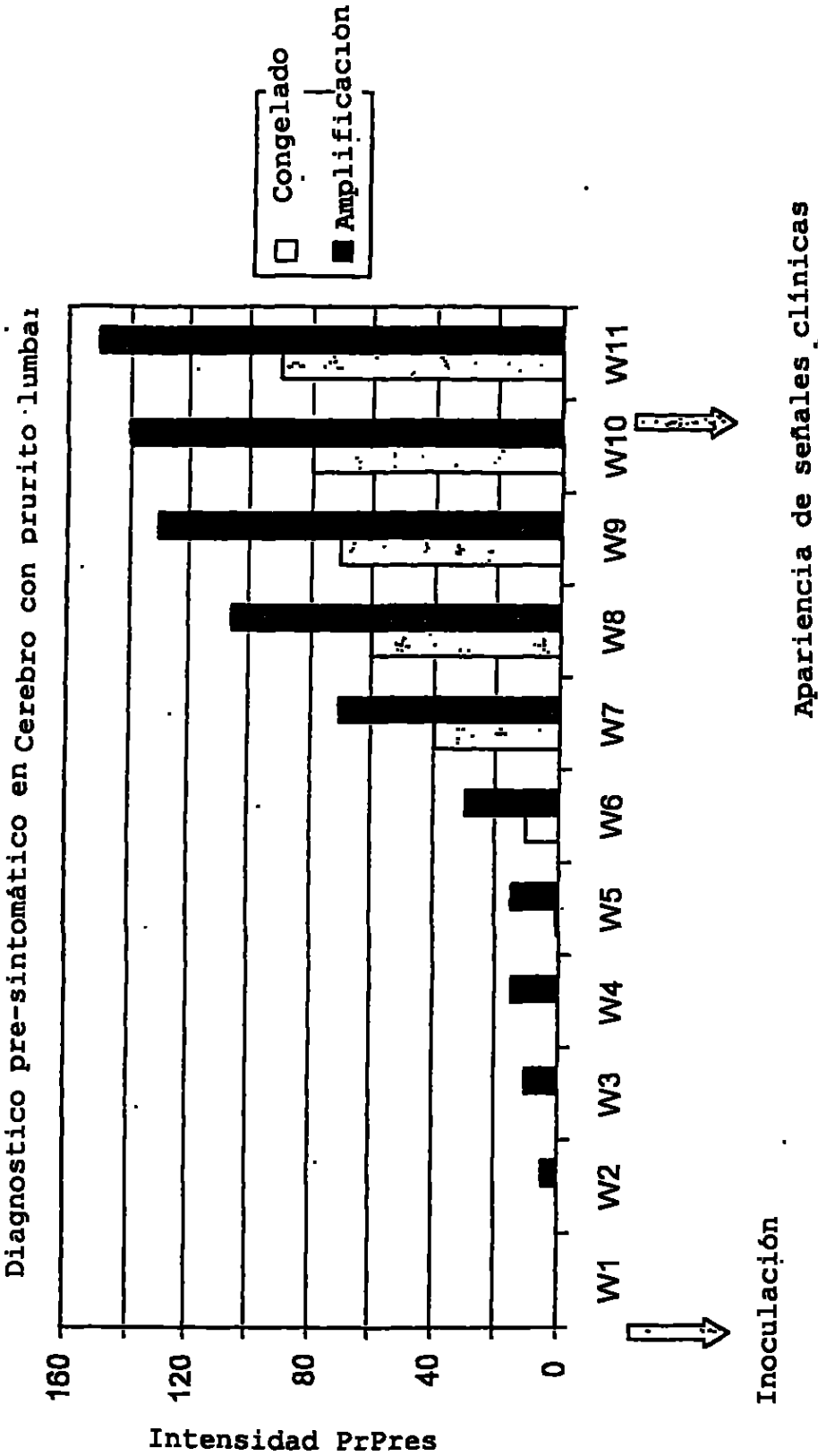
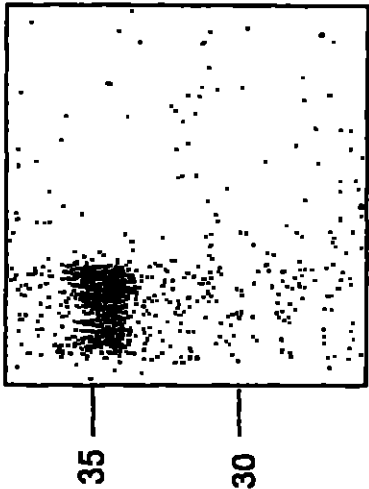
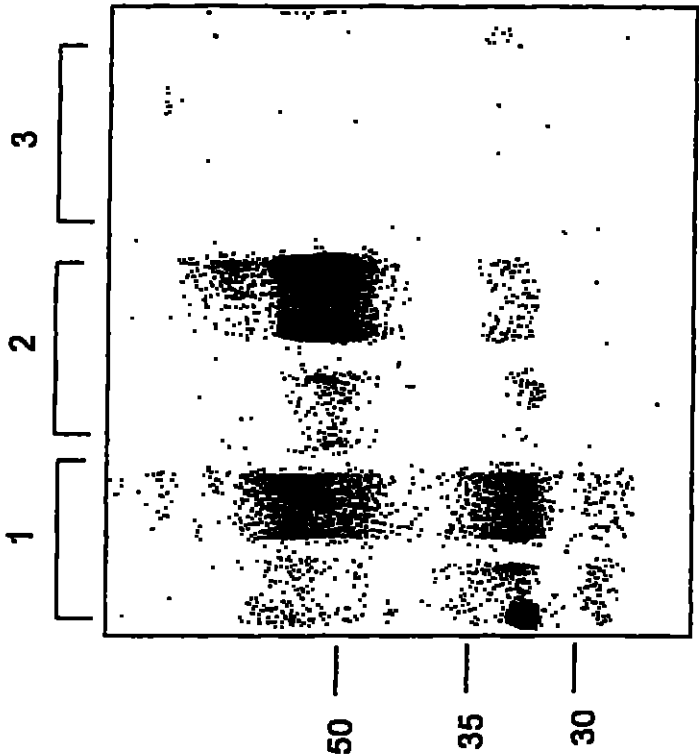


FIG. 10
Amplificación cíclica del PrPSc humano



Amplificado	-	-	+
PK	-	+	+



Amplificado	-	+	-	+	-	+
PK	+	+	+	+	+	+

FIG. 11

Detección sanguínea de PrPSc después de la preparación de fantasmas de células sanguíneas



FIG. 12

Detección sanguínea de PrPSc después de extracción de sarkosyl

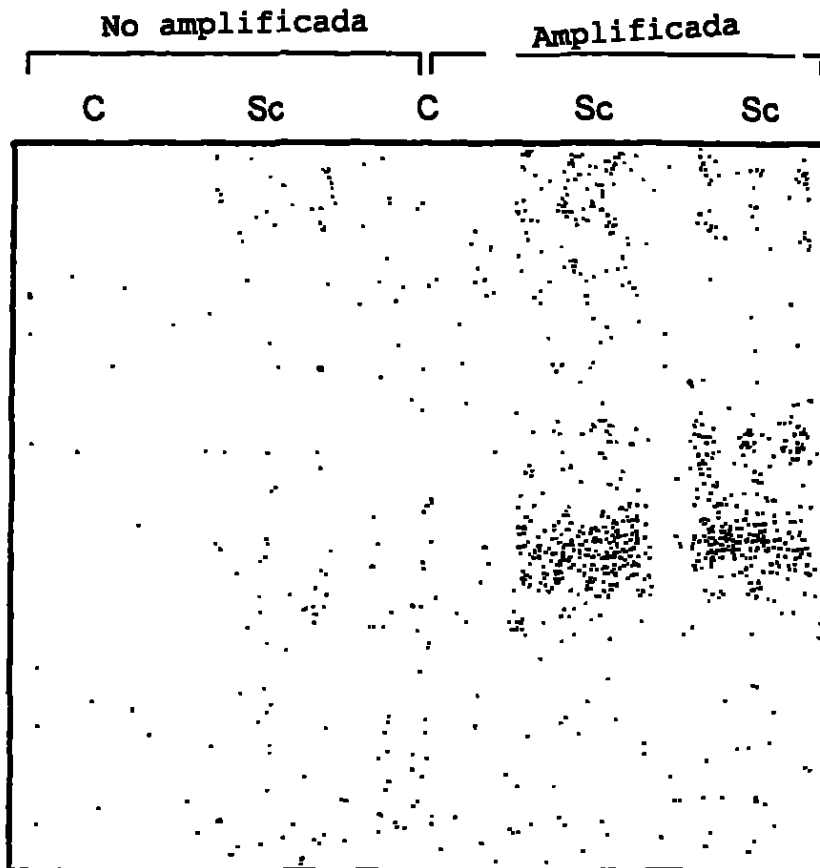
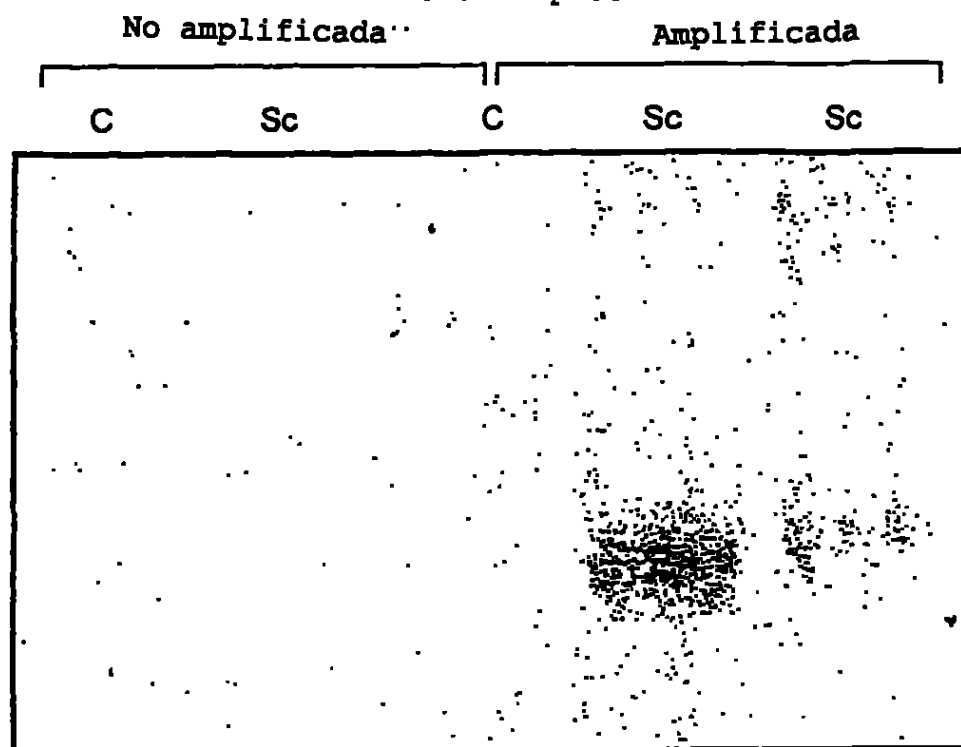


FIG. 13

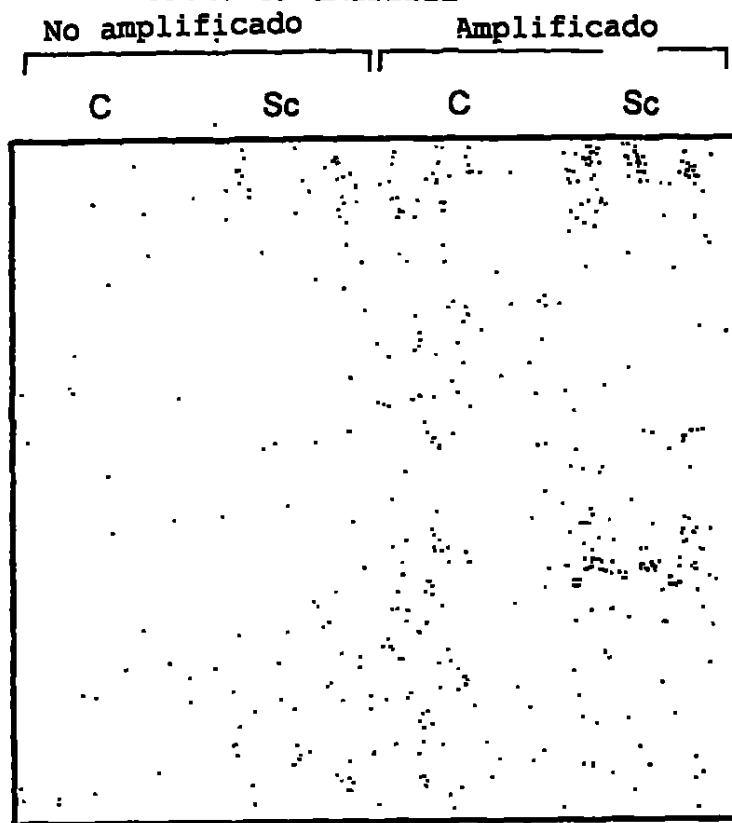
Detección sanguínea de PrPSc después de purificación de
balsas de lípido



150

FIG. 14

Detección sanguínea de PrPCs después de la preparación de cubierta amarilla





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 22117658 22002853 Folios: 151
 Fecha (GMD): 2002-12-31 12:07:33
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2220 DIVISION DE NUEVOS CENCIENTOS

Colo 13494-041-002-7

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CASH : 02 02,553
 FECHA : DICIEMBRE 7 DE 2002

1121 CONSIGNACION, 00014

RECORRALTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
CARLIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3136967	09/12/2002	19,353,000.00

14484 C O M C E P T O 44448

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SOLO: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

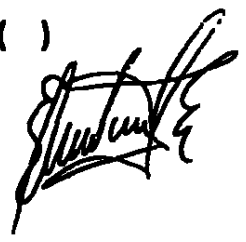
Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador 382 0840
 Fax 350 5220
 E-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

RESPONSABLE : _____

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.		()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.		()	()
- Descripción de la invención.		()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.		()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.			
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 y fotográfica 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:



Fecha: **SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO**
Radicación : 02117650 6062230 Folios: 151
Fecha (MG): 2002-12-21 12:07:39
Trámite : 311 FCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES