

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de Enero de 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/010122 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: G01N 21/65,
33/68

Madrid (ES). UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
[ES/ES]; Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2003/000353

(72) Inventores; e

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de Julio de 2003 (10.07.2003)

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **CAR-MONA HERNÁNDEZ, Pedro** [ES/ES]; Instituto de Estructura de la Materia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, c/Serrano 113 bis, 119-123, E-28006 Madrid (ES). **MONREAL LLOP, Jaime** [ES/ES]; Instituto de Neurobiología 'Ramón y Cajal' (INRC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Doctor Arce 37, E-28002 Madrid (ES). **MONLEÓN MOSCARDÓ, Eva** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet, 177, E-50013 Zaragoza (ES). **MONZÓN GARCÉS, Marta** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet, 177, E-50013 Zaragoza (ES). **BADIOLA DÍEZ, Juan, José** [ES/ES]; Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C/ Miguel Servet, 177, E-50013 Zaragoza (ES).

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

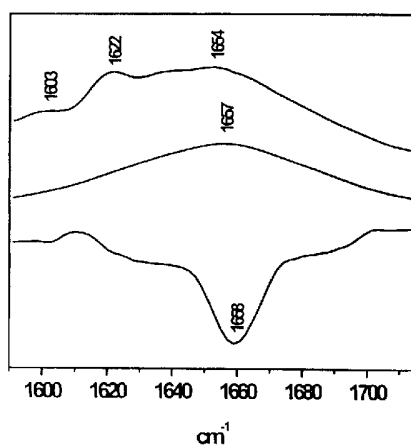
(30) Datos relativos a la prioridad:
P200201706 19 de Julio de 2002 (19.07.2002) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/Serrano, 117, E-28006

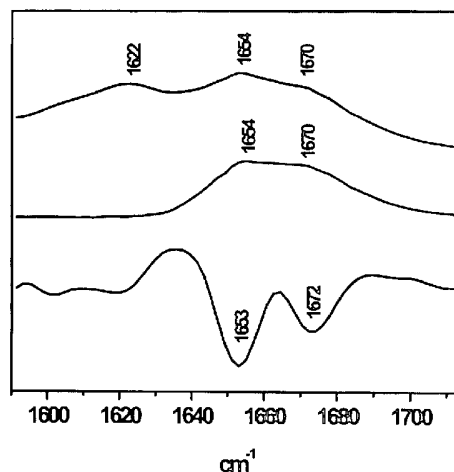
[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD OF DETECTING INEFFECTIVE PRIONIC PROTEINS (PrP^{Sc}) BY MEANS OF RAMAN-LASER SPECTROSCOPY

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS PRIÓNICAS INEFFECTIVAS (PrP^{Sc}) POR ESPECTROSCOPIA RAMAN-LASER



1



2

(57) Abstract: The invention relates to a method of detecting ineffective prionic proteins (PrP^{Sc}) in biological samples of animals infected by a transmissible spongiform encephalopathy, using Raman-laser spectroscopy. The application of said method can be extended to the blood of cattle, goats, humans and birds among others. The inventive qualitative and quantitative method comprises a first step consisting in obtaining the fraction of blood containing the highest concentrations of ineffective prionic proteins. The results obtained using said method in relation to prion analysis fully correspond to the post-mortem biodiagnostic tests on cerebral samples performed on the corresponding animals from which blood samples have been taken.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2004/010122 A1



(74) **Mandatario:** REPRESA SANCHEZ, Domingo; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

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

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

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** La presente invención proporciona un procedimiento, por espectroscopia Raman-laser, para la detección de proteínas priónicas infectivas (PrP^{Sc}) en muestras biológicas de animales infectados por una BET, y su aplicación es extensible a sangre de, entre otros, bovinos, caprinos, humanos y aves. El procedimiento de esta invención, cualitativo y cuantitativo, incluye una primera etapa encaminada a obtener la fracción de la sangre donde están más concentradas las proteínas priónicas infectivas. Los resultados obtenidos por el procedimiento descrito en esta invención sobre el análisis de priones han concordado al 100% con los tests de biodiagnóstico post-mortem de muestras de cerebro realizadas en los correspondientes animales de los que se realizaron extracciones sanguíneas.

TITULO**PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS PRIÓNICAS INFECTIVAS (PrP^{Sc}) POR ESPECTROSCOPIA RAMAN-LASER****5 SECTOR DE LA TECNICA**

La invención concierne a un primer sector correspondiente al área de la seguridad alimentaria, con subsiguiente aplicación a un segundo sector de la salud y de la ganadería, en concreto al diagnóstico de EETs en animales vivos.

10 ESTADO DE LA TECNICA

El escrapie o tembladera es el modelo del grupo de enfermedades neurodegenerativas, progresivas y de desenlace fatal, denominadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) animales, entre las que se encuentran la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), la enfermedad crónica caquetizante del
15 ciervo y la encefalopatía espongiforme transmisible del visón. Otras enfermedades de este grupo que afectan al hombre son la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jacob (vCJD), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Jakob y el insomnio familiar fatal.

Actualmente, el diagnóstico de las EETs tanto humanas como animales, se basa
20 en la sospecha clínica de la enfermedad y la confirmación mediante los métodos de diagnóstico validados y autorizados por la Unión Europea (Reglamento 1248/2001) para el diagnóstico del escrapie. Todos ellos están basados en técnicas post-mortem, estableciéndose el uso de pruebas de diagnóstico rápido para las muestras procedentes del programa de vigilancia activa, y los métodos establecidos por la OIE (Organización
25 Internacional de Epizootías) para las muestras procedentes del Programa de vigilancia pasiva y la confirmación de los resultados positivos o dudosos de pruebas de diagnóstico rápido. Estos últimos se basan en la demostración de las lesiones histopatológicas en el sistema nervioso central y la detección de la acumulación de las isoformas anormales de las proteínas PrP (PrP^{Sc}) mediante inmunohistoquímica o
30 inmunoblotting.

Las enfermedades priónicas tienen un amplio espectro de manifestaciones clínicas (demencia, ataxia, insomnio, paraplegia, etc.) y a nivel molecular se caracterizan por la presencia de depósitos de proteínas priónicas infectivas PrP^{Sc}.

Existe una necesidad urgente para la puesta a punto de un test analítico rápido y no invasivo de proteínas priónicas *in vivo* que evite el sacrificio, como se ha mencionado, de animales libres de enfermedad y permita la reconstitución de rebaños con garantía de animales sanos. Bajo esta perspectiva, la sangre es un fluido biológico de fácil extracción que se puede utilizar para análisis de proteínas priónicas, sin necesidad de recurrir a biopsias de tejido cerebral u otros órganos. En la literatura relacionada con este tema, se ha descrito un test capaz de detectar proteínas PrP^{Sc} en sangre utilizando una combinación de competición antígeno-anticuerpo y electroforesis capilar (Schmerr y Jenny, *Electrophoresis*, 19, 409-414 (1998); Schmerr y cols., *J. Chromatogr. A*, 853, 207-214 (1999)). El test es laborioso y difícil de estandarizar, y depende de una relación de señales más que de una medida directa de proteínas PrP^{Sc}. Además, los resultados obtenidos con muestras afectadas de escurpie no se han reproducido en muestras de otras encefalopatías espongiformes transmisibles (Brown y cols., *J. Lab. Clin. Med.*, 137, 5-13 (2001)).

La espectroscopía de fluorescencia de correlación cruzada (Bieschke y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5468-5473 (2000)) se ha utilizado para la detección de priones en líquido cerebroespinal de pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). Pero de 24 pacientes afectados de CJD solamente 5 resultados espectroscópicos fueron positivos, lo que representa solamente un 20% de aciertos.

En el documento de patente DE 19918141 A1 (26 Oct. 2000) se describe por Matthias y cols. un método para el diagnóstico de mieloencefalopatía espongiforme transmisible (BSE y escurpie) usando inmunoensayos y RT-PCR. En otro documento de patente WO 2000052197 A1 (8 Sep. 2000) se describe por Prusiner y Safar un método de detección de proteínas priónicas en sangre coagulada de Syrian hamsters.

La gran variedad de métodos descritos en la literatura son, en su mayor parte, de tipo inmunológico y laboriosos, de tal manera que se necesita más de una jornada de trabajo. Asimismo, de las manifestaciones públicas de S. B. Prusiner (conferencia en España en el verano de 2001) y entrevista muy reciente con el Profesor J. J. Badiola se desprende que los métodos hasta ahora probados no son fiables. La laboriosidad de los

métodos descritos en la literatura tiene una incidencia directa en el control de carne en mataderos, ya que la consecución de un método rápido de biodiagnóstico evitaría un tiempo de almacenamiento de estos artículos y por tanto, un ahorro tanto de energía de refrigeración, como de espacio para almacenamiento. Recientemente, se ha puesto a punto un método por microespectroscopía infrarroja para diferenciar post-mortem tejido cerebral de roedores sanos y afectados de escrapie (Kenipp y cols., *Biochim. Biophys. Acta*, 1501, 189-199 (2000); Naumann y cols., Patente WO 00/72007 A2, 30 Nov. 2000). Pero hasta ahora no existen antecedentes sobre la aplicación *in vivo* de la espectroscopía Raman-laser a la determinación de proteínas priónicas infectivas PrP^{Sc} en sangre de ovinos afectados de escrapie. El método descrito en esta invención que incluye la utilización de esta técnica es sensible y rápido, tiene la ventaja de que se aplica *in vivo* sobre una muestra biológica, entre otras, de fácil extracción como es la sangre; y a diferencia de los métodos de inmunoensayo y otras técnicas espectroscópicas como la de fluorescencia, ultravioleta y electroforesis capilar, no exige el uso de anticuerpos y es por tanto un método directo, y finalmente proporciona datos bioanalíticos orientativos sobre el sacrificio selectivo de determinados animales de un rebaño, con el consiguiente ahorro económico.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

20 Breve Descripción de la Invención

La presente invención proporciona un procedimiento, por espectroscopía Raman-laser, para la detección de proteínas priónicas infectivas (PrP^{Sc}) en muestras biológicas de animales afectados de una EET, y su aplicación es extensible a sangre de, entre otros, bovinos, caprinos, humanos y aves. El procedimiento de esta invención incluye una primera etapa encaminada a obtener la fracción de la sangre donde están más concentradas las proteínas priónicas infectivas.

La presencia de priones se pone de manifiesto de forma cualitativa mediante la aparición de bandas Raman en el intervalo comprendido entre 1665 y 1680 cm⁻¹, muchas veces en forma de hombros que se hacen bien visibles mediante espectroscopía de derivadas.

Aparte de este procedimiento espectroscópico cualitativo, la existencia de proteínas priónicas infectivas en una muestra se puede determinar calculando los

porcentajes de estructura β , que sufre un aumento en estas proteínas infectivas con respecto a los controles.

Los resultados obtenidos por el procedimiento descrito en esta invención sobre el análisis de priones han concordado al 100% con los tests de biodiagnóstico post-mortem de muestras de cerebro realizadas en los correspondientes animales de los que se realizaron extracciones sanguíneas.

La aplicación más inmediata de esta invención es el uso de este procedimiento de detección de proteínas infectivas (PrP^{Sc}) para el diagnóstico de animales infectados de EETs o para el estudio de la evolución de dicha enfermedad.

10

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se basa en que los inventores han observado que las proteínas priónicas infectivas (PrP^{Sc}) pueden ser identificadas, cualitativa y cuantitativamente, de forma específica a partir de muestras biológicas de animales infectados. Dicha presencia puede constatarse de forma diferenciada en un mismo animal que sufre una infección priónica a lo largo del tiempo, tras un proceso de obtención específico de dichas proteínas priónicas infectivas en una fracción celular y de detección posterior de las mismas por espectroscopía Raman-laser.

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento de detección de la proteínas priónicas infectivas marcadoras, PrP^{Sc}, en la que se basa el diagnóstico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisible (EET) en animales, y que comprende los siguientes pasos:

- a) obtención de una fracción de lisado de elementos celulares procedentes de muestras biológicas animales, enriquecida en PrP^{Sc}, y
- b) la identificación, por espectroscopía Raman-laser, de las proteínas marcadoras PrP^{Sc} en dicha fracción de lisado.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ETT" se refiere a enfermedades provocadas por las proteínas infectivas PrP^{Sc} en animales y humanos, entre otras, el escrapie (llamado también tembladera) de ovinos y caprinos, encefalopatía espongiforme bovina (EEB), la enfermedad crónica caquetizante del ciervo, y la encefalopatía espongiforme transmisible del visón y gatos. Otras enfermedades de este grupo que afectan al hombre son: la nueva variante de la

30

enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Jakob, el insomnio familiar fatal, kuru, etc. (Prusiner, *New Engl. J. Med.*, 344, 1516-1526 (2001)). Por otro lado, tal como se utiliza en la presente invención, el término “animales” se refiere a animales que pueden ser infectados por proteínas PrP^{Sc}, entre otros, ovejas, vacas, cabras, visones, ciervos, roedores, gatos y humanos.

El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere no sólo a fluidos biológicos de animales, por ejemplo: sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y linfático, y orina, sino también a muestras biológicas provenientes de tejidos que han sido homogeneizadas por procedimientos mecánicos, sonicación o cualquier otro procedimiento conocido en el estado de estas técnicas, y solubilizadas. Tal como se utiliza en la presente invención, el término “fracción de lisado de elementos celulares” se refiere a la fracción de la muestra biológica donde se encuentran concentradas las proteínas priónicas infectivas.

Un objeto particular de la presente invención es un procedimiento de detección de proteínas priónicas infectivas, mediante el cual, la obtención de una fracción de lisado de elementos celulares de muestras biológicas de animales, enriquecida en PrP^{Sc}, (procedimiento *a*) de la presente invención (ver ejemplo 1)), comprende los siguientes pasos:

- extracción de sangre, 6-8 mililitros, con EDTA 1,4 mM,
- centrifugación refrigerada a 4°C (6.000-8.000 rpm) durante 30 minutos,
- resuspensión del pelet de los elementos celulares con aproximadamente 10 ml de disolución salina isotónica comercial (NaCl 154 mM, osmomolaridad de 307 miliosmomolar mOsm/L, pH \cong 4,5-7), invirtiendo el tubo suavemente repetidas veces y con breves agitaciones opcionales en Vórtex, dependiendo del estado de agregación de la muestra, hasta conseguir la completa disgregación del pelet,
- choque osmótico de los elementos celulares resuspendidos con aproximadamente 60 ml de agua Milli-Q (Millipore), y centrifugación de la suspensión resultante a 10.000-12.000 rpm,
- eliminación completa del sobrenadante y de una fracción mucosa, por decantación o aspiración exhaustiva (libre de proteínas PrP^{Sc}), con el fin de obtener un pelet acuoso concentrado en priones. Una muestra del pelet

acuoso final se recogió del fondo del tubo mediante homogeneización con pipeta Pasteur para sus posteriores análisis.

Otro objeto particular de la presente invención es un procedimiento más rápido que el procedimiento *a*) de detección de proteínas priónicas infectivas, mediante el cual la obtención de una fracción de lisado de elementos celulares de muestras biológicas de animales, enriquecida en proteínas PrP^{Sc}, (procedimiento *b*) de la presente invención (ver ejemplo 1)), comprende los siguientes pasos:

- extracción de sangre, 6-8 ml con EDTA 1,4 mM,
- dilución directa de la muestra con 8-10 volúmenes de agua Milli-Q (Millipore),
- agitación suave por inversión repetida del tubo, y centrifugación a 12.000 rpm durante media hora.
- eliminación exhaustiva del sobrenadante y de la fracción mucosa por decantación y/o aspiración. Una muestra del pelet acuoso se utilizó para sus posteriores análisis.

Otro objetivo particular de la presente invención es lograr un procedimiento de detección de proteínas priónicas infectivas (PrP^{Sc}) mediante el cual la identificación cualitativa por espectroscopía Raman-laser de estas proteínas en la fracción de lisado (ver ejemplo 2) comprende los siguientes pasos:

- a) medida del espectro Raman de dicha fracción en la región amida I comprendida entre 1600 y 1700 cm⁻¹, en la se hacen visibles las estructuras β de las proteínas PrP^{Sc}, y
- b) la identificación de proteínas PrP^{Sc} en dicha fracción cuando se observe una señal característica entre 1665 y 1680 cm⁻¹, o más preferentemente entre 1670-1675 cm⁻¹.

Otro objeto particular de la presente invención es un procedimiento de detección cuantitativa de proteínas priónicas infectivas mediante el cual la identificación por espectroscopía Raman-laser de proteínas PrP^{Sc} en la fracción de lisado (ver ejemplo 2) comprende los siguientes pasos:

- a) medida del espectro Raman de dicha fracción en la región espectral amida I comprendida entre 1600 y 1700 cm⁻¹,

- b) sustracción de la contribución espectral del agua, hemoglobina y residuos aromáticos de cadenas laterales de proteínas en esta región,
- c) determinación del porcentaje de estructuras proteicas β , y
- d) identificación cuantitativa de la presencia de PrP^{Sc} en dicha fracción cuando se observe un porcentaje de estructura proteica β de, al menos un 10%, o preferentemente mayor del 15%.

Otro objeto particular de la presente invención es un procedimiento de detección de proteínas PrP^{Sc}, que incluye parte de la metodología de la presente invención y el uso de otra técnica de espectroscopía vibracional que identifica igualmente estas proteínas en la misma región amida I (1600-1700 cm⁻¹), como es la espectroscopía infrarroja.

Otro objeto particular de la presente invención es el empleo de todos los procedimientos descritos, según la presente invención, para el diagnóstico de EETs en animales y humanos, así como en la valoración de la evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

Figura 1. Espectros Raman de un pelet acuoso de elementos celulares de sangre de ovino sano (control), obtenido por el procedimiento *a*. Espectro original (*superior*), bandas amida I (*medio*) y espectro de segunda derivada (*inferior*).

Figura 2. Espectros Raman de un pelet acuoso de elementos celulares de sangre de ovino con síntomas neurológicos de escrapie, obtenido por el procedimiento *a*. Espectro original (*superior*), bandas amida I (*medio*) y espectro de segunda derivada (*inferior*).

Figura 3. Espectros Raman de un pelet acuoso de elementos celulares de sangre de ovino sano (control) obtenido por el procedimiento *b*. Espectro original (*superior*), bandas amida I (*medio*) y espectro de segunda derivada (*inferior*).

Figura 4. Espectros Raman de un pelet acuoso de elementos celulares de sangre de ovino con síntomas neurológicos de escrapie obtenido por el procedimiento *b*. Espectro original (*superior*), bandas amida I (*medio*) y espectro de segunda derivada (*inferior*).

Figura 5. Espectros Raman de pelets acuosos de elementos celulares de sangre de ovino con síntomas neurológicos de escrapie obtenidos por el procedimiento *b*. *A*,

primera extracción sanguínea; *B*, segunda extracción sanguínea 30 días después. Espectro original (*superior*), bandas amida I (*medio*) y espectro de segunda derivada (*inferior*).

5 EJEMPLOS DE REALIZACION DE LA INVENCION

Esta invención se ilustra con más detalle en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1.- Preparación de pelet acuoso de elementos celulares

Con el fin de identificar las fracciones con mayor presencia de proteínas priónicas infectivas (PrP^{Sc}) a partir de fluidos biológicos, una serie de muestras de
10 sangre de ovinos negativos y positivos, (sin (controles) y con síntomas neurológicos de escrapie respectivamente), plasmas y sueros correspondientes, se analizaron espectroscópicamente tal como se indica en el Ejemplo 2 de la presente invención. Los resultados que se obtuvieron fueron en todos ellos negativos. En el caso concreto de la sangre, la interferencia de la gran cantidad de hemoglobina presente, unida a la baja
15 concentración de estas proteínas, impidió su detección. También por la interferencia de la hemoglobina, los análisis de la fracción de todos los elementos celulares de la sangre, libres de suero o plasma, y obtenidos por centrifugación y posterior resuspensión en disolución salina isotónica, resultaron también negativos. De ahí la necesidad de obtener posteriormente una fracción de los lisados de todos estos elementos celulares en donde
20 las proteínas PrP^{Sc} estén concentradas y libres mayoritariamente de hemoglobina.

Por tanto, un objetivo esencial fue conseguir esta fracción de la sangre de animales en donde están localizadas las proteínas priónicas infectivas (PrP^{Sc}) con una concentración suficiente que genere una señal espectroscópica medible. En los siguientes ejemplos se obtuvo a partir de ovinos, sanos o con síntomas neurológicos de
25 escrapie, Para ello se siguieron dos procedimientos alternativos: a) separando previamente los elementos celulares por centrifugación, lisándolos y posteriormente concentrándolos de nuevo por centrifugación, y b) lisando directamente los elementos celulares de la sangre sin fraccionamiento previo de ésta. Obviamente este segundo procedimiento es más rápido que el anterior.

30 El procedimiento a) se llevó a cabo como sigue. Se realizaron extracciones de sangre en condiciones estériles de animales sanos pertenecientes a un rebaño negativo (controles) y de otros ovinos procedentes de un rebaño positivo en el que se habían

detectado diversos casos de escrapie y en el que se había llevado a cabo una selección genotípica por su sensibilidad a la enfermedad. Esta selección consiste en llevar a cabo el genotipado del animal para el gen PrP con el fin de determinar la susceptibilidad o resistencia genética del individuo a la enfermedad de escrapie. En función de la combinación alélica obtenida para determinados codones (136, 1554 y 171 dentro del gen PrP), se asocia a los distintos genotipos. En nuestro caso concretamente, se seleccionan aquellos animales con genotipos sensibles (grupos mayoritarios de riesgo 3 y 4), es decir, con una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad. El riesgo 4 corresponde a la combinación ARQ/ARQ o ARH/ARQ, y el riesgo 3 a ARR/ARH o ARH/AHQ (National Scrapie Plan for Great Britain). Para cada extracción de sangre, se partió de 6-8 mililitros que contenían EDTA 1,4 mM y se introdujeron en un tubo apropiado de centrífuga, de 30-50 ml con tapón enroscable. El tubo se sometió durante 30 minutos a una centrifugación refrigerada a 4°C (6.000-8.000 rpm), usando una centrífuga Sorvall, modelo RC5C con rotor SS34. El plasma se separó por succión o decantación de la parte superior del tubo, y el pelet con los elementos celulares, que contienen gran cantidad de hemoglobina, se recogió en el fondo del mismo. Esta fracción se resuspendió con aproximadamente 10 ml de disolución salina isotónica comercial (NaCl 154 mM, osmomolaridad 307 miliosmomolar mOsm/L, pH \cong 4,5-7) invirtiendo el tubo suavemente repetidas veces y con breves agitaciones opcionales en Vórtex, dependiendo del estado de agregación de la muestra, hasta conseguir la completa disgregación del pelet. Una buena disgregación facilitó un posterior choque osmótico efectivo.

La suspensión resultante se sometió a un choque osmótico con aproximadamente 60 ml de agua Milli-Q (Millipore) (unas 10 veces el volumen de sangre inicial), invirtiendo el tubo suavemente. Esta suspensión se centrifugó a 10.000-12.000 rpm, obteniéndose nuevamente un sobrenadante y un pelet. Mediante decantación o aspiración exhaustiva, se eliminó el sobrenadante y una fracción mucosa (libre de proteína PrP^{Sc}) con el fin de obtener una buena señal espectroscópica resultante de un pelet acuoso concentrado en priones. El análisis espectroscópico de este sobrenadante resultó negativo debido a la interferencia espectroscópica de la hemoglobina presente en gran cantidad. Una muestra del pelet acuoso final se recogió del fondo del tubo mediante homogeneización con pipeta Pasteur para sus posteriores análisis. El análisis

espectroscópico del pelet revela que está constituido por una mezcla de proteínas y lípidos procedentes fundamentalmente de las membranas de todos los elementos celulares de la sangre, y muestra asimismo que las proteínas priónicas infectivas PrP^{Sc} están concentradas en esta fracción. El procedimiento para obtener esta fracción se ha
5 utilizado por primera vez para la detección de proteínas priónicas en sangre, y demuestra que las proteínas priónicas PrP^{Sc} están preferentemente localizadas en las membranas de los elementos celulares de la sangre. Procede señalar que nuestros intentos de realizar medidas espectroscópicas con muestras secas de pelet, para aumentar la concentración de priones, resultaron fallidos debido a la aparición de
10 fluorescencia intensa que enmascaraba el espectro Raman en cuestión.

Procedimiento b). Partiendo de los mismos tipos de sangre descritos en el procedimiento a) se tomaron 6-8 ml de este fluido biológico que contenía también EDTA 1,4 mM, y se diluyeron con 8-10 volúmenes de agua Milli-Q (Millipore) con el fin de producir directamente la lisis de los elementos celulares. Tras una agitación suave
15 por inversión del tubo, se centrifugó a 12.000 rpm durante media hora. Se eliminó exhaustivamente el sobrenadante y la fracción mucosa por decantación y/o aspiración. Una muestra del pelet acuoso se utilizó para posteriores análisis. Si se deseara una menor señal espectroscópica de hemoglobina, el pelet se lava nuevamente con agua Milli-Q, se centrifuga y el pelet final se separa en las mismas condiciones descritas
20 anteriormente.

La señal espectroscópica del procedimiento a), que es más largo de realizar, es no obstante significativamente mayor (aproximadamente dos veces más intensa) que la obtenida según el procedimiento rápido b). Ello es probablemente debido a que la fracción mucosa, que diluye el pelet, es mayor en el procedimiento b) y por tanto más
25 difícil de separar exhaustivamente.

Ejemplo 2.- Análisis por espectroscopía Raman-Laser de muestras biológicas

La presencia de proteínas priónicas infectivas, por su predominante estructura β que es característica de ellas (Caughey y cols., *J. Biol. Chem.*, 273, 32230-32235
30 (1998); Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23, 13363-13383 (1998)) puede ser advertida 1) cualitativamente y 2) cuantitativamente como sigue.

1) Cualitativamente. Las proteínas con estructura β , como las priónicas infectivas, generan bandas por encima de 1660 cm^{-1} , lo que se ha demostrado mediante estudios de numerosos polipéptidos y proteínas modelo que poseen esta estructura. Aunque obviamente pueden existir otras proteínas con un alto contenido en estructura β , la detección de un aumento relativo, respecto a los controles, de esta estructura con la evolución de la enfermedad (tal como revela el Ejemplo 5) hay que atribuirlo inequívocamente a la presencia de proteínas PrP^{Sc}. Además, las únicas enfermedades que comportan formación de proteínas con estructura predominante β , en su estado monómero o agregado, son las encefalopatías espongiformes transmisibles y la enfermedad de Alzheimer. Finalmente, datos obtenidos por métodos inmunocitoquímicos e inmunoelectroforéticos (Madec y cols., *J. Virol. Methods*, 75, 169-177 (19998); Madec y cols., *Veterinary Record*, 146, 74-76 (1998)) no mostrados, revelan la presencia de PrP^{Sc} en la fracción del lisado de los elementos celulares. Sobre la base de las señales espectroscópicas medidas y cantidades de muestras obtenidas, mediante esta técnica Raman-laser se pueden detectar concentraciones de PrP^{Sc} en sangre menores que $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, que es del mismo orden de magnitud que la sensibilidad de las espectroscopías de fluorescencia y ultravioleta (Brown y cols., *J. Lab. Clin. Med.*, 137, 5-13 (2001)). Este nivel de detección es debido, por una parte, al procedimiento de obtención de la fracción celular donde se localizan estas proteínas priónicas, y por otro lado a que en los monómeros de proteínas PrP^{Sc}, ésta adopta una estructura predominantemente β , y en sus agregados la proporción de esta estructura es prácticamente el 100%. (Caughey y cols., *J. Biol. Chem.*, 273, 32230-32235 (1998); Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 23, 13363-13383 (1998); Saborio y cols., *Nature*, 411, 810-813 (2001)).

Aunque a veces estas bandas aparecen con una intensidad relativamente débil en forma de hombro, el uso de la espectroscopía de segundas derivadas en el dominio de frecuencias espectrales revelan inequívocamente esta estructura proteica β , como se ilustra en los ejemplos descritos más adelante.

2) Cuantitativamente. Consiste en medir los porcentajes de estructura β existentes en muestras positivas afectadas de escrapie y comparar dichos porcentajes con los obtenidos de muestras controles, para lo que se considera la región espectral amida I comprendida entre $1600\text{ y }1700\text{ cm}^{-1}$. Debido a su presencia en la fracción del

lisado de los elementos celulares, es necesario eliminar previamente la contribución del agua mediante substracción espectral. Para determinar el factor de substracción se utilizó como criterio la consecución de la misma intensidad a 2100 y 3100 cm^{-1} , análogamente al criterio seguido en este tipo de substracción en disoluciones acuosas de proteínas (Williams *J. Mol. Biol.*, 1566, 581-603 (1983)). Asimismo es necesario eliminar mediante substracción espectral las bandas de los restos de hemoglobina y residuos aromáticos de cadenas laterales de proteínas que se sitúan por debajo de 1630 cm^{-1} , para lo cual se ha utilizado un programa de ajuste, por mínimos cuadrados, de perfiles espectrales a una suma de funciones de bandas gaussianas (SpectraCalc, Galactic Industries Corp., Salem, NH). Una vez restadas las bandas del agua, restos de hemoglobina y cadenas laterales de residuos aromáticos proteicos, se determinaron los porcentajes de estructura proteica β siguiendo métodos ya establecidos en la literatura (Alix y col., *J. Mol. Struct.*, 174, 159-164 (1988)). La Tabla 1 muestra una clara correlación entre los resultados obtenidos por espectroscopía Raman sobre porcentajes de estructura proteica β en muestras de lisados celulares de sangre de ovino y los resultados de diagnóstico post-mortem. Estos últimos ensayos post-mortem de muestras positivas de escrapie y negativas se basaron en el análisis del Sistema Nervioso Central (SNC) con el fin de confirmar/descartar la enfermedad mediante las técnicas de diagnóstico histopatológico reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (Office International des Epizooties. World Organisation for Animal Health, O.I.E. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, chap. X.9, pp. 873-877 (2000)), y por la Unión Europea (Reglamento de las Comunidades Europeas, N° 1248, (2001)). Los casos diagnosticados como positivos según estas técnicas corresponden a muestras con un contenido en estructura β significativamente superior al de los controles (ovejas n° 1-6). Es decir, ha habido una coincidencia al 100% en cuanto al diagnóstico de los casos positivos analizados por espectroscopía Raman-laser y los analizados mediante los tests de confirmación establecidos por la OIE y las Comunidades Europeas.

30

Tabla 1

Correlación entre porcentajes de estructura β en lisados de células sanguíneas de ovino y los respectivos análisis post-mortem del SNC.

Nº de oveja		% de estructura β	Análisis post-mortem del SNC (histología e inmunohistoquímica ^a)
5	1	4	-
	2	5	-
	3	6	-
	4	5	-
	5	6	-
10	6	7	-
	7	26	+
	8	10	+
	9	26	+
15	10	40	+
	11	22	+
	12	29	+
	13	32	+
	14	29	+
20	15	18	+

Los porcentajes de estructura β se han aproximado al entero porcentual más próximo del resultado decimal obtenido.

^a Técnicas establecidas por la Organización Internacional de Epizootías.

25

Ejemplo 2.1.- Espectroscopia Raman-laser de una muestra de lisado celular, procedente de sangre de oveja sana (control), obtenida a partir del procedimiento a).

30 Siguiendo este procedimiento, se introdujeron aproximadamente 300 μ l de pelet de lisado acuoso, derivado de una muestra de sangre de oveja control, en un tubo de resonancia magnética (Wilmad, U.S.A) de 5 mm de diámetro, refrigerado alrededor de 15°C mediante un baño termostatzador. Para el análisis espectral se usó un

espectrómetro Raman de transformada de Fourier de la firma Bruker, modelo RFS 100/S, dotado de un laser de Nd:YAG que emite a 1064 nm y que fue utilizado como fuente de excitación. Esta línea laser de excitación es particularmente útil para el análisis de la sangre y sus fracciones, debido a que el problema de la fluorescencia se obvia prácticamente. La utilización de otras líneas láser en el visible, debido a su mayor energía, genera fluorescencia que enmascara el espectro en cuestión. El instrumento usado en esta invención estaba dotado de un detector de Ge refrigerado con nitrógeno líquido. Otras condiciones espectroscópicas de trabajo fueron: resolución, 4 cm^{-1} ; 300 mw de potencia de la línea excitatriz; velocidad de scanner, 4, 5,0 kHz; ganancia de señal de muestra y fondo, 1; modo de adquisición, doble sentido, adelante-atrás; modo de test de correlación, longitud completa de interferograma; filtro de paso bajo, 1, 16 kHz; función de apodización, Blackman Harris de 4 términos; factor de relleno del cero, 2; modo de corrección de fase, potencia/búsqueda de ningún pico. En estas condiciones de trabajo se realizaron 2.000 barridos que se promediaron, con una duración total de una hora. El espectro Raman resultante de esta fracción (Figura 1) muestra una banda amida I hacia 1654 cm^{-1} , otra banda significativa hacia 1622 cm^{-1} debido a la presencia de restos de hemoglobina y una banda débil hacia 1603 cm^{-1} debido a la fenilalanina y/o grupos carboxilato de cadenas laterales proteicas. La substracción del agua y de las bandas a 1622 y 1603 cm^{-1} genera el perfil espectral amida I (intermedio de la Figura 1) debido a esqueletos polipeptídicos de proteínas. Este perfil contiene un máximo de intensidad hacia 1657 cm^{-1} , resultado del solapamiento de bandas correspondientes a estructuras α -helicoidales y desordenadas. El espectro de la segunda derivada de este perfil espectral (inferior de la Figura 1) muestra una banda predominante a 1658 cm^{-1} y, lo que es digno de destacar es que no aparecen bandas de intensidad considerable en el intervalo de 1650-1680 cm^{-1} que sugieran la presencia de cantidades considerables de estructuras β . En efecto, la determinación cuantitativa de esta estructura β dio como resultado 5% aproximadamente (oveja nº 4 de la Tabla 1).

Ejemplo 2.2. Espectroscopia Raman-laser de una muestra de lisado celular, procedente de sangre de oveja positiva (afectada de escrapie), obtenida a partir del procedimiento a).

Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2.1, pero en este caso se trataba de un animal ovino que aunque no presentaba síntomas neurológicos muy claros estaba afectado de escrapie, según revelaron los tests post-mortem.

El espectro Raman correspondiente a la fracción de los elementos celulares lisados de este animal (Figura 2) presenta nuevamente bandas hacia 1654 cm^{-1} (estructuras α -helicoidales y desordenadas) y 1622 cm^{-1} como en el espectro de sangre control (Figura 1), pero aparece una nueva banda, de intensidad relativa destacada, en forma de hombro hacia 1670 cm^{-1} (espectros superior e intermedio de la Figura 2) que se manifiesta claramente en el espectro de la segunda derivada (espectro inferior de la Figura 2). Lo cual quiere decir que con respecto a la muestra control se aprecia un gran aumento en el contenido de estructura β . En efecto, la determinación del porcentaje de esta estructura considerando el perfil espectral amida I (intermedio de la Figura 2) dio como resultado 26% aproximadamente (ovena nº 9 de la Tabla 1). Estos resultados son consistentes con la presencia de proteínas priónicas infectivas, como revelaron los tests post-mortem.

Ejemplo 2.3.- Espectroscopia Raman-laser de una muestra de lisado celular, procedente de sangre de oveja sana (control), obtenida a partir del procedimiento b).

A diferencia de los Ejemplos 2.1 y 2.2, se siguió el procedimiento b) correspondiente al lisado directo de la sangre y se usaron las mismas condiciones espectroscópicas que en los ejemplos anteriores. Se partió de una muestra de sangre de una oveja sana (negativa o control). Como sucede con el método de lisado a), aparece también la banda situada hacia 1621 cm^{-1} correspondiente a restos de hemoglobina (Figura 3), y el máximo de intensidad de la banda Raman amida I se sitúa hacia 1657 cm^{-1} (estructuras α -helicoidales y desordenadas). Este máximo se desplaza hacia 1654 cm^{-1} tras restar la referida banda de la hemoglobina (Figura 3, medio), y el correspondiente espectro de la segunda derivada (Figura 3 inferior) muestra como banda predominante la situada hacia 1654 cm^{-1} y un ligero hombro hacia 1675 cm^{-1} que puede estar originado por la pequeña proporción de estructura β que poseen las muestras control (ver Tabla 1), estando en este caso próxima al 6%.

Ejemplo 2.4.- Espectroscopia Raman-laser de una muestra de lisado celular, procedente de sangre de oveja positiva (afectada de escrapie), obtenida a partir del procedimiento b).

Para el lisado directo de los elementos celulares se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2.3 (procedimiento *b*), pero utilizando sangre de una oveja con síntomas clínicos de escrapie. Se usaron las mismas condiciones espectroscópicas en ambos ejemplos, y los espectros obtenidos de esta muestra (Figura 4) difieren notablemente de los correspondientes al control (Figura 3), sobre todo en lo que se refiere a la presencia de dos bandas de intensidades similares situadas hacia 1654 y 1674 cm^{-1} , siendo la última debida a la presencia de una concentración de estructura β (32%) notablemente superior a la del control (6%). Por consiguiente, mediante el método de lisado directo de los elementos celulares de la sangre también se pueden distinguir perfectamente muestras de sangre de ovinos con síntomas clínicos de escrapie respecto a los controles. Este lisado directo implica obviamente un procedimiento más abreviado que el descrito en los ejemplos 2.1 y 2.2, y por tanto supone un test rápido para la detección in-vivo de proteínas priónicas en sangre de ovinos.

Ejemplo 2.5.- Espectroscopia Raman-laser de una muestra de lisado celular, procedente de sangre de oveja positiva (afectada de escraoue), obtenida a partir del procedimiento *b*) en distintos tiempos.

Se extrajo sangre de una oveja sospechosa de escrapie, y se repitió una nueva extracción transcurrido un mes, presentando entonces el animal síntomas neurológicos inequívocos de la enfermedad. Siguiendo el procedimiento *b* de lisado de los elementos celulares y utilizando las mismas condiciones espectroscópicas que en el Ejemplo 2.1, se obtuvieron dos pelets acuosos cuyos espectros se incluyen en la Figura 5. Se aprecia en la Figura 5B (segunda extracción de sangre) un ligero aumento de la intensidad relativa de la banda hacia 1670 cm^{-1} comparada con la homóloga de la Figura 5A (primera extracción de sangre), sobre todo si se consideran los espectros de la segunda derivada. Además, las determinaciones cuantitativas de concentración de estructura β dieron como resultados 22% y 29% para la primera y segunda extracción sanguínea respectivamente. Se pone, pues, de manifiesto que la espectroscopía Raman-laser, usando las condiciones experimentales descritas en esta memoria, puede proporcionar información sobre la evolución sintomática de la enfermedad y su relación con la concentración de proteínas priónicas infectivas en sangre.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de detección de proteínas priónicas infectivas en animales caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- 5 a) obtención de una fracción de lisado de elementos celulares, enriquecida en proteínas PrP^{Sc}, a partir de muestras biológicas de animales o humanos, y
- b) la identificación por espectroscopía Raman-laser de proteínas PrP^{Sc} en dicha fracción de lisado.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque el paso a) para obtener la fracción de lisado de elementos celulares comprende los siguientes pasos:

- 10 - extracción de sangre, 6-8 mililitros, con EDTA 1,4 mM,
- centrifugación refrigerada a 4°C (6.000-8.000 rpm) durante 30 minutos,
- resuspensión del pelet de elementos celulares en aproximadamente 10 ml de disolución salina isotónica (NaCl 154 mM, osmomolaridad 307 miliosmomolar mOsm/L, pH \cong 4,5-7), invirtiendo el tubo suavemente y con breves agitaciones en Vórtex hasta conseguir la completa disgregación del pelet,
- 15 - choque osmótico de la suspensión anterior, con aproximadamente 60 ml de agua Milli-Q (Millipore), (unas 10 veces el volumen de muestra inicial),
- centrifugación de la suspensión resultante a 10.000-12.000 rpm,
- 20 - eliminación del sobrenadante y de una fracción mucosa (libre de proteínas PrP^{Sc}), por decantación o aspiración exhaustiva con el fin de obtener un pelet acuoso concentrado en priones. Una muestra del pelet acuoso final se recogió del fondo del tubo mediante homogeneización con pipeta Pasteur para sus posteriores análisis.

25 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso a) para obtener la fracción de lisado de elementos celulares se realiza según la reivindicación 2 excepto que no se realiza la separación previa entre los componentes celulares y no celulares de la muestra biológica.

30 4.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque la identificación de proteínas priónicas infectivas en la fracción de lisados celulares se realiza mediante un proceso de identificación cualitativa por espectroscopía Raman-laser que comprende, al menos:

- a) medida del espectro Raman de dicha fracción en la región espectral amida I, comprendida entre 1600 y 1700 cm^{-1} , y
- b) la identificación de la presencia de proteínas PrP^{Sc} en dicha fracción cuando se observe una señal característica entre 1660 y 1680 cm^{-1} , o más preferentemente entre 1670-1675 cm^{-1} .

5

5.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque la identificación de proteínas priónicas infectivas en la fracción de lisados celulares se realiza mediante un proceso de identificación cuantitativa por espectroscopía Raman-laser que comprende, al menos:

- 10 a) la medida del espectro Raman de dicha fracción en la región espectral amida I comprendida entre 1600 y 1700 cm^{-1} ,
- b) la sustracción espectral de la contribución del agua, hemoglobina y residuos aromáticos de cadenas laterales de proteínas,
- c) la determinación del porcentaje de estructura proteica β ,
- 15 d) la identificación cuantitativa de la presencia de proteínas PrP^{Sc} en dicha fracción cuando se observe un porcentaje de estructura proteica β de, al menos un 10%, o preferentemente mayor del 15%.

20 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 caracterizado porque la muestra biológica puede provenir de un fluido biológico, entre otros, sangre, suero, líquido cefalorraquídeo y linfático, y orina, o de un tejido que ha sido solubilizado.

7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 caracterizado porque los seres vivos objeto de análisis pertenecen, entre otros, al siguiente grupo: ovejas, vacas, cabras, visones, ciervos, gatos, roedores, y humanos.

25 8.- Uso de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7 para el diagnóstico de animales infectados de EETs y el estudio de la evolución de la infección, entre otras, de escrapie en ovinos y caprinos, encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), la enfermedad crónica caquetizante del ciervo, la encefalopatía espongiiforme transmisible del visón y gatos, nueva variante de la enfermedad de
30 Creutzfeldt-Jakob (vCJD), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Jakob, el insomnio familiar fatal y kuru.

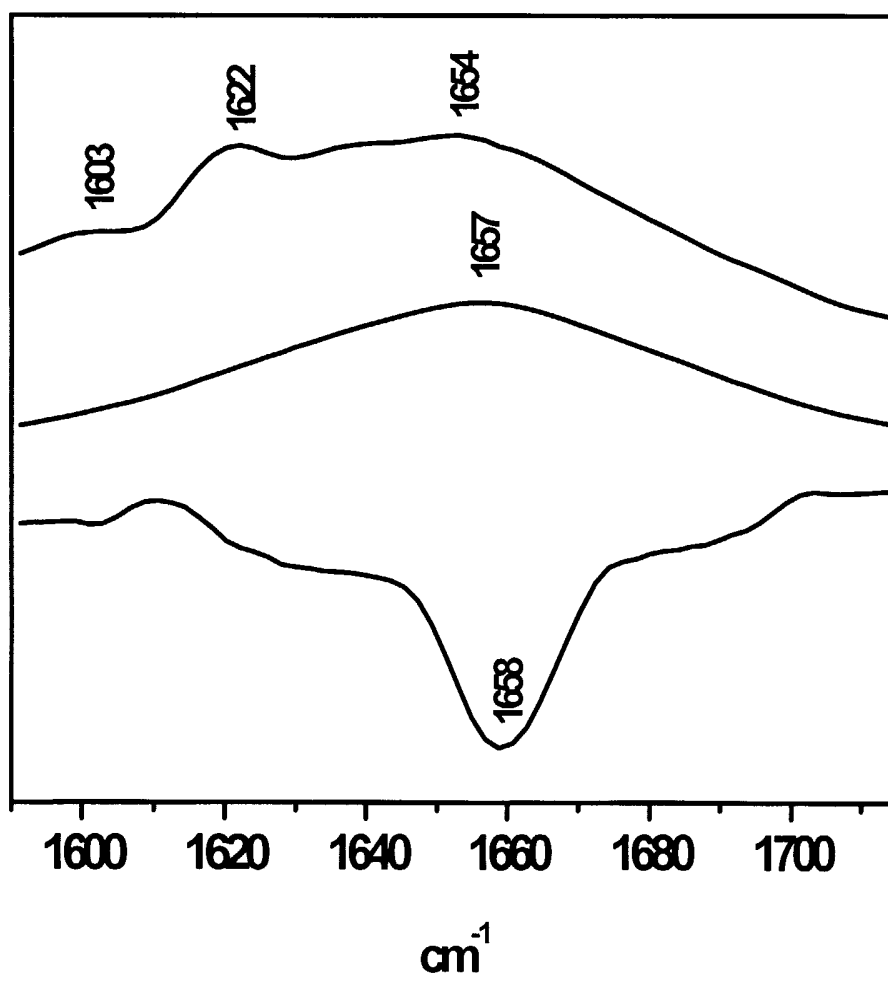


Figura 1

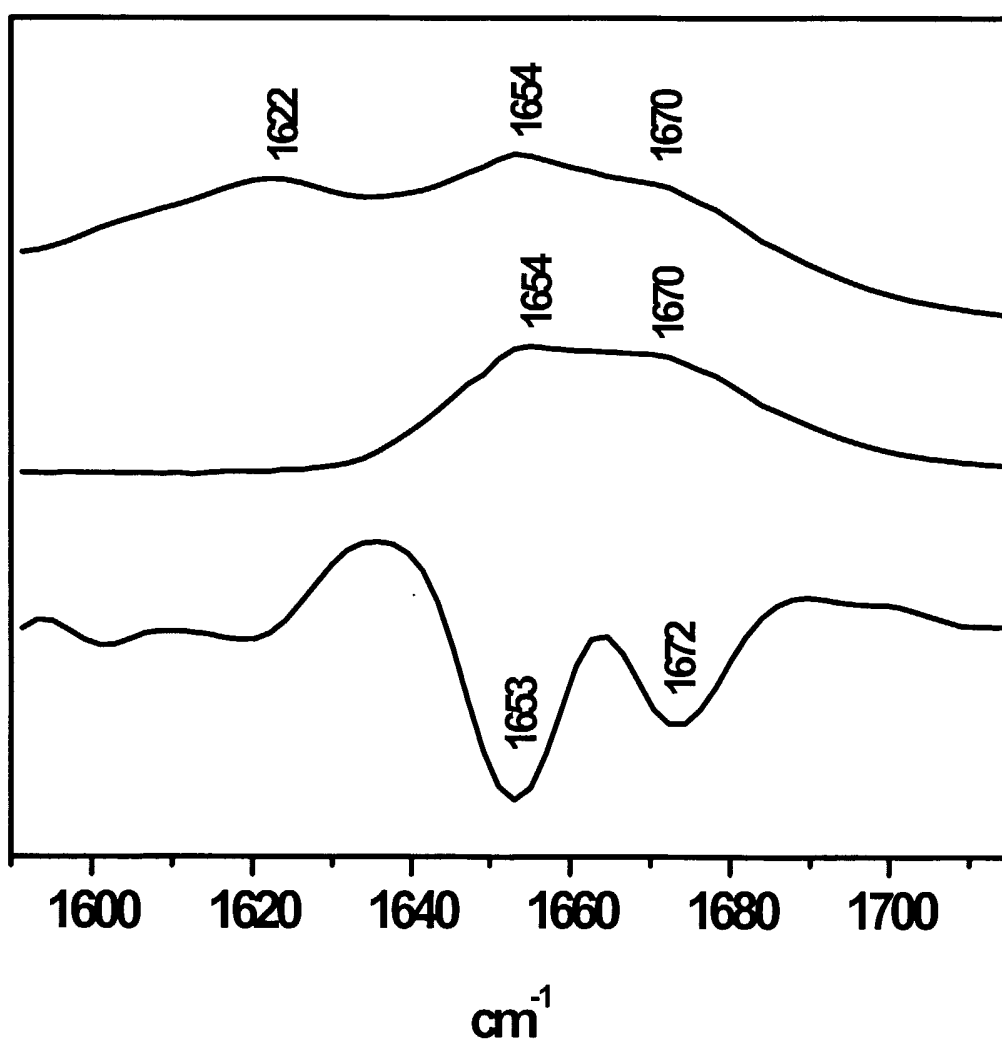


Figura 2

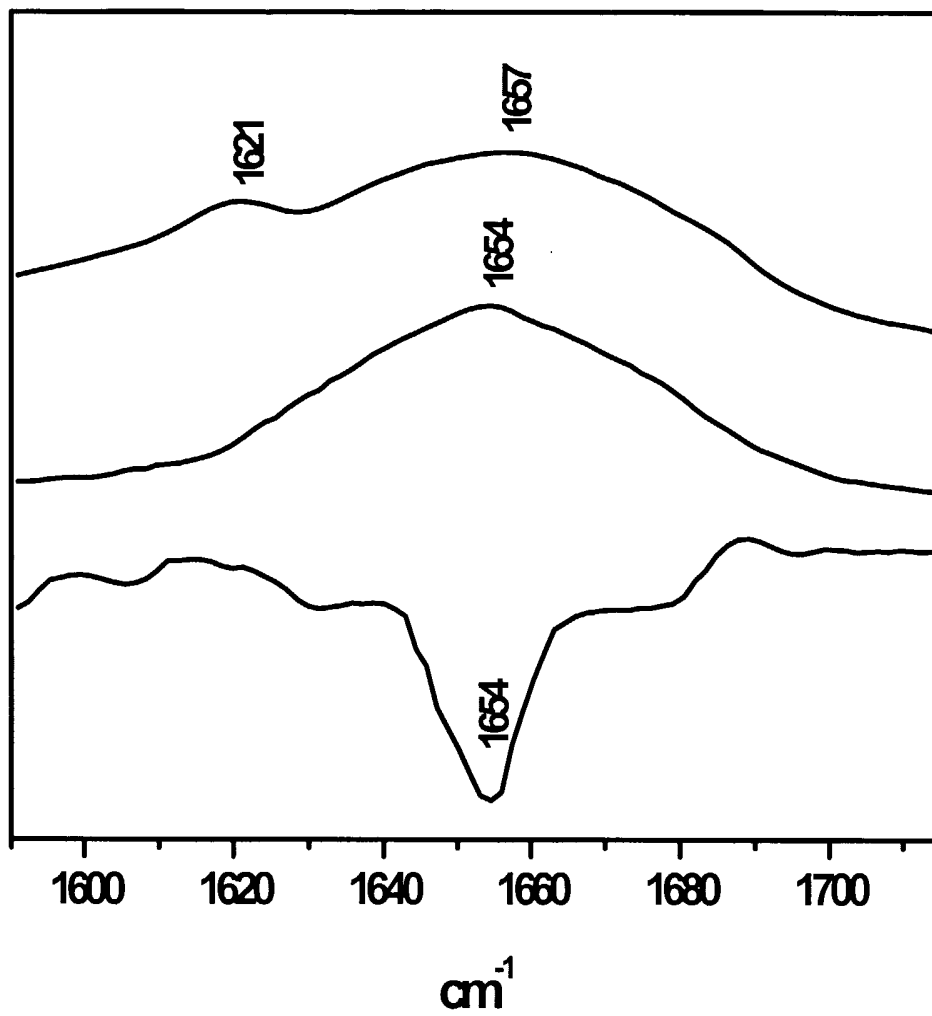


Figura 3

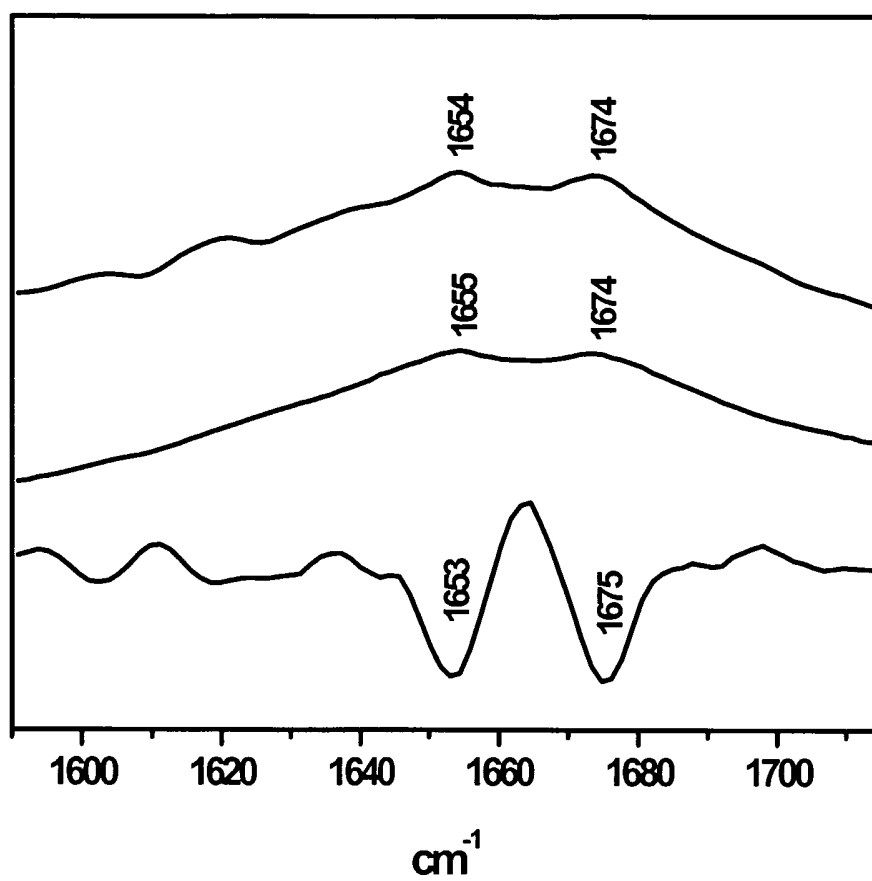


Figura 4

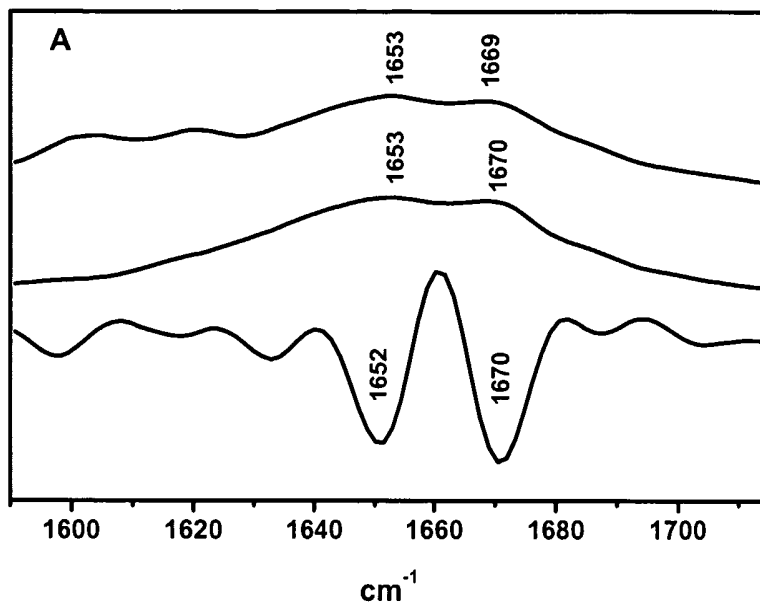


Figura 5A

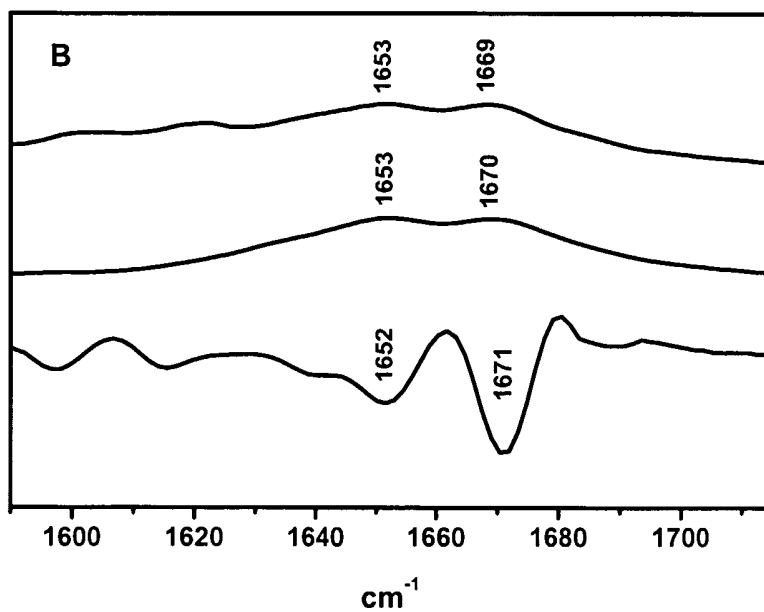


Figura 5B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 03/00353

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC⁷ G01N21/65, G01N33/68</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																				
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>IPC⁷ G01N</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p>CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE</p>																				
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CAUGHEY B. et al. "Strain-dependant differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein". J Biol Chem. November 1998. vol 273, n° 48, pages 32230-32235</td> <td>1-4,6-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP 0751388 A2 (KYOTO DAI-CHI KAGAKU Co) 02.01.1997 page 3, column 4, lines 40-58, page 5,</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>DE 10061200 A1 (WEDEMEYER NIELS) 27.06.2002, abstract, claims.</td> <td>1,4-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 9732194 A1 (ASHDOWN M) 04.09.1997, page 1, claims 12-16.</td> <td>1,4-8</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CAUGHEY B. et al. "Strain-dependant differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein". J Biol Chem. November 1998. vol 273, n° 48, pages 32230-32235	1-4,6-8	Y		5	Y	EP 0751388 A2 (KYOTO DAI-CHI KAGAKU Co) 02.01.1997 page 3, column 4, lines 40-58, page 5,	5	Y	DE 10061200 A1 (WEDEMEYER NIELS) 27.06.2002, abstract, claims.	1,4-8	Y	WO 9732194 A1 (ASHDOWN M) 04.09.1997, page 1, claims 12-16.	1,4-8
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	CAUGHEY B. et al. "Strain-dependant differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein". J Biol Chem. November 1998. vol 273, n° 48, pages 32230-32235	1-4,6-8																		
Y		5																		
Y	EP 0751388 A2 (KYOTO DAI-CHI KAGAKU Co) 02.01.1997 page 3, column 4, lines 40-58, page 5,	5																		
Y	DE 10061200 A1 (WEDEMEYER NIELS) 27.06.2002, abstract, claims.	1,4-8																		
Y	WO 9732194 A1 (ASHDOWN M) 04.09.1997, page 1, claims 12-16.	1,4-8																		
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																				
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>																				
<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p>21 October 2003 (21.10.03)</p>		<p>Date of mailing of the international search report</p> <p>12 November 2003 (12.11.03)</p>																		
<p>Name and mailing address of the ISA/ SPTO</p>		<p>Authorized officer</p>																		
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 03/00353

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0751388 AB	02.01.1997	JP 9015155 A JP 9079982 A CN 1157919 A CN 1114098 B US 796476	17.01.1997 23.08.1997 27.08.1997 09.07.2003 18.08.1998
DE 10061200	27.06.2002	DE 20022224 U	11.04.2002
WO 9732194 A	04.09.1997	AU 1760997 A EP 0990134 JP 2000505551 T NZ 332214 A AU 734799 B	16.09.1997 05.04.2000 09.05.2000 29.09.2000 21.06.2001

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 03/00353

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ G01N21/65, G01N33/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP⁷ G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	CAUGHEY B. et al. "Strain-dependant differences in beta-sheet conformations of abnormal prion protein". J Biol Chem. Noviembre 1998. vol 273, nº 48, paginas 32230-32235	1-4,6-8
Y		5
Y	EP 0751388 A2 (KYOTO DAI-CHI KAGAKU Co) 02.01.1997 pagina 3, columna 4, lineas 40-58, pagina 5,	5
Y	DE 10061200 A1 (WEDEMEYER NIELS) 27.06.2002, resumen, reivindicaciones.	1,4-8
Y	WO 9732194 A1 (ASHDOWN M) 04.09.1997, pagina 1, reivindicaciones 12-16.	1,4-8

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21 Octubre 2003 (21.10.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
12 NOV 2003 12.11.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
Nº de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico
Nº de teléfono + 34 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00353

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0751388 AB	02.01.1997	JP 9015155 A JP 9079982 A CN 1157919 A CN 1114098 B US 796476	17.01.1997 23.08.1997 27.08.1997 09.07.2003 18.08.1998
DE 10061200	27.06.2002	DE 20022224 U	11.04.2002
WO 9732194 A	04.09.1997	AU 1760997 A EP 0990134 JP 2000505551 T NZ 332214 A AU 734799 B	16.09.1997 05.04.2000 09.05.2000 29.09.2000 21.06.2001