



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0714930-1 A2



* B R P I 0 7 1 4 9 3 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 26/07/2007

(43) Data da Publicação: 21/05/2013
(RPI 2211)

(51) *Int.Cl.:*

G01N 33/50

G01N 33/68

G01N 33/52

(54) Título: SONDAS PEPTÍDICAS PARA FINS
DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS

(30) Prioridade Unionista: 28/07/2006 US 60/833.854,
02/10/2006 US 60/848.358, 02/10/2006 US 60/848.358, 28/07/2006
US 60/833.854

(73) Titular(es): Adlyfe, Inc.

(72) Inventor(es): Alan Rudopph, Cindy S. Orser, Renee
Wegrzyn, Shankarrama Shivaprasad

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2007016738 de
26/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/013859de
31/01/2008

(57) Resumo: SONDAS PEPTÍDICAS PARA FINS
DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS. São apresentados agentes e
métodos que podem ser usados para diagnosticar e tratar a diversas
doenças associadas a proteínas conformacionalmente alteradas. OS
agentes e métodos podem ser usados para identificar e liberar
fármacos úteis para o tratamento de doenças associadas a proteínas
conformacionalmente alteradas.

SONDAS PEPTÍDICAS PARA FINS DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO****Pedidos relacionados**

Este pedido reivindica o benefício de prioridade sob
5 35 U.S.C. § 119(e) para o Pedido U.S. Provisório
60/833.854, depositado em 28 de julho de 2006, e Pedido
U.S. Provisório 60/848.358, depositado em 2 de outubro de
2006, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência
em suas totalidades.

10 1. Campo da invenção

A presente invenção está relacionada ao campo da
detecção de proteínas em uma forma estrutural específica,
incluindo proteínas incorretamente enoveladas (*misfolded*)
como, por exemplo, aquelas associadas a estados de doença,
15 e ao tratamento desses estados de doença. Mais
particularmente, a presente invenção está relacionada a
métodos, sondas e kits para a detecção de proteínas em uma
forma estrutural específica em amostras como, por exemplo,
amostras biológicas e clínicas ou *in vivo*. Em algumas
20 modalidades, as proteínas estão associadas a doenças
amiloidogênicas. A invenção também está relacionada a
métodos, agentes e kits para o tratamento de doenças
associadas a essas proteínas, e para a identificação de
outros agentes úteis para o tratamento dessas doenças.

25 2. Fundamentos

Diversas doenças estão associadas a uma forma
estrutural específica de uma proteína (por exemplo, uma
"proteína incorretamente enovelada" ou uma proteína auto-
agregada), enquanto a proteína em uma forma estrutural
30 diferente (por exemplo, uma "proteína normal") não é

danosa. Em muitos casos, a proteína normal é solúvel, enquanto a proteína incorretamente enovelada forma agregados insolúveis. Exemplos dessas proteínas insolúveis incluem príons na encefalopatia espongiforme transmissível (TSE); peptídeo-A β em placas amilóides da doença de Alzheimer (AD), angiopatia amilóide cerebral (CAA) e doença vascular cerebral (CVD); depósitos de α -sinucleína em corpos de Lewy da doença de Parkinson, tau em emaranhados neurofibrilares na demência frontal temporal e doença de Pick; superóxido dismutase na esclerose amiotrófica lateral; e Huntingtina na doença de Huntington. Veja, por exemplo, Glenner e cols., *J. Neurol. Sci.* 94:1-28, 1989; Haan e cols., *Clin. Neurol. Neurosurg.* 92(4): 305-310, 1990.

Freqüentemente, essas proteínas insolúveis formam agregados compostos por fibrilas não ramificadas com a característica comum de uma conformação de folha dobrada β . No sistema nervoso central (SNC), o amilóide pode estar presente nos vasos sangüíneos cerebrais e meníngeos (depósitos cerebrovasculares) e no parênquima cerebral (placas). Estudos neuropatológicos em modelos humanos e animais indicam que células proximais aos depósitos amilóides são alteradas em sua função normal. Veja, por exemplo, Mandybur, *Acta Neuropathol.* 78: 329-331, 1989; Kawai e cols., *Brain Res.* 623: 142-146, 1993; Martin e cols., *Am. J. Pathol.* 145: 1.348-1.381, 1994; Kalaria e cols., *Neuroreport* 6: 477-80, 1995; Masliah e cols., *J. Neurosci.* 16: 5.795-5.811, 1996. Outros estudos adicionalmente indicam que fibrilas amilóides podem, na verdade, iniciar neurodegeneração. Veja, por exemplo,

Lendon e cols., *J. Am. Med. Assoc.* 277: 825-831, 1997; Yankner, *Nat. Med.* 2: 850-852, 1996; Selkoe, *J. Biol. Chem.* 271: 18.295-18.298, 1996; Hardy, *Trends Neurosci.* 20: 154-159, 1997.

5 **A. Príons e doenças associadas a príons**

Príons são patógenos de infecções que causam encefalopatias espongiformes de sistema nervoso central em seres humanos e animais. Príons são diferentes de bactérias, vírus e viróides. Um precursor de prion
10 potencial é uma proteína denominada PrP²⁷⁻³⁰, uma glicoproteína hidrofóbica de 28 quilodáltons que se polimeriza (agrega) em filamentos em forma de bastão encontrados como placas em cérebros infectados. O homólogo normal da proteína difere de príons pelo fato de que é
15 facilmente degradável, enquanto príons são altamente resistentes às proteases. Foi sugerido que príons possam conter quantidades extremamente pequenas de ácido nucléico altamente infeccioso, indetectáveis por métodos de ensaio convencionais. Veja, por exemplo, Benjamin Lewin, "Genes
20 IV", Oxford Univ. Press, Nova York, 1990, na página 1.080. No entanto, a hipótese predominante atualmente é que não é necessário um componente de ácido nucléico para a infectividade da proteína de prion.

Os genes que codificam a proteína de prion completa
25 foram clonados, seqüenciados e expressos em animais transgênicos. A proteína de prion celular normal, PrP^C, é codificada por um gene do hospedeiro de cópia única e é normalmente encontrada na superfície externa de neurônios. Durante um processo pós-tradução, uma proteína denominada
30 PrP^{Sc} é formada a partir da isoforma celular PrP (PrP^C)

normal, e causa a doença de príon. PrP^{Sc} é necessária tanto para a transmissão quanto para a patogênese das doenças neurodegenerativas transmissíveis de animais e seres humanos.

5 A proteína de príon normal (PrP^{C}) é uma metaloglicoproteína da superfície celular que possui, em grande parte, uma estrutura de hélice α e de alça helicoidal. Acredita-se que sirva como um antioxidante e supõe-se que esteja associada à homeostasia celular. A forma anormal
10 (PrP^{Sc}) é uma conformação que é resistente às proteases e possui uma estrutura secundária que contém predominantemente folhas β (β -sheets). Acredita-se que essa mudança conformacional na estrutura secundária leve à agregação e eventual depósito de placa neurotóxica no
15 processo da doença de príon.

Doenças associadas a príons incluem scrapie de carneiros e cabras, doença de emaciação crônica de veados e alces e encefalopatia espongiforme transmissível bovina (BSE) do gado. Veja, por exemplo, Wilesmith e Wells,
20 *Microbial. Immunol.* 172: 21-38, 1991. Foram identificadas quatro doenças de príon de seres humanos: (1) kuru, (2) doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD), (3) doença de Gerstmann-Strassler-Scheinker (GSS) e (4) insônia familiar fatal (FFI). Veja, por exemplo, Gajdusek, D. C., *Science* 197:
25 943-969, 1977; Medori e cols. *N. Engl. J. Med.* 326: 444-449, 1992.

Doenças de príons são transmissíveis e insidiosas. Por exemplo, os longos períodos de incubação associados às doenças de príon não revelarão a extensão completa de CJD
30 iatrogênica por décadas em milhares de pessoas tratadas com

hormônio do crescimento humano derivado de cadáver (HGH) em todo o mundo. A importância da detecção de príons em produtos biológicos foi ressaltada pela possibilidade de que príons bovinos tenham sido transmitidos a seres humanos
5 que desenvolveram uma nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (nvCJD). Veja, por exemplo, Chazot e cols., *Lancet* 347: 1.181, 1996; Will e cols., *Lancet* 347: 921-925, 1996.

Doenças causadas por príons são de difícil
10 diagnóstico. A doença pode ser latente ou subclínica (príons anormais são detectáveis, mas os sintomas não são). Além disso, existem homólogos normais de uma proteína associada a príons nos cérebros de organismos não infectados, complicando ainda mais a detecção. Veja, por
15 exemplo, Ivan Roitt e cols., "Immunology", "Mosby-Year Book Europe Limited", 1993, na página 15.1.

As técnicas atuais usadas para detectar a presença de infecções relacionadas a príons se baseiam em alterações morfológicas grosseiras no cérebro e em técnicas
20 imunoistoquímicas que são geralmente aplicadas apenas após as manifestações dos sintomas. Muitos dos métodos de detecção atuais são ensaios baseados em anticorpos, ou se baseiam em cromatografia por afinidade. Eles utilizam tecido cerebral de animais mortos ou, em alguns casos,
25 imunoeletroforese capilar de amostras de sangue.

Os ensaios baseados em tecido cerebral podem levar à detecção tardia e necessitam do abate do animal a ser testado. "Prionic-Check" (Prionics AG), um teste diagnóstico para encefalopatia espongiforme transmissível
30 bovina, também envolve o abate de um animal para obter uma

amostra liquefeita de tecido cerebral, que é submetida a um anticorpo usando *Western Blot*. Embora os resultados sejam obtidos em seis a sete horas, o teste não considera o intervalo de tempo de seis meses entre o acúmulo de PrP^{Sc} no cérebro e o surgimento de sintomas clínicos. A coleta de biópsia de amígdala e de sangue e líquido cefalorraquidiano, embora precisa, pode exigir uma intervenção cirúrgica e leva semanas até que sejam obtidos os resultados. A espectroscopia de massa por ionização por eletrospray (ESI-MS), ressonância magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular (CD) e outras técnicas estruturais não amplificadas exigem grandes quantidades de amostras e equipamento caros que tipicamente se localizam a uma distância substancial da fonte da amostra. Outras doenças associadas às proteínas conformacionalmente alteradas apresentam dificuldades similares.

B. Encefalopatias transmissíveis espongiformes (TSEs)

Encefalopatias transmissíveis espongiformes ou "TSEs" são doenças neurodegenerativas fatais que incluem distúrbios humanos como, por exemplo, CID e kuru. Formas animais de TSE incluem scrapie em carneiros, CWD em veados e alces e BSE no gado. Essas doenças são caracterizadas pela formação e acúmulo no cérebro de uma isoforma anormal resistente à proteinase K (PrP-res) de uma proteína de príon normal sensível à protease codificada pelo hospedeiro (PrP-sen). PrP-res é formada a partir de PrP-sen por um processo pós-tradução que envolve mudanças conformacionais que convertem o PrP-sen em um agregado molecular e PrP-res que possui um teor maior de folha β . A formação desses agregados macromoleculares de PrP-res está intimamente

associada à patologia cerebral mediada por TSE, na qual são formados depósitos amilóides de PrP-res no cérebro, o qual, eventualmente, se torna "espongiforme" (preenchido com orifícios).

5 A PrP-sen proteína celular é uma sialoglicoproteína codificada por um gene que, em seres humanos, está localizado no cromossomo 20. O gene de PrP é expresso tanto em tecidos neurais quanto não neurais, com a maior concentração de seu mRNA sendo encontrada em neurônios. O
10 produto da tradução do gene de PrP consiste em 253 aminoácidos em seres humanos, 254 aminoácidos em hamsters e camundongos, 264 aminoácidos em vacas e 256 aminoácidos em carneiros (todas essas seqüências são reveladas na Patente U.S. N° 5.565.186, que descreve métodos de produção de
15 camundongos transgênicos que expressam PrP espécie-específico e é aqui incorporada por referência). Em encefalopatias relacionadas à proteína de príon, o PrP-sen celular é convertido no PrP-res alterado. PrP-res se distingue de PrP-sen pelo fato de que PrP-res se agrega
20 (veja, por exemplo, Caughey e Chesebro, *Trends Cell. Biol.* 7: 56-62, 1997); ele é pelo menos parcialmente resistente à digestão por proteinase K (somente aproximadamente os 67 aminoácidos do terminal N são removidos por digestão por proteinase K sob condições nas quais PrP-sen é
25 completamente degradado) (veja, por exemplo, Prusiner e cols., *Sem. Virol.* 7: 159-173, 1996); e possui, quando comparado com PrP-sen, menos estrutura α helicoidal e mais estrutura folhas β (veja, por exemplo, Pan e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10.962-10.966, 1993).

30 Caso PrP-sen não seja expresso no tecido cerebral de

receptores animais de neuroenxertos infectados de scrapie, não ocorrerá nenhuma patologia fora do enxerto, o que demonstra que PrP-res e PrP-sen são, ambos, necessários para a patologia. Veja, por exemplo, Brander e cols.,
5 Nature 379: 339-343, 1996. O longo período de latência entre a infecção e o aparecimento de doença (meses a décadas, dependendo da espécie) propiciou o desenvolvimento de um teste *in vitro* sem células, no qual PrP-res induz a conversão de PrP-sen em PrP-res. Veja, por exemplo,
10 Kockisko e cols., Nature 370: 471-474, 1994; Prusiner e cols., WO 97/16728). Essas observações *in vivo* e *in vitro* indicaram que PrP-res e PrP-sen interagem para formar PrP-res e promovem a patogênese da TSE. O termo "interagir", como aqui usado, visa incluir interações detectáveis (por
15 exemplo, interações bioquímicas) entre moléculas como, por exemplo, interações proteína-proteína, proteína-ácido nucléico, ácido nucléico-ácido nucléico, proteína-pequena molécula ou ácido nucléico-pequena molécula.

Foi demonstrado previamente que peptídeos sintéticos
20 pequenos que contêm certas seqüências de PrP se agregam espontaneamente para formar fibrilas com um alto grau de estrutura secundária de folha β do tipo observado nos depósitos insolúveis em cérebros atingidos pela TSE. Veja, por exemplo, Gasset e cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:
25 10.940-10.944, 1992; Come e cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5.959-5.963, 1993; Forloni e cols., Nature 362: 543-546, 1993; Hope e cols., Neurodegeneration 5: 1-11, 1996. Além disso, demonstrou-se que outros peptídeos PrP sintéticos interagem com moléculas de PrP-sen para formar
30 um complexo agregado com resistência à protease aumentada.

Veja, por exemplo, Kaneko e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11.160-11.164, 1995; Kaneko e cols., *J. Mol. Biol.* 270: 574-586, 1997.

C. Proteínas amilóides e doenças associadas

5 Na AD, CAA e CVD, o principal componente amilóide é a proteína amilóide beta ($A\beta$). A proteína $A\beta$, que é gerada a partir da proteína amilóide beta precursora (APP) pela ação de duas supostas secretases, está presente em níveis baixos no SNC e sangue normais. Como a APP pode ser clivada em
10 vários locais, a proteína $A\beta$ de ocorrência natural não é um produto homogêneo. Duas formas abundantes encontradas em placas amilóides são $A\beta_{1-40}$ (também denominada $A\beta_{40}$) e $A\beta_{1-42}$ (também denominada $A\beta_{42}$), que são produzidas por truncamento alternativo do terminal carboxi de APP. Veja,
15 por exemplo, Selkoe e cols., *PNAS USA* 85: 7.341-7.345, 1988; Selkoe, *Trends Neurosci.* 16: 403-409, 1993. $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$ possuem seqüências de aminoácidos idênticas, com $A\beta_{42}$ tendo dois resíduos adicionais (Ile e Ala) em seu terminal C. Embora $A\beta_{40}$ seja mais abundante, $A\beta_{42}$ é a mais
20 fibrillogênica e é o componente principal das duas em depósitos amilóides tanto de AD quanto de CAA. Veja, por exemplo, Wurth e cols., *J. Mol. Biol.* 319: 1.279-90 (2002).

Níveis plasmáticos elevados de $A\beta_{42}$ foram associados à AD, e com risco aumentado para AD. Além disso, demonstrou-se
25 se que a magnitude da proporção dos níveis de $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ possui significância clínica para AD, CAA e outras condições como, por exemplo, depressão da vida tardia (LLMD). Veja, por exemplo, Pomara e cols. *Neurochem. Res.* (2006). Os níveis plasmáticos de $A\beta_{42}$ e $A\beta_{40}$ são
30 tipicamente determinados com o uso de anticorpos

monoclonais.

Além dos depósitos amilóides em casos de AD descritos acima, a maioria dos casos de AD está associada a depósito amilóide nas paredes vasculares. Veja, por exemplo, Hardy, 5 1997, *supra*; Haan e cols., 1990, *supra*; Terry e cols., *supra*; Vinters H.V., *Cerebral amyloid angiopathy, Stroke* Mar-Abr; 18(2): 311-324, 1987; Itoh Y., e cols. "Subpial beta/A4 peptide deposits are closely associated with amyloid angiopathy in the elderly", *Neurosci. Lett.* 155(2): 10 144-147, Jun. 11, 1993; Yamada M., e cols., "Subarachnoid haemorrhage in the elderly: a necropsy study of the association with cerebral amyloid angiopathy", *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 56(5): 543-547, Maio, 1993; Greenberg S.M., e cols., "The clinical spectrum of cerebral amyloid 15 angiopathy: presentations without lobar hemorrhage", *Neurology* 43(10): 2.073-2.079, outubro de 1993. Essas lesões vasculares foram as características principais da CAA, que podem existir na ausência de AD.

Embora a base molecular da AD ainda não tenha sido 20 estabelecida, a doença está associada a montagens neurotóxicas de A β 42. Pessoas normais possuem proteína A β solúvel circulando no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR). Alguns estudos *in vitro* indicam que a neurotoxicidade está correlacionada com a presença de 25 montagens fibrilares de A β 42 e com a conformação de folha β de A β 42. Foi relatado que algumas moléculas presentes no LCR inibem a formação de fibrila de A β 42 como, por exemplo, apolipoproteína E (ApoE), apolipoproteína J (ApoJ), componente amilóide sérico P (SAP), transtiretina (TTR), 30 antiquimotripsina (ACT) e α 2-macroglobulina (α 2M), embora

também haja relatos de que apoE e ACT promovem a montagem de A β 42 em filamentos *in vitro*. Também foi demonstrado que anticorpos anti-A β humanos bloqueiam a formação de fibrila de A β 42 e evitam a neurotoxicidade induzida por A β 42 *in vitro*. Veja, por exemplo, Ono e cols., *Neurobiol. Disease* 20: 233-40 (2005).

O mecanismo de formação de fibrila de A β *in vitro* foi explicado por um modelo dependente de nucleação, com duas fases. A primeira fase, formação do núcleo, envolve a associação de monômeros, e acredita-se que seja uma etapa limitante da taxa, termodinamicamente desfavorável na formação de fibrila. A fase seguinte, extensão, envolve a adição de monômeros às extremidades de fibrilas existentes, e é mais termodinamicamente favorável. Veja, por exemplo, Ono e cols., *supra*.

Outra forma patogênica da proteína A β consiste em oligômeros A β solúveis (também conhecidos como ligantes oligoméricos A β , ou ADDLs). A atividade neurotóxica de ADDLs foi estabelecida em vários modelos *in vitro*, e verificou-se que os níveis no cérebro humano de ADDL estão acentuadamente elevados em pacientes com AD. Veja, por exemplo, Gong e cols., *PNAS* 100: 10.417-22 (2003).

A transtiretina humana (TTR) é uma proteína plasmática normal composta por quatro unidades estruturadas idênticas, predominantemente de folha β , e ela serve como um transportador do hormônio tiroxina. A automontagem anormal de TTR em fibrilas amilóides causa duas formas de doença humana, especificamente amiloidose sistêmica senil (SSA) e polineuropatia amilóide familiar (FAP). Veja, por exemplo, Kelly, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6(1): 11-17, 1996. A causa

da formação de amilóide na FAP consiste em mutações pontuais no gene de TTR; a causa de SSA é desconhecida. O diagnóstico clínico é estabelecido histologicamente pela detecção de depósitos de amilóide *in situ* em material de biópsia.

Até hoje, sabe-se pouco sobre o mecanismo da conversão de TTR em amilóide *in vivo*. No entanto, vários laboratórios demonstraram que a conversão de amilóide pode ser simulada *in vitro* por desnaturação parcial de TTR humana normal. Veja, por exemplo, McCutchen e cols., *Biochemistry* 32(45): 12.119-12.127, 1993; McCutchen e Kelly, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197(2): 415-421, 1993. O mecanismo de transição conformacional envolve um intermediário conformacional monomérico que se polimeriza em fibrilas amilóides estruturadas lineares em folha β . Lai e cols., *Biochemistry* 35(20): 6.470-6.482, 1996. O processo pode ser atenuado por ligação com moléculas estabilizantes como, por exemplo, tiroxina ou triiodofenol. Miroy e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(26): 15.051-15.056, 1996.

O mecanismo preciso pelo qual as placas neuríticas são formadas e o relacionamento da formação de placa com os processos neurodegenerativos associados à doença não estão bem definidos. As fibrilas amilóides nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer e doença de príon são conhecidas por resultarem na ativação inflamatória de certas células. Por exemplo, culturas microgliais primárias e a linhagem de células monocíticas THP-1 são estimuladas por β -amilóide fibrilar e peptídeos de príon para ativar cascatas idênticas de transdução de sinal inflamatórias dependentes de tirosina quinase. A resposta de sinalização

despertada por β -amilóide e fibrilas de príon leva à produção de produtos neurotóxicos, que são em parte responsáveis pela neurodegeneração. Veja, por exemplo, Combs e cols., *J. Neurosci.* 19: 928-939, 1999.

5 Os métodos de detecção para proteínas conformacionalmente alteradas associadas aos distúrbios mencionados anteriormente como, por exemplo, AD, CAA e CVD, também são inadequados pelo fato de que, da mesma forma que as técnicas de detecção de príon mencionadas previamente,
10 eles freqüentemente necessitam de coleta de tecido *post-mortem*. Além disso, ensaios baseados em anticorpos podem não ser eficazes, pois anticorpos podem não distinguir as formas da proteína causadoras de doença da proteína normal.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 A presente invenção fornece métodos, sondas, agentes e kits que podem ser usados para diagnosticar e tratar diversas doenças associadas às proteínas em um estado estrutural específico. Os agentes e métodos também podem ser usados para identificar outros agentes úteis para o
20 tratamento ou prevenção dessas doenças.

De acordo com uma modalidade, é fornecido um método para a identificação de uma proteína-alvo presente em um estado específico de auto-agregação em uma amostra, que compreende: (a) o contato da amostra com uma sonda
25 peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação; e (b) a detecção de qualquer ligação entre a sonda peptídica e qualquer proteína-alvo presente no estado específico de auto-agregação,
30 identificando, dessa forma, qualquer proteína-alvo presente

no estado específico de auto-agregação. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e auto-agregados insolúveis. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em auto-agregados amorfos insolúveis, protofibrilas e fibrilas.

Em algumas modalidades, a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína amilóide beta ou peptídeo A β , amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa de fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

Em algumas modalidades, a sonda peptídica ainda compreende um marcador detectável. Em algumas modalidades, a sonda peptídica é imobilizada em um suporte sólido.

Em modalidades específicas, a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de ID.

DE SEQ. N°: 36 e ID. DE SEQ. N°: 45.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método *in vivo* para a identificação de uma proteína-alvo presente em um paciente em um estado específico de auto-agregação, que compreende: (a) a administração ao paciente de uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo no estado específico de auto-agregação e em que a sonda peptídica é marcada com um marcador detectável; e (b) a avaliação do indivíduo quanto à sonda peptídica marcada localizada na proteína-alvo presente no paciente, identificando, dessa forma, proteína-alvo presente no paciente no estado específico de auto-agregação. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e auto-agregados insolúveis.

Em algumas modalidades, a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína beta ou peptídeo A β amilóide, amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos destas β_2 -microglobulina, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa de fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e

proteína cistatina C.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método para evitar a formação de agregados protéicos de uma proteína-alvo, que compreende o contato da proteína-alvo com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação, evitando, dessa forma, a formação de agregados protéicos de ordem superior da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e auto-agregados insolúveis.

Em algumas modalidades, a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína beta ou peptídeo A β amilóide, amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa de fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método de liberação de um agente terapêutico a uma proteína-alvo,

que compreende a combinação do agente terapêutico com uma sonda peptídica para a proteína-alvo e administração da combinação de sonda peptídica-agente terapêutico a um paciente que dela necessite. Em algumas modalidades, a

5 sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação

10 alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta e a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação como, por exemplo,

15 monômeros, oligômeros solúveis e agregados insolúveis. Em algumas modalidades, o agente terapêutico possui atividade anti-amilóide.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a

20 agregação de uma proteína-alvo, que compreende: (A) o contato de uma proteína de fusão e de um agente de teste, a proteína de fusão compreendendo: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que: (a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a

25 uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a

30 sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento

total da proteína-alvo; e (ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão; (B) a detecção de um sinal gerado pelo marcador; e (C) a correlação do sinal com a capacidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende: (A) o contato da proteína-alvo, uma proteína de fusão, e um agente de teste, a proteína de fusão compreendendo: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que: (a) a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a sequência de comprimento total da proteína-alvo; e (ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão; (B) a detecção de um sinal gerado pelo marcador; e (C) a correlação do sinal com a capacidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende: (A) a submissão de uma proteína de fusão às condições que promovem agregação, a proteína de fusão compreendendo: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que: (a) a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que

corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e (ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão; (B) a detecção de um primeiro sinal gerado pelo marcador; (C) a submissão da proteína de fusão às condições que promovem agregação na presença de um agente de teste, e a detecção de um segundo sinal gerado pelo marcador; e (D) a avaliação das intensidades relativas do primeiro e segundo sinais, identificando, dessa forma, um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende: (A) o contato de uma proteína de fusão e a proteína-alvo, em que a proteína de fusão compreende (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que: (a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e (ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão; (B) a detecção de

um primeiro sinal gerado pelo marcador; (C) o contato da proteína de fusão, da proteína-alvo e de um agente de teste, e a detecção de um segundo sinal gerado pelo marcador; e (D) a avaliação das intensidades relativas do primeiro e segundo sinais, identificando, dessa forma, um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método de identificação de uma sonda peptídica para uma proteína-alvo que exhibe uma tendência aumentada ou diminuída para formar agregados em relação a uma sonda peptídica de referência, que compreende: (A) a detecção de um primeiro sinal gerado por uma proteína de fusão de referência que compreende (i) uma sonda peptídica de referência que compreende (a) uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) em que a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica de referência não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e (ii) proteína fluorescente verde; (B) a detecção de um segundo sinal gerado por uma proteína de fusão de teste que compreende uma sonda peptídica de teste e proteína fluorescente verde, em que a sonda peptídica de teste é um mutante da sonda peptídica de referência que compreende uma inserção, eliminação ou substituição de aminoácidos em relação à seqüência de aminoácidos da sonda peptídica de referência; e (C) a correlação da intensidade do segundo sinal em relação ao primeiro sinal, identificando, dessa forma, uma

sonda peptídica para uma proteína-alvo que exibe uma tendência aumentada ou diminuída para formar agregados em relação à sonda peptídica de referência.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método
5 de identificação de uma sonda peptídica específica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico que se enquadra em um espectro de estados estruturais que varia de um limite inferior de monômeros solúveis a um limite superior de auto-agregados insolúveis, que compreende: (A)
10 a submissão de uma proteína de fusão às condições que promovem auto-agregação, a proteína de fusão compreendendo: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que: (a) a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma
15 mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a sequência de comprimento
20 total da proteína-alvo; e (ii) proteína fluorescente verde; (B) a detecção de um sinal gerado pela proteína de fusão; e (C) a correlação da intensidade do sinal com a especificidade da sonda peptídica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico, identificando, dessa
25 forma, uma sonda peptídica específica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico.

De acordo com outra modalidade, é fornecido um método para o tratamento de uma doença associada a uma proteína-alvo, que compreende o contato da proteína-alvo com uma
30 proteína de fusão que compreende: (i) uma sonda peptídica

para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo e (ii) um agente terapêutico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

5 A FIG. 1 ilustra o monômero α -helicoidal e dímero de folha β de um conformador de TSE, juntamente com várias modalidades das sondas reveladas. A forma normal do tipo selvagem (wt) da proteína de príon (PrP^{C}) prefere um estado monomérico, enquanto a forma anormal, que causa doença
10 (PrP), prefere o estado multimérico (dimérico ou maior).

 A FIG. 2 ilustra uma análise diagnóstica de uma amostra que contém proteína de TSE composta por folhas β . A reação de cima indica o processo na presença de uma proteína incorretamente enovelada em uma amostra, enquanto
15 a reação de baixo indica o processo na ausência de uma proteína incorretamente enovelada em uma amostra.

 A FIG. 3 ilustra uma sonda palindrômica para a proteína de príon.

 A FIG. 4 ilustra a medida de fluorescência de fusão de
20 sonda peptídica de Alzheimer-GFP (Alz) e fusão de sonda peptídica de Príon-GFP (Pri). Foram feitas medidas após indução de expressão e incubação das células por 3 horas a 37°C (gráfico da esquerda) ou 5 horas a 30°C (gráfico da direita).

25 A FIG. 5 ilustra a fluorescência característica de monômeros (medida a 378 nm) e dímeros (medida a 495 nm) de sondas peptídicas marcadas com pireno.

 A FIG. 6 ilustra a reatividade de uma sonda peptídica específica para proteína PrP^{Sc} com PrP^{Sc} presente em trinta
30 frações obtidas de amostras de cérebro de hamster infectado

por scrapie. O eixo y mostra as proporções relativas de I_D/I_M de cada fração. O tamanho dos agregados de PrP^{Sc} presentes em cada fração aumenta ao longo do eixo x.

A FIG. 7 ilustra a reatividade de uma sonda peptídica
5 específica para PrP^{Sc} com PrP^{Sc} em soros de carneiros infectados, e sua ausência de reatividade com soros de carneiros normais. Na Figura, "HP 1" designa uma amostra de pool de soros de carneiros saudáveis com 3 meses de idade; "HP 2" designa uma amostra de pool de soros de carneiros
10 saudáveis com 2 anos de idade; "ln1" a "ln4" designam soro de carneiros com scrapie com 18-24 meses de idade, e "ln5" designa soro de um carneiro terminal.

A FIG. 8 ilustra a melhora na proporção sinal/ruído obtida por sonificação das amostras antes da análise da
15 reatividade de uma sonda peptídica específica para PrP^{Sc} com PrP^{Sc} em soros de carneiros infectados e carneiros normais. Na Figura, "HP 1" designa uma amostra de pool de soros de carneiros saudáveis com 3 meses de idade; "HP 2" designa uma amostra de pool de soros de carneiros saudáveis
20 com 2 anos de idade; "ln1" a "ln4" designam soro de carneiros com scrapie com 18-24 meses de idade, e "ln5" designa soro de um carneiro terminal.

A FIG. 9 ilustra a reatividade de uma sonda peptídica específica para PrP^{Sc} com PrP^{Sc} presente nos componentes
25 sangüíneos de carneiro (camada de células brancas, soro e plasma).

A FIG. 10 ilustra a fluorescência, em um ensaio de GFP baseado em células de proteínas de fusão que compreendem GFP e uma sonda peptídica específica para $A\beta$ (ID. DE SEQ.
30 N°: 36); $A\beta_{42}$ (ID. DE SEQ. N°: 42), ou para o clone mutante

de A β 42 GM6 (ID. DE SEQ. N°: 44).

A **FIG. 11** ilustra a reatividade de uma sonda peptídica específica para A β (ID. DE SEQ. N°: 36) com diferentes formas estruturais de A β 40 e A β 42. A **Fig. 11A** mostra a reatividade com fibras de A β 40 e A β 42 e não reatividade com monômeros de A β 40. A **Fig. 11B** mostra a reatividade com oligômeros de A β 40 e A β 42.

A **FIG. 12** ilustra a habilidade de uma sonda peptídica específica para A β (ID. DE SEQ. N°: 36) para detectar A β 40 e A β 42 em amostras de líquido cefalorraquidiano humano (LCR) obtidas de pacientes com Alzheimer. A sonda peptídica é capaz de estratificar pacientes com Alzheimer (preto) de pacientes saudáveis com idades combinadas (branco) com um valor $p = 0,0005$. A **Fig. 12A** apresenta os dados para cada paciente, enquanto a **Fig. 12B** apresenta os dados médios para cada grupo de pacientes.

A **FIG. 13** ilustra a habilidade de uma sonda peptídica imobilizada específica para A β 3 (ID. DE SEQ. N°: 36) para detectar A β 40 e A β 42 em amostras de soro humano de pacientes com Alzheimer. A sonda peptídica é capaz de estratificar pacientes com Alzheimer (preto) de pacientes saudáveis com idades combinadas (branco) com um valor $p = 0,045$.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece sondas e métodos para a detecção de proteínas em um estado estrutural específico, incluindo proteínas incorretamente enoveladas e proteínas auto-agregadas, tais como aquelas associadas a estados de doença, e sondas e métodos para o tratamento desses estados de doença. Mais particularmente, a presente invenção

fornece métodos, sondas e kits para a detecção de proteínas em um estado estrutural específico em uma amostra ou *in vivo*. Em algumas modalidades, as proteínas estão associadas às doenças amiloidogênicas. A invenção também fornece
5 métodos, agentes e kits para o tratamento de doenças associadas a essas proteínas, e para a identificação de outros agentes úteis para o tratamento dessas doenças.

Alguns aspectos da invenção estão relacionados ao diagnóstico e tratamento de doenças e condições associadas
10 a um estado estrutural específico de uma proteína, por exemplo, uma conformação específica ou um estado de auto-agregação de uma proteína. Proteínas que estão associadas à doença humana quando adotam um estado conformacional ou auto-agregado específico são conhecidas na técnica.
15 Exemplos de tais doenças incluem doenças amiloidogênicas.

As referências aqui citadas, incluindo patentes e pedidos de patente, são incorporadas por referência, em sua totalidade.

Os termos técnicos e científicos aqui utilizados
20 possuem os significados comumente entendidos por aqueles habilitados na técnica à qual a presente invenção pertence, a menos que definido de forma diferente. Neste, pedido é feita referência a várias metodologias conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Publicações e outros
25 materiais que apresentem essas metodologias conhecidas aos quais é feita referência são aqui incorporados por referência em suas totalidades, como se fossem apresentados em sua totalidade. Trabalhos de referência que apresentam os princípios gerais de tecnologia de DNA recombinante
30 incluem Sambrook, J., e cols. (1989) "Molecular Cloning: A

Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, N.Y.; McPherson, M.J. Ed. (1991) "Directed Mutagenesis: A Practical Approach", IRL Press, Oxford; Jones, J. (1992) "Amino Acid and Peptide Synthesis", Oxford Science Publications, Oxford; Austen, B.M. e Westwood, O.M.R. (1991) "Protein Targeting and Secretion", IRL Press, Oxford. Quaisquer materiais adequados e/ou métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica podem ser utilizados na prática da presente invenção. No entanto, são descritos materiais e métodos preferidos. Materiais, reagentes e semelhantes aos quais se faz referência na descrição e nos exemplos seguintes podem ser obtidos de fontes comerciais, a menos que observado de forma diferente.

15 A. Definições

Como aqui usadas, as formas no singular "um", "uma", "o" e "a" designam tanto o singular quanto o plural, a menos que expressamente definido para designar somente o singular.

20 Como aqui usado, o termo "cerca de" será entendido por aqueles habilitados na técnica e irá variar em algum grau dentro do contexto no qual for usado. Caso haja usos do termo que não sejam claros para aqueles habilitados na técnica considerando o contexto no qual é usado, "cerca de" 25 significará mais ou menos 10% do termo específico.

Como aqui usada, a frase "quantidade terapeuticamente eficaz" significa aquela dosagem do fármaco que fornece a resposta farmacológica específica para a qual o fármaco é administrado em um número significativo de indivíduos que 30 necessitam desse tratamento. Deve-se enfatizar que uma

quantidade terapeuticamente eficaz de um fármaco que é administrada a um indivíduo em particular em um caso em particular nem sempre será eficaz no tratamento das condições/doenças aqui descritas, embora essa dosagem seja
5 considerada como sendo uma quantidade terapeuticamente eficaz por aqueles habilitados na técnica.

Como aqui descritas, "doenças amiloidogênicas" são doenças nas quais são formadas placas amilóides ou depósitos amilóides no corpo. A formação de amilóide é
10 encentrada em diversos distúrbios como, por exemplo, diabetes, AD, scrapie, BSE, CJD, doença de emaciação crônica (CWD), encefalopatias espongiformes transmissíveis relacionadas (TSEs), e outras doenças aqui reveladas. No entanto, a invenção não se limita às doenças
15 amiloidogênicas, e é útil no diagnóstico e tratamento de qualquer doença ou condição associada a uma conformação específica ou um estado de agregação específico de uma proteína.

Como aqui usado, o termo "proteína" refere-se a
20 qualquer polímero de dois ou mais aminoácidos individuais (sejam eles de ocorrência natural ou não) ligados por meio de uma ligação peptídica, que ocorre quando o átomo de carbono do carboxil do grupo ácido carboxílico ligado ao carbono α de um aminoácido (ou resíduo de aminoácido) se
25 torna ligado covalentemente ao átomo de nitrogênio do amino do grupo amino ligado ao carbono α de um aminoácido adjacente. Essas ligações peptídicas, e os átomos que as compreendem (ou seja, átomos de carbono α , átomos de carbono do carboxil e seus átomos de oxigênio
30 substituintes, e átomos de nitrogênio do amino e seus

átomos de hidrogênio substituintes) formam a "estrutura central polipeptídica" da proteína. Nos termos mais simples, a estrutura central polipeptídica deve ser subentendida como se referindo aos átomos de nitrogênio do amino, aos átomos de carbono α e aos átomos de carbono do carboxil da proteína, e dois ou mais desses átomos (com ou sem seus átomos substituintes) também podem ser representados como um pseudoátomo. Qualquer representação de uma estrutura central polipeptídica que pode ser usada em um descritor de sítio funcional como aqui descrito será subentendida como incluída dentro do significado do termo "estrutura central polipeptídica".

Entende-se que o termo "proteína" inclui os termos "polipeptídeo" e "peptídeo" (que, em alguns momentos, podem ser aqui usados de forma intercambiável) dentro de seu significado. Proteínas podem incluir proteínas infecciosas ou "príons", como aqui revelado. Além disso, também será subentendido que proteínas que compreendem múltiplas subunidades polipeptídicas (por exemplo, DNA polimerase III, RNA polimerase II) ou outros componentes (por exemplo, uma molécula de RNA, como ocorre em telomerase) estão incluídas dentro do significado de "proteína", como aqui usado. Similarmente, fragmentos de proteínas e polipeptídeos também são contemplados, e podem ser aqui denominados "proteínas". Fragmentos podem incluir pelo menos 5 aminoácidos contíguos, pelo menos 10 aminoácidos contíguos, pelo menos 15 aminoácidos contíguos, pelo menos 20 aminoácidos contíguos, ou pelo menos 25 aminoácidos contíguos da proteína de comprimento total.

Como aqui usado, o termo "conformação" ou "limitação

conformacional" refere-se à presença de uma conformação de proteína em particular, por exemplo, uma hélice α , fitas β paralelas e antiparalelas, um zíper de leucina, um dedo de zinco etc. Além disso, limitações conformacionais podem
5 incluir informações de seqüência de aminoácidos, sem informações estruturais adicionais. Como exemplo, "-C-X-X-C-" é uma limitação conformacional que indica que dois resíduos de cisteína devem ser separados por dois outros resíduos de aminoácidos, cujas identidades são irrelevantes
10 no contexto dessa restrição específica. Uma "mudança conformacional" é uma mudança de uma conformação para outra.

"Príon" é uma contração das palavras "proteína" e "infecção". As expressões "proteína PrP", "PrP" e
15 semelhantes são aqui usadas de forma intercambiável para significar tanto a forma de partícula de infecções ("PrP") conhecidas por causar doenças (por exemplo, encefalopatias espongiformes) em seres humanos e animais, quanto a forma não infecciosa ("PrP^C") que, sob condições adequadas, é
20 convertida na forma infecciosa, PrP^{Sc}. Os termos "príon", "proteína de príon", "proteína PrP^{Sc}" e semelhantes são aqui usados de forma intercambiável para se referirem à forma infecciosa PrP^{Sc} de uma proteína PrP. Partículas de príon são compostas, em grande parte, e não exclusivamente,
25 por moléculas de PrP^{Sc} codificadas por um gene de PrP. Príons são diferentes de bactérias, vírus e viróides. Príons conhecidos infectam animais e causam scrapie, uma doença degenerativa, transmissível, do sistema nervoso de carneiros e cabras, bem como BSE (ou doença da vaca louca)
30 e encefalopatia espongiforme transmissível felina de gatos.

As quatro doenças de príon conhecidas por afetarem seres humanos são: (1) kuru, (2) CJD, (3) GSS e (4) FFI. Como aqui usado, o termo "príon" inclui todas as formas de príons que causam todas ou qualquer uma dessas doenças ou
5 outras em quaisquer animais usados e, em particular, em seres humanos e animais de criação domesticados.

O termo "gene de PrP" é aqui usado para descrever material genético que expressa proteínas que incluem polimorfismos e mutações patogênicas conhecidas. O termo
10 "gene de PrP" refere-se geralmente a qualquer gene de qualquer espécie que codifique qualquer forma de uma proteína de príon. O gene de PrP pode ser de qualquer animal, e inclui todos polimorfismos e mutações deste, sendo reconhecido que os termos incluem outros desses genes
15 de PrP que ainda serão descobertos. A proteína expressa por esse gene pode assumir uma forma PrP^C (não doença) ou PrP^{Sc} (doença).

O termo proteína A β " é aqui usado para se referir a todas as formas da proteína A β , incluindo AB40 e AB42.

20 "Proteínas ou polipeptídeos recombinantes" referem-se às proteínas ou aos polipeptídeos produzidos por técnicas de DNA recombinante, ou seja, produzidos por células, micróbios ou mamíferos, transformados por uma construção de expressão de DNA recombinante exógeno que codifica a
25 proteína ou polipeptídeo desejado. Proteínas ou polipeptídeos expressos na maioria das culturas bacterianas tipicamente serão livres de glicano. Proteínas ou polipeptídeos expressos em leveduras podem ter um padrão de glicosilação diferente daquele expresso em células de
30 mamíferos.

Proteínas ou polipeptídeos "nativos" ou "de ocorrência natural" referem-se às proteínas ou aos polipeptídeos recuperados de uma fonte que ocorre na natureza. Uma proteína ou polipeptídeo nativo incluiria modificações pós-
5 tradução, incluindo, sem limitação, acetilação, carboxilação, glicosilação, fosforilação, lipidação, acilação e clivagem.

Uma "seqüência codificadora" de DNA ou de polinucleotídeo é uma seqüência de DNA ou de
10 polinucleotídeos que é transcrita em mRNA e traduzida em um polipeptídeo em uma célula hospedeira quando colocada sob o controle de seqüências reguladoras apropriadas. Os limites da seqüência codificadora são o códon de início no terminal N 5' e o códon de parada de tradução no terminal C 3'. Uma
15 seqüência codificadora pode incluir seqüências procarióticas, cDNA de mRNA eucariótico, seqüências de DNA genômico de DNA eucariótico, e seqüências de DNA sintético. Uma seqüência de terminação de transcrição normalmente estará localizada 3' em relação à seqüência codificadora.

20 "Seqüência de DNA ou de polinucleotídeos" é um heteropolímero de desoxirribonucleotídeos (bases adenina, guanina, timina, citosina). Seqüências de DNA ou de polinucleotídeos que codificam as proteínas ou os polipeptídeos desta invenção podem ser montadas a partir de
25 fragmentos de DNA derivados de cDNA sintético e vinculadores de oligonucleotídeo curtos para fornecer um gene sintético que seja capaz de ser expresso em um vetor de expressão de DNA recombinante. Na discussão da estrutura de moléculas de DNA de fita dupla em particular, as
30 seqüências podem ser aqui descritas de acordo com a

convenção normal fornecendo somente a seqüência na direção 5' a 3' ao longo da fita não transcrita de cDNA.

"Vetor de expressão recombinante ou plasmídeo" é um vetor de DNA ou construção de plasmídeo replicável usado para amplificar ou expressar o DNA que codifica as proteínas ou polipeptídeos da presente invenção. Um vetor de expressão ou plasmídeo contém seqüências de controle de DNA e uma seqüência codificadora. Seqüências de controle de DNA incluem seqüências promotoras, sítios de ligação de ribossomo, sinais de poliadenilação, seqüências de terminação da transcrição, domínios reguladores acima e intensificadores. Sistemas de expressão recombinante, como aqui definidos, expressarão as proteínas ou os polipeptídeos da invenção mediante indução dos elementos reguladores.

"Células hospedeiras transformadas" referem-se às células que foram transformadas e transfectadas com DNA exógeno. DNA exógeno pode ou não ser integrado (ou seja, ligado covalentemente) ao DNA cromossômico que constitui o genoma da célula hospedeira. Em procariotas e levedura, por exemplo, o DNA exógeno pode ser mantido em um elemento episomal, por exemplo, um plasmídeo, ou integrado de forma estável no DNA cromossômico. Com relação às células eucarióticas, uma célula transformada de forma estável é aquela na qual o DNA exógeno foi integrado no cromossomo. Essa estabilidade é demonstrada pela habilidade das linhagens ou clones da célula eucariótica para produzir, por meio de replicação, uma população de células-filhas que contêm o DNA exógeno.

Os termos "análogo", "fragmento", "derivado" e

"variante", quando se referem aos polipeptídeos desta invenção, significam análogos, fragmentos, derivados e variantes desses polipeptídeos que retêm atividade funcional substancialmente similar ou substancialmente a
5 mesma função ou atividade biológica que os polipeptídeos de referência, como aqui descrito.

Um "análogo" inclui um pró-polipeptídeo que inclui dentro dele a seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo desta invenção.

10 Um "fragmento" é uma porção de um polipeptídeo da presente invenção que retém atividade funcional substancialmente similar ou substancialmente a mesma função ou atividade biológica que o polipeptídeo, como mostrado nos ensaios *in vitro* aqui revelados.

15 Um "derivado" inclui todas as modificações a um polipeptídeo desta invenção que substancialmente preservam as funções aqui reveladas, e incluem estrutura e função associada adicionais, por exemplo, polipeptídeos PEGuilados ou polipeptídeos fundidos à albumina, que possuem meia-vida
20 maior.

Uma "variante" inclui polipeptídeos que possuem uma seqüência de aminoácidos suficientemente similar à seqüência de aminoácidos dos polipeptídeos desta invenção. O termo "suficientemente similar" significa uma primeira
25 seqüência de aminoácidos que contém um número suficiente ou mínimo de resíduos de aminoácidos idênticos ou equivalentes em relação a uma segunda seqüência de aminoácidos, de tal forma que a primeira e a segunda seqüências de aminoácidos possuam um domínio estrutural comum e/ou uma atividade
30 funcional comum. Por exemplo, seqüências de aminoácidos que

compreendem um domínio estrutural comum que seja pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos
5 cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou
10 pelo menos cerca de 100% idêntico são aqui definidas como suficientemente similares. De preferência, variantes serão suficientemente similares à seqüência de aminoácidos dos polipeptídeos preferidos desta invenção. Variantes incluem
variantes de polipeptídeos codificados por um
15 polinucleotídeo que hibridiza para um polinucleotídeo desta invenção, ou um complemento deste, sob condições de alto rigor. Tais variantes geralmente retêm a atividade funcional dos polipeptídeos desta invenção. Variantes incluem polipeptídeos que diferem em termos de seqüência de
20 aminoácidos em consequência de mutagênese.

Os termos "atividade funcional substancialmente similar" e "substancialmente a mesma função ou atividade biológica" significam que o grau de atividade biológica está dentro de cerca de 50% a 100% ou mais, dentro de 80% a
25 100% ou mais, ou dentro de cerca de 90% a 100% ou mais, daquela atividade biológica demonstrada pelo polipeptídeo ao qual está sendo comparado quando a atividade biológica de cada polipeptídeo for determinada pelo mesmo procedimento ou ensaio.

30 A "similaridade" entre dois polipeptídeos é

determinada por comparação da seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo com a seqüência de um segundo polipeptídeo. Um aminoácido de um polipeptídeo é similar ao aminoácido correspondente de um segundo polipeptídeo caso seja
 5 idêntico ou uma substituição de aminoácido conservadora. Substituições conservadoras incluem aquelas descritas em Dayhoff, M.O., ed., "The Atlas of Protein Sequence and Structure 5", "National Biomedical Research Foundation", Washington, D.C. (1978), e em Argos, P. (1989) *EMBO J.* 8:
 10 779-785. Por exemplo, aminoácidos que pertencem a um dos seguintes grupos representam alterações ou substituições conservadoras:

- Ala, Pro, Gly, Gln, Asn, Ser, Thr;
- Cys, Ser, Tyr, Thr;
- 15 -Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe;
- Lys, Arg, His;
- Phe, Tyr, Trp, His; e
- Asp, Glu.

O termo "paciente", como aqui usado, significa
 20 qualquer mamífero, incluindo seres humanos e animais domesticados como, por exemplo, gatos, cachorros, suínos, gado, carneiros, cabras, cavalos, coelhos, e semelhantes. Um paciente típico pode estar em risco de uma doença associada a uma proteína incorretamente enovelada, pode ser
 25 suspeito de sofrer dessa doença, ou pode necessitar da determinação do risco ou estado em relação a uma doença associada a uma proteína incorretamente enovelada.

B. Estados estruturais-alvos

O mecanismo exato pelo qual a seqüência de uma
 30 proteína dirige a formação de uma conformação

tridimensional específica é desconhecido. Para se obter o estado conformacional nativo, a molécula de proteína deve adotar uma conformação única entre muitas alternativas. Proteínas funcionais são tipicamente solúveis e podem adotar diversas estruturas, incluindo elementos helicoidais e ordenados. Elementos ordenados incluem a hélice α predominante em proteínas como, por exemplo, mioglobina e hemoglobina.

Durante o processo de envelhecimento humano, algumas proteínas exibem uma alteração estrutural em relação à sua estrutura solúvel (que compreende, por exemplo, conformações predominantemente em hélice α ou helicoidal aleatória) para estruturas mais insolúveis (que compreendem, por exemplo, conformações de folha β) que forma auto-agregados associados à perda de função. Além disso, algumas doenças estão associadas a formas insolúveis de proteínas que não são prejudiciais em suas formas solúveis.

Dessa forma, um aspecto da presente invenção fornece métodos e sondas para a detecção de proteínas em um estado estrutural específico (um "estado estrutural-alvo") como, por exemplo, uma conformação ou estado específico de auto-agregação. Um estado estrutural-alvo inclui qualquer estrutura tridimensional de uma proteína, incluindo uma conformação de proteína e/ou um estado de auto-agregação da proteína. Freqüentemente, o estado estrutural-alvo está associado a uma doença, enquanto um estado estrutural diferente não está associado a uma doença. O estado estrutural-alvo pode causar a doença, pode ser um fator em um sintoma da doença, pode aparecer em uma amostra ou *in*

vivo em consequência de outros fatores, ou pode de algum outro modo estar associado à doença. Em uma modalidade, a proteína possui a mesma sequência de aminoácidos, independentemente de seu estado estrutural, e pode adotar
5 pelo menos dois estados estruturais diferentes como, por exemplo, um estado associado à doença e um estado não associado à doença.

Diversas doenças estão associadas a proteínas em uma conformação de folha β . Para muitas dessas doenças, as
10 mesmas proteínas em uma conformação em hélice α e/ou helicoidal aleatória não estão associadas à doença. Dessa forma, para essas condições, uma conformação de folha β poderia ser um estado estrutural-alvo para detecção da doença, enquanto uma conformação em hélice α e/ou
15 helicoidal aleatória poderia ser um estado estrutural-alvo para confirmar a ausência da doença, ou para identificar ausência de um estado avançado da doença. Por exemplo, a FIG. 1 ilustra tanto as formas de monômero α -helicoidal quanto de dímero de folha β de um conformador de TSE. A
20 forma normal do tipo selvagem (wt) da proteína de príon (PrP^{C}) prefere um estado monomérico, enquanto a forma anormal, que causa doença (PrP), assume mais facilmente um estado multimérico.

A seguir, será apresentada uma lista não limitante de
25 doenças associadas a estados estruturais específicos de proteína, seguida (entre parênteses) pela proteína envolvida: doença de Alzheimer (APP, peptídeo $\text{A}\beta$, α 1-antiquimotripsina, tau, componente não- $\text{A}\beta$, presenilina 1, presenilina 2, apoE); doenças de príon, CJD, scrapie e BSE
30 (PrP^{Sc}); ALS (SOD e neurofilamento); doença de Pick (corpo

de Pick); doença de Parkinson (α -sinucleína em corpos de Lewy); demência frontotemporal (tau em fibrilas); diabetes do tipo II (amilina); mieloma múltiplo-discrasias de células plasmáticas (cadeia IgGL); polineuropatia amiloidótica familiar (transtiretina); carcinoma medular da tireóide (procalcitonina); insuficiência renal crônica (microglobulina- β_2); insuficiência cardíaca congestiva (fator natriurético atrial); amiloidose cardíaca e sistêmica senil (transtiretina); inflamação crônica (amilóide sérico A); aterosclerose (ApoA1); amiloidose familiar (gelsolina); e doença de Huntington (Huntingtina).

Como discutido acima, diversas doenças estão associadas a proteínas auto-agregadas, tais como agregados insolúveis protéicos ou fibrilas de proteína. Para essas condições, a proteína auto-agregada e/ou fibrilas de proteína poderiam ser um estado estrutural-alvo para detecção da doença, enquanto a proteína solúvel e/ou não agregada poderia ser um estado estrutural-alvo para confirmar ausência da doença, ou ausência de um estágio avançado da doença. Muitas das proteínas identificadas no parágrafo precedente formam auto-agregados e/ou fibrilas de proteína que estão associadas a estados de doença. Outras proteínas desse tipo incluem proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína amilóide beta ou peptídeo A β (por exemplo, A β 42 e A β 40), amilóide sérico A, insulina (por exemplo, que forma amilóide relacionado à insulina), amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina (por exemplo, variante da anemia falciforme), imunoglobulinas ou fragmentos destas (por exemplo, cadeia IgG L), microglobulina- β_2 , α -sinucleína, rodopsina, α 1-

antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas (por exemplo, presenilina 1 e presenilina 2), receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas (por exemplo, apoA e apo E), superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington (ou seja, Huntingtina), cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C. Proteínas insolúveis geralmente exibem a formação de folha β no agregado.

Para AD, a proteína A β 40 ou A β 42 poderia ser uma proteína-alvo, e qualquer um desses estados poderia ser um estado estrutural-alvo como, por exemplo, um estado de auto-agregação, tais como monômeros solúveis, oligômeros solúveis, agregados/ADDLs, agregados amorfos insolúveis, protofibrilas e fibrilas. O pensamento atual sobre a significância desses diferentes estados estruturais em relação ao risco da doença, diagnóstico da doença e progressão e etiologia da doença é revisado na seção de fundamentos acima.

Para proteínas de príon, a forma PrP^{Sc} da proteína PrP poderia ser um estado estrutural-alvo para detecção da doença, enquanto a forma PrP^C da proteína PrP poderia ser um estado estrutural-alvo para confirmar ausência da doença, ou ausência de um estágio avançado da doença. Adicionalmente, auto-agregados da forma PrP^{Sc} poderiam ser um estado estrutural-alvo para detecção da doença. Por exemplo, a forma mais infecciosa de PrP^{Sc} pode ser um pequeno agregado solúvel, em vez das fibrilas maduras

formadas no cérebro em estágios tardios da doença. Veja, por exemplo, Silveira e cols., *Nature* 437: 257-61 (1005) (que identifica partículas de PrP^{Sc} com um peso molecular aproximado de 300-600 kDa e um formato ligeiramente esférico a elíptico, com um diâmetro de 17-27 nm como tendo a maior infectividade e atividade de conversão). Dessa forma, essa forma de agregado solúvel de PrP^{Sc} poderia ser um estado estrutural-alvo.

C. Sondas peptídicas

Um aspecto da invenção está relacionado às sondas peptídicas úteis para a detecção de um estado estrutural específico de uma proteína-alvo em uma amostra ou *in vivo*, ou seja, úteis para a detecção de proteína em um estado estrutural-alvo. Tipicamente, a sonda peptídica inclui uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e a própria sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta. Por exemplo, a sonda peptídica pode passar por uma mudança conformacional quando colocada em contato com uma proteína-alvo que está na conformação de folha beta. Como discutido com mais detalhe abaixo, em algumas modalidades, as sondas peptídicas também são úteis para a identificação de agentes terapêuticos e como os próprios agentes terapêuticos.

1. Homologia

Em uma modalidade, a sonda compreende uma sequência de aminoácidos que é homóloga ou idêntica a uma proteína-alvo, ou a uma região da proteína-alvo. Os termos "homologia",

"homólogos de", "homólogo", "identidade" ou "similaridade" referem-se à similaridade de seqüência entre dois polipeptídeos, com a identidade sendo uma comparação mais estrita. Homologia e identidade podem ser determinadas por
5 comparação de uma posição em cada seqüência que pode ser alinhada para fins de comparação. Quando uma posição na seqüência comparada for ocupada pelo mesmo aminoácido, as moléculas serão idênticas naquela posição. Um grau de identidade de seqüências de aminoácidos é uma função do
10 número de aminoácidos idênticos nas posições compartilhadas pelas seqüências de aminoácidos. Um grau de homologia ou similaridade de seqüências de aminoácidos é uma função do número de aminoácidos, ou seja, estruturalmente relacionados, em posições compartilhadas pelas seqüências
15 de aminoácidos. Uma seqüência "não relacionada" ou "não homóloga" compartilha 10% ou menos de identidade, com uma das seqüências aqui descritas. Seqüências relacionadas compartilham mais de 10% de identidade de seqüência como, por exemplo, pelo menos cerca de 15% de identidade de
20 seqüência, pelo menos cerca de 20% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 30% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 40% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 50% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 60% de identidade de
25 seqüência, pelo menos cerca de 70% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 80% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência, pelo menos cerca de 95% de identidade de seqüência ou pelo menos cerca de 99% de identidade de
30 seqüência.

O termo "identidade percentual" refere-se à identidade de seqüência entre duas seqüências de aminoácidos. A identidade pode ser determinada por comparação de uma posição em cada seqüência que esteja alinhada para fins de
5 comparação. Quando uma posição equivalente em uma seqüência comparada for ocupada pelo mesmo aminoácido na outra na mesma posição, as moléculas serão idênticas naquela posição; quando o local equivalente ocupado pelo mesmo resíduo de aminoácido ou por um resíduo de aminoácido
10 similar (por exemplo, similar em termos de natureza estérica e/ou eletrônica), as moléculas poderão ser denominadas homólogas (similares) naquela posição. A expressão como percentagem de homologia, similaridade ou identidade refere-se a uma função do número de aminoácidos
15 idênticos ou similares em posições compartilhadas pelas seqüências comparadas. Podem ser usados vários algoritmos e/ou programas de alinhamento, incluindo FASTA, BLAST ou ENTREZ. FASTA e BLAST estão disponíveis como parte do pacote de análise de seqüências GCG ("University of
20 Wisconsin", Madison, Wis.), e podem ser usados, por exemplo, com os ajustes-padrão. ENTREZ está disponível por meio do "National Center for Biotechnology Information", "National Library of Medicine", NIH, Bethesda, Md.. Em uma modalidade, a identidade percentual de duas seqüências pode
25 ser determinada pelo programa GCG com uma ponderação de lacuna (*gap*) de 1, por exemplo, cada lacuna de aminoácido é ponderada como se fosse uma não combinação de um aminoácido único entre as duas seqüências. Outras metodologias para a determinação da identidade de seqüência são bem conhecidas
30 e descritas na técnica.

O termo "homólogo de uma proteína insolúvel" inclui todas as seqüências de aminoácidos que são codificadas por um homólogo de um gene da proteína insolúvel, e todas as seqüências de aminoácidos que são equivalentes ou homólogas a essa seqüência. Portanto, "homólogo de uma proteína insolúvel" inclui proteínas que são pontuadas como *hits* na família Pfam. Para identificar a presença de um domínio de "proteína insolúvel" em uma seqüência de proteína e fazer a determinação de que um polipeptídeo ou proteína de interesse possui um perfil em particular, a seqüência de aminoácidos da proteína pode ser pesquisada contra uma de várias bases de dados (SwissProt, PIR, por exemplo) com a utilização de vários parâmetros padronizados. Por exemplo, o programa hmmsf, que está disponível como parte do pacote de programas de pesquisa HM_MER, é um programa padronizado com especificidade de família para MILPAT0063 e uma pontuação de 15 é a pontuação limiar-padrão para determinação de um *hit*. Alternativamente, a pontuação limiar para determinação de um *hit* pode ser reduzida (por exemplo, para 8 bits). Uma descrição da base de dados Pfam pode ser encontrada em Sonham e cols., *Proteins* 28(3): 405-420, 1997, e uma descrição detalhada de HMMs pode ser encontrada, por exemplo, em Gribskov e cols., *Meth. Enzymol.* 183: 146-159, 1990; Gribskov e cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4.355-4.358, 1987; Krogh e cols., *J. Mol. Biol.* 234: 1.501-1.531, 1994; e Stultz e cols., *Protein Sci.* 2: 305-314, 1993, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

2. Design da sonda

As sondas aqui reveladas podem ser usadas para

detectar proteína presente em um estado estrutural específico em uma amostra ou *in vivo*, por exemplo, um estado estrutural-alvo. Em uma modalidade, as sondas compreendem seqüências de aminoácidos que são baseadas em (por exemplo, homólogas ou idênticas a) pelo menos uma região da seqüência de aminoácidos da proteína-alvo. Tais sondas também são denominadas "correspondentes" a uma região da seqüência de aminoácidos da proteína-alvo. Dessa forma, a seqüência de aminoácidos da sonda pode ser projetada a partir da proteína-alvo com base em informações existentes em bases de dados de seqüências ou, alternativamente, pode ser facilmente determinada experimentalmente. Embora a sonda possa compreender uma seqüência com base em qualquer região da proteína-alvo, em uma modalidade, a seqüência é baseada em uma região da proteína-alvo que está envolvida no estado estrutural-alvo. Por exemplo, em uma modalidade, as sondas compreendem seqüências de aminoácidos que são similares a (por exemplo, homólogas a), ou idênticas a, uma região da seqüência de aminoácidos da proteína-alvo que passa por uma mudança estrutural, por exemplo, uma mudança de uma conformação em hélice α /helicoidal aleatória para uma conformação de folha β .

Uma sonda pode compreender um número mínimo de aminoácidos contíguos da proteína-alvo como, por exemplo, pelo menos cerca de 5, pelo menos cerca de 6, pelo menos cerca de 7, pelo menos cerca de 8, pelo menos cerca de 9, pelo menos cerca de 10, pelo menos cerca de 11, pelo menos cerca de 12, pelo menos cerca de 13, pelo menos cerca de 14, pelo menos cerca de 15, pelo menos cerca de 16, pelo

menos cerca de 17, pelo menos cerca de 18, pelo menos cerca de 19, pelo menos cerca de 20, pelo menos cerca de 21, pelo menos cerca de 22, pelo menos cerca de 23, pelo menos cerca de 24 ou pelo menos cerca de 25 aminoácidos contíguos da
5 seqüência da proteína-alvo, ou qualquer intervalo entre esses números como, por exemplo, de cerca de 10 a cerca de 25 aminoácidos contíguos da seqüência da proteína-alvo.

As próprias sondas podem ter pelo menos cerca de 5 unidades de aminoácidos de comprimento e podem ter até
10 cerca de 300 a cerca de 400 unidades de aminoácidos de comprimento (-mer) ou mais, ou qualquer tamanho entre a faixa de cerca de 5 até cerca de 400 aminoácidos como, por exemplo, de cerca de 10 aminoácidos a cerca de 50 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, as
15 sondas possuem cerca de 15 aminoácidos de comprimento a cerca de 100 aminoácidos de comprimento. Em outras modalidades, as sondas variam de cerca de 20 aminoácidos de comprimento a cerca de 40 aminoácidos de comprimento. Em modalidades adicionais, as sondas variam de cerca de 17
20 aminoácidos de comprimento a cerca de 34 aminoácidos de comprimento. O comprimento de certa sonda pode influenciar a habilidade da sonda para formar complexos e produzir a formação de folha β com a proteína-alvo, e pode ser selecionado por aqueles habilitados na técnica com base nos
25 ensinamentos aqui apresentados.

A invenção também inclui sondas que compreendem seqüências de aminoácidos com base em cerca de 5 ou mais resíduos contíguos da seqüência de aminoácidos da proteína-alvo, com um ou mais resíduos adicionados, eliminados ou
30 substituídos por métodos conhecidos na técnica.

Em uma modalidade, as sondas passam por uma alteração estrutural similar àquela da proteína-alvo e, por exemplo, podem existir em uma conformação em hélice α /helicoidal aleatória ou em uma conformação de folha β . Em uma

5 modalidade específica, as sondas existem em uma conformação em hélice α /helicoidal aleatória em solução, e passam por uma mudança conformacional para uma conformação de folha β , quando colocadas em contato com a proteína-alvo em conformação de folha β . Por exemplo, em uma modalidade, a

10 sonda compreende um peptídeo ou peptidomimético de pelo menos cinco, ou dez, ou mais, resíduos de aminoácidos que exibem uma conformação helicoidal aleatória ou α -helicoidal em solução. Um solvente de sonda de peptídeo ou peptidomimético pode ser aquoso e ter um pH entre cerca de

15 4 e cerca de 10 como, por exemplo, entre cerca de 5 e cerca de 8, e pode ter uma força iônica entre cerca de 0,05 e cerca de 0,5 (quando tipicamente preparado com um sal de cloreto, por exemplo, cloreto de sódio ou cloreto de potássio). O solvente também pode compreender uma

20 percentagem de um material orgânico miscível em água como, por exemplo, trifluoretanol, em quantidades entre cerca de 30% e cerca de 70% por volume como, por exemplo, entre cerca de 45% e cerca de 60%. O solvente pode ser preparado com um sistema tampão adequado como, por exemplo, acetato/

25 ácido acético, Tris ou fosfato.

As sondas podem ser projetadas sob as seguintes restrições: uma diferença de apenas poucos kcal separa uma população de uma sonda em um estado de conformação inicial (por exemplo, alfa-hélice) de uma população da sonda

30 predominantemente no estado conformacional transformado

(por exemplo, folha beta). A transformação de um estado conformacional para o outro é fornecida pela força impulsora em função da Kd de associação entre a molécula da sonda e seu associado natural para formar complexo de folha β , ou de alterações nas interações eletrostáticas entre as moléculas (por exemplo, alterações causadas por redução da força iônica da solução). Caso íons de metal, por exemplo, Al ou a ligação de outro ligante estejam envolvidos, outros efeitos eletrostáticos ou esteéricos poderão contribuir. O tamanho do peptídeo da sonda pode variar, mas deve ter comprimento suficiente para ter uma estrutura secundária "razoavelmente" bem definida sob condições de detecção e para ter especificidade de reconhecimento suficiente para o alvo selecionado como, por exemplo, uma proteína de príon. O peptídeo da sonda também deve acomodar mutações de sítio único a serem geralmente aplicáveis às proteínas ou cepas mutadas, reconhecendo que essas alterações e/ou heterogeneidades afetam a estabilidade termodinâmica da molécula. Além disso, a sonda deve ser não contagiosa para a população de pacientes, seja essa população uma população de pacientes humanos, uma população de animais domesticados ou uma população de outros mamíferos.

Em uma modalidade, uma sonda possui uma estrutura palindrômica com duas seqüências de aminoácidos correspondentes à seqüência amino da proteína-alvo. O termo "palindrômica" refere-se à organização de certa seqüência da sonda, de tal forma que ela compreenda primeira e segunda seqüências peptídicas que correspondem a uma porção da proteína-alvo envolvida na mudança estrutural, cujas seqüências peptídicas são apresentadas de uma forma

palindrômica, ou seja, da extremidade carbóxi para a extremidade amino (ou da extremidade amino para a extremidade carbóxi) na primeira seqüência peptídica, e da extremidade amino para a extremidade carbóxi (ou da extremidade carbóxi para a extremidade amino) na segunda seqüência peptídica. A primeira e a segunda seqüências peptídicas na sonda palindrômica não precisam ter um comprimento idêntico. Em algumas modalidades, a primeira e a segunda seqüências peptídicas possuem comprimentos pelo menos aproximadamente equivalentes. Em algumas modalidades, A primeira e a segunda seqüências peptídicas compreendem a mesma seqüência de aminoácidos. Em algumas modalidades, as duas seqüências peptídicas (os "braços" da sonda palindrômica) possuem um comprimento de, no máximo, 15, no máximo 10, ou no máximo 5 aminoácidos. Em outras modalidades, cada braço compreende de cerca de 10 a cerca de 25 aminoácidos como, por exemplo, de cerca de 14 a cerca de 20 aminoácidos. Em algumas modalidades, a primeira e a segunda seqüências peptídicas dentro de uma sonda palindrômica são separadas por um vinculador como, por exemplo, um vinculador peptídico que compreende entre cerca de 1 e cerca de 5 aminoácidos, ou entre cerca de 1 e cerca de 3 aminoácidos, e que pode compreender pelo menos um aminoácido prolina, ou pode compreender basicamente aminoácidos prolina. Sondas peptídicas adequadas são descritas na U.S. 2006-057671, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. A FIG. 3 apresenta uma sonda palindrômica exemplar de 33-mer. Sondas palindrômicas podem ser particularmente úteis para a detecção de proteínas de prion.

Em algumas modalidades, as sondas podem compreender uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos que se baseia na porção da seqüência de aminoácidos da proteína-alvo (por exemplo, a porção da seqüência de aminoácidos-alvo que
5 passa por uma mudança estrutural), que pode variar em termos de comprimento de cerca de 1 aminoácido a cerca de 20 ou mais aminoácidos como, por exemplo, de cerca de 2 a cerca de 10 aminoácidos de comprimento, e que aparece em uma extremidade ou próximo a uma das duas extremidades da
10 sonda. No caso de sondas palindrômicas, seqüências de aminoácidos hidrofóbicos podem aparecer nas extremidades de cada um dos dois braços peptídicos da sonda. Opcionalmente, a sonda também pode incluir uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos sintéticos (ou seja, não naturais para a
15 seqüência peptídica da proteína-alvo) em pelo menos uma extremidade da sonda e, no caso de sondas palindrômicas, em uma ou próximo a uma das extremidades da sonda, que pode variar em termos de comprimento de cerca de somente 1 aminoácido a cerca de 20 ou mais aminoácidos como, por
20 exemplo, de cerca de 2 a cerca de 10 aminoácidos de comprimento. As sondas podem incluir resíduos de aminoácidos do terminal N, resíduos de aminoácidos do terminal C, ou ambos, que sejam adequados para uso na ligação de um marcador à sonda (por exemplo, Lys, que
25 inclui um grupo amino livre).

Como forma de exemplo e sem limitação, caso uma seqüência peptídica desejada em uma proteína-alvo compreenda a seqüência, lendo da extremidade amino para a extremidade carbóxi, QRSTVVARLKAAAV (ID. DE SEQ. N°: 15)
30 (em que AAAV (ID. DE SEQ. N°: 30) é uma seqüência de

aminoácidos hidrofóbicos), o palíndromo poderá compreender uma primeira seqüência peptídica que é VAAAKLRVVTSRQ (ID. DE SEQ. N°: 31) e uma segunda seqüência peptídica que é QRSTVVARLKAAAV (ID. DE SEQ. N°: 15) (ou uma variação
 5 próxima àquela seqüência), com as duas seqüências separadas por um vinculador que compreende de cerca de 1 a cerca de 5 aminoácidos, com pelo menos um desses aminoácidos e, de preferência, a maioria, se não todos, esses aminoácidos, sendo aminoácidos prolina. Portanto, uma sonda adequada
 10 para essa proteína-alvo poderia ser:
 VAAAKLRVVTSRQPPPPQRSTVVARLICAAAV (ID. DE SEQ. N°: 28)
 (sonda palindrômica hipotética).

Uma sonda pode ser específica para qualquer proteína-alvo. Por exemplo, a proteína-alvo pode ser uma proteína de
 15 príon, por exemplo, PrP^C, PrP^{Sc}, ou uma mistura destes. Conseqüentemente, a proteína-alvo pode incluir uma proteína do ID. DE SEQ. N°: 13 ("Proteína de Príon Humana", Acesso PO4156) ou um fragmento deste. Em algumas modalidades, um "fragmento deste" pode incluir pelo menos cerca de 5
 20 aminoácidos contíguos até o comprimento total da seqüência polipeptídica, ou qualquer número de aminoácidos contíguos na faixa entre cerca de 5 até a proteína de comprimento total. Em algumas modalidades, a sonda compreende a proteína de comprimento total; em outras modalidades, a
 25 sonda não compreende a proteína de comprimento total. Em algumas modalidades, a sonda pode ser pelo menos cerca de 10 aminoácidos contíguos ou pelo menos cerca de 15 aminoácidos da seqüência de comprimento total, ou pode incluir uma seqüência com pelo menos cerca de 15%, pelo
 30 menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos

cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de seqüência para aqueles resíduos contíguos.

Uma proteína-alvo também pode ser uma proteína amilóide beta, por exemplo, A β 42 (ID. DE SEQ. N°: 32) ou A β 40 (ID. DE SEQ. N°: 4). Uma sonda peptídica da proteína de fusão pode incluir uma seqüência que possui pelo menos cerca de 15% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 32 ou ID. DE SEQ. N°: 4, ou fragmentos destes. Por exemplo, a sonda peptídica pode incluir pelo menos cerca de 5 aminoácidos contíguos até o comprimento total da proteína (ID. DE SEQ. N°: 32 ou ID. DE SEQ. N°: 4), ou qualquer número de aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 32 ou ID. DE SEQ. N°: 4 entre essas faixas de tamanho. Em outras modalidades da invenção, a sonda pode ser pelo menos cerca de 10 ou pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 32 ou ID. DE SEQ. N°: 4, ou pode incluir uma seqüência com pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo

menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos
5 cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para aqueles resíduos contíguos.

Em algumas modalidades, a sonda peptídica pode incluir
10 mutações em A β 42 (ID. DE SEQ. N°: 32) ou A β 40 (ID. DE SEQ. N°: 4), como revelado na técnica (Wurth e cols., *J. Molec. Biol.* 319: 1.279-1.290 (2002); Kim e cols., *J. Biol. Chem.* 41: 35.069-35.076 (2005), que são aqui incorporados por referência em suas totalidades). Em algumas modalidades, a
15 sonda peptídica é específica para um de A β 42 ou A β 40. Ou seja, a sonda se liga preferencialmente a um de A β 42 ou A β 40 e, dessa forma, é útil para distinguir amostras que compreendem A β 42 daquelas que compreendem A β 40, ou para avaliar qualitativamente as quantidades relativas de A β 42 e
20 A β 40 em uma amostra, ou para a quantificação da(s) quantidade(s) de A β 42 e/ou A β 40 em uma amostra. Tais sondas peptídicas podem ser usadas em métodos similares *in vivo*, para detectar e/ou distinguir A β 42 e A β 40 *in vivo*.

Uma proteína-alvo também pode ser a proteína
25 precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota. A sonda peptídica para uma proteína-alvo desse tipo pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 11, uma sequência que possui pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo
30 menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos

cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 11, ou fragmentos destes. Por exemplo, a sonda peptídica da proteína de fusão pode compreender pelo menos cerca de 5 resíduos de aminoácidos contíguos até o comprimento total do ID. DE SEQ. N°: 11, ou qualquer número de aminoácidos contíguos entre essas duas faixas. Em outras modalidades da invenção, a sonda peptídica da proteína de fusão pode compreender pelo menos cerca de 10 ou pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 11, ou pode compreender uma sequência com pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para aqueles resíduos contíguos.

Uma proteína-alvo também pode ser a proteína transtiretina. Uma sonda peptídica para uma proteína-alvo desse tipo pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 26, uma sequência que possui pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 26, ou fragmentos destes. Por exemplo, a sonda peptídica da proteína de fusão pode compreender pelo menos cerca de 5 resíduos de aminoácidos contíguos até o comprimento total do ID. DE SEQ. N°: 26, ou qualquer número de aminoácidos contíguos entre essas duas faixas. Em outras modalidades da invenção, a sonda peptídica pode compreender pelo menos cerca de 10 ou pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 26, ou pelo menos cerca de 5 ou pelo menos cerca de 10 aminoácidos de resíduos de aminoácidos 11-19 do ID. DE SEQ. N°: 26, ou pode incluir uma sequência com pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo

menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos
5 cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para aqueles resíduos contíguos.

Uma proteína-alvo também pode ser a proteína cistatina
10 C. Uma sonda peptídica para uma proteína-alvo desse tipo pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 17, uma sequência que possui pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de
15 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos
20 cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de sequência para o ID. DE SEQ. N°: 17, ou fragmentos destes. Por exemplo, a sonda peptídica da
25 proteína de fusão pode compreender pelo menos cerca de 5 resíduos de aminoácidos contíguos até o comprimento total do ID. DE SEQ. N°: 17, ou qualquer número de aminoácidos contíguos entre essas duas faixas. Em outras modalidades da invenção, a sonda peptídica compreende pelo menos cerca de
30 10 ou pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácidos

contíguos do ID. DE SEQ. N°: 17, ou a sonda peptídica pode compreender uma seqüência com pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos a cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de seqüência para aqueles resíduos contíguos.

Uma proteína-alvo pode ser a proteína da doença de Huntington ou "Huntingtina". Uma sonda peptídica para uma proteína-alvo desse tipo pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 19, uma seqüência que possui pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 19, ou fragmentos destes. Por exemplo, a sonda

peptídica da proteína de fusão pode compreender pelo menos cerca de 5 resíduos de aminoácidos contíguos até o comprimento total do ID. DE SEQ. N°: 19, ou qualquer número de aminoácidos contíguos entre essas duas faixas. Em outras

5 modalidades da invenção, a sonda peptídica compreende pelo menos cerca de 10 ou pelo menos cerca de 15 resíduos de aminoácidos contíguos do ID. DE SEQ. N°: 19, ou pode incluir uma seqüência com pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos

10 cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo

15 menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de seqüência para aqueles

20 resíduos contíguos.

Uma sonda peptídica pode ter uma seqüência de aminoácidos que seja equivalente à seqüência de aminoácidos de uma proteína-alvo, ou fragmento desta. "Equivalente" refere-se a uma proteína que possui uma seqüência de

25 aminoácidos que é similar à seqüência de aminoácidos da proteína a ser analisada. Em algumas modalidades, um "equivalente" possui pelo menos uma, mas menos de cerca de 5 (por exemplo, 3 ou menos) diferenças na seqüência de aminoácidos, por exemplo, por meio de substituições,

30 adições ou eliminações. Em outras modalidades, um

"equivalente" possui pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos
5 cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99% de identidade de seqüência para a seqüência da proteína-alvo ou fragmento desta. A substituição de um ou
10 mais aminoácidos em certa seqüência não altera substancialmente a função básica da sonda. Em algumas modalidades, um "equivalente" pode incluir uma ou mais "substituições conservadoras de aminoácidos" que são substituições nas quais o resíduo de aminoácido é
15 substituído por um resíduo de aminoácido que possui uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos que possuem cadeias laterais similares incluem aquelas com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não
20 carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias
25 laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

3. Síntese

As sondas peptídicas podem ser sintetizadas
30 quimicamente ou pela utilização de metodologia de DNA

recombinante.

Por exemplo, uma sonda peptídica pode ser sintetizada quimicamente pela realização de várias técnicas de fase sólida (Roberge e cols., *Science* 269: 202-204 (1995)) e a
5 síntese automatizada pode ser obtida, por exemplo, com o uso de sintetizadores de peptídeos conhecidos na técnica (por exemplo, ABI 431A Peptide Synthesizer, Perkin Elmer, Palo Alto, Calif.). Um peptídeo recém sintetizado pode ser substancialmente purificado por cromatografia líquida
10 preparativa de alta performance (por exemplo, Creighton, "Proteins, Structures and Molecular Principles" (1983)) ou por outras técnicas comparáveis disponíveis na técnica. A composição dos peptídeos sintéticos pode ser confirmada por análise ou seqüenciamento de aminoácidos (por exemplo, o
15 procedimento de degradação de Edman). Um marcador ou repórter pode ser acoplado quimicamente à sonda peptídica sintetizada, como discutido como mais detalhe abaixo.

Para expressar um polipeptídeo desejado em uma célula hospedeira, as seqüências de nucleotídeos que codificam o
20 polipeptídeo, ou equivalentes funcionais, podem ser inseridas no vetor de expressão apropriado, ou seja, um vetor que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da seqüência codificadora inserida. Métodos que são bem conhecidos por aqueles habilitados na
25 técnica podem ser usados para a construção de vetores de expressão que contém seqüências que codificam um polipeptídeo de interesse e elementos apropriados de controle da transcrição e tradução. Esses métodos incluem técnicas *in vitro* de DNA recombinante, técnicas sintéticas
30 de recombinação genética *in vivo*. Tais técnicas são

descritas em Sambrook e cols., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (1989), e Ausubel e cols., "Current Protocols in Molecular Biology" (1989).

Diversos sistemas de vetor de expressão/hospedeiro
5 podem ser utilizados para conter e expressar seqüências de
polinucleotídeos. Esses incluem, sem limitação,
microorganismos como, por exemplo, bactérias transformadas
com bacteriófago recombinante, vetores de expressão de DNA
de plasmídeo ou cosmídeo; leveduras transformadas com
10 vetores de expressão de levedura; sistemas de células de
inseto infectadas com vetores de expressão de vírus (por
exemplo, baculovírus); sistemas de células de plantas
transformadas com vetores de expressão de vírus (por
exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do
15 mosaico do tabaco, TMV) ou com vetores de expressão
bacteriana (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou
sistemas de células animais.

Para expressar uma sonda peptídica em uma célula
hospedeira, um procedimento como, por exemplo, o seguinte,
20 pode ser usado. Um fragmento de restrição que contém uma
seqüência de DNA que codifica a sonda peptídica pode ser
clonado em um plasmídeo recombinante apropriado contendo
uma origem de replicação que funciona na célula hospedeira,
e um marcador selecionável adequado. O plasmídeo pode
25 incluir um promotor para expressão indutível da sonda
peptídica (por exemplo, pTrc (Amann e cols., (1988) Gene
69: 301-315) e pET11d (Studier e cols., "Gene Expression
Technology: Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San
Diego, Calif. (1990) 60 89)). O plasmídeo recombinante pode
30 ser introduzido na célula hospedeira, por exemplo, por

eletroporação, e células que contêm o plasmídeo recombinante podem ser identificadas por seleção quanto ao marcador no plasmídeo. A expressão da sonda peptídica pode ser induzida e detectada na célula hospedeira com a
5 utilização de um ensaio específico para a sonda peptídica.

Uma célula hospedeira adequada para expressão de uma sonda peptídica pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica (por exemplo, células bacterianas como, por exemplo, *E. coli* ou *B. subtilis*, células de inseto
10 (baculovírus), de leveduras ou células de mamíferos como, por exemplo, células de ovário de hamster chinês (CHO)). Em algumas modalidades, o DNA que codifica o peptídeo pode ser otimizado para a expressão na célula hospedeira. Por exemplo, o DNA pode incluir códons para um ou mais
15 aminoácidos que são predominantes na célula hospedeira em relação a outros códons para o mesmo aminoácido.

4. Sondas exemplares

Sondas de alfa-hélice ou helicoidais aleatórias (ou seja, sondas que exibem conformação em hélice α ou
20 helicoidal aleatória em solução) úteis nos métodos revelados podem incluir as seguintes:

a. Sondas de PrP

Um 33-mer palindrômico que compreende seqüências de aminoácidos que são idênticos aos aminoácidos 122-104 e
25 109-122 da proteína PrP^{Sc} (ID. DE SEQ. N°: 13 e 14) (SwissProt PO4156; Príon ID. Pfam Pf00377 e 03991):
VVAGAAAAGAVHKLNTKPKLKHVAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ. N°: 29) (murídea);
VVAGAAAAGAMHKNINTKPKMKHMAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ. N°: 1)
30 (humana). Em algumas modalidades, uma lisina do terminal C

pode ser adicionada ao 33-mer palindrômico para formar um 34-mer

(por exemplo: VVAGAAAAGAMHKIVINTKPKIVIKHMAGAAAAGAVVK (ID. DE SEQ. N°: 33) e VVAGAAAAGAVHKLNTKPKLKHVAGAAAAGAVVK (ID. DE SEQ. N°: 34)). A lisina do terminal C pode ser adequada para uso na ligação da sonda a um marcador adequado (por exemplo, pireno).

Um 33-mer palindrômico que compreende seqüências de aminoácidos que são equivalentes aos aminoácidos 122-104 e 109-122 da proteína PrP^{Sc} (ID. DE SEQ. N°: 13 e 14) (SwissProt PO4156; Príon ID. Pfam Pf00377 e 03991).

Um 33-mer palindrômico que compreende seqüências de aminoácidos que são entre cerca de 70% a cerca de 90% idênticos aos aminoácidos 122-104 e 109-122 da proteína PrP^{Sc} (ID. DE SEQ. N°: 13 e 14) (SwissProt PO4156; Príon ID. Pfam Pf00377 e 03991).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que incluem pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos dos aminoácidos 104-122 da proteína PrP^{Sc} humana ou aminoácidos 103-121 da proteína PrP^{Sc} murídea (ID. DE SEQ. N°: 13 e 14) (SwissProt PO4156; Príon ID. Pfam PF00377 e 03991) Proteína de Príon Humana (Acesso PO4156).

Uma sonda que compreende a seqüência de aminoácidos KPKTNMKHMAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ. N°: 39).

Um 33-mer palindrômico que compreende a seqüência de aminoácidos VVAGAAAAGAMHKMNTKPKMKHMAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ. N°: 40) (seqüência vinculadora para os dois braços do palíndromo sublinhada).

Um 33-mer palindrômico que compreende a seqüência de aminoácidos VVAGAAAAGAMHKMKPKTNMKHMAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ.

N°: 41) (seqüência vinculadora para os dois braços do palíndromo sublinhada).

Um 33-mer palindrômico que compreende a seqüência de aminoácidos VVAGAAAAGAVHKMKPKTNMKHVAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ.

5 N°: 42) (seqüência vinculadora para os dois braços do palíndromo sublinhada).

b. Sondas de A β

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são idênticos aos aminoácidos 1-40 do peptídeo A β

10 (Nref00111747; humano): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (ID. DE SEQ. N°: 4).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são equivalentes aos aminoácidos 1-40 do peptídeo A β

15 (Nref00111747; humano) (ID. DE SEQ. N°: 4).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são entre cerca de 70% a cerca de 90% idênticos aos aminoácidos 1-40 do peptídeo A β (Nref00111747; humano) (ID. DE SEQ. N°: 4).

20 Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são idênticos aos aminoácidos 11-34 do peptídeo A β (NreM0111747; humano): EVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL (ID. DE SEQ. N°: 5).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são idênticos aos aminoácidos 11-34 do peptídeo A β (Nref00111747; humano), mas com resíduo H13 substituído com R para reduzir interações de íon metálico e para aumentar a solubilidade do peptídeo: EVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGL (ID. DE SEQ. N°: 6).

30 Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que

são idênticos aos aminoácidos 25-35 do peptídeo A β (Nref0011747; humano): GSNKGAIIGLM (ID. DE SEQ. N°: 7).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são idênticos aos aminoácidos 17-35 do peptídeo A β (Nref0011747; humano): LVFFAEDVGSNKGAIIGLM (ID. DE SEQ. N°: 35). Opcionalmente, a sonda pode incluir uma lisina (K) do terminal N adicional KLVFFAEDVGSNKGAIIGLM (ID. DE SEQ. N°: 36), uma lisina (K) do terminal C LVFFAEDVGSNKGAIIGLMK (ID. DE SEQ. N°: 37), ou ambas KLVFFAEDVGSNKGAIIGLMK (ID. DE SEQ. N°: 38).

c. Sondas de TSE

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são homólogos aos aminoácidos 104-122 ou TSE do tipo selvagem (wt) (Nref00130350 humano):
 15 KPCKTNLKHVAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ. N°: 10).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são equivalentes aos aminoácidos 104-122 de TSE do tipo selvagem (wt) (Nref00130350 humano) (ID. DE SEQ. N°: 10).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são entre cerca de 70% a cerca de 90% idênticas às seqüências de aminoácidos 104-122 de TSE do tipo selvagem (wt) (Nref00130350 humano) (ID. DE SEQ. N°: 10).

Uma sonda que compreende uma seqüência de aminoácidos que: (a) é uma seqüência de TSE mutada seletivamente; (b) é desestabilizada e não infecciosa; e (c) possui uma seqüência de aminoácidos que é homóloga às seqüências de aminoácidos 104-122 ou TSE do tipo selvagem (wt) (Nref00130350 humano) (ID. DE SEQ. N°: 10).

Uma sonda que compreende uma seqüência de aminoácidos que: (a) é uma seqüência de TSE mutada seletivamente; (b) é

Uma sonda que possui uma conformação encontrada em poliglutamina e uma sequência de aminoácidos que seja equivalente ou homóloga a QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ (23-mer) (ID. DE SEQ. N°: 9).

5 Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que são idênticos aos aminoácidos 1-25 da proteína surfactante pulmonar humana (N° de Acesso NCBI AAH32785; humana) implicada na Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS) humana:

10 MAESHLLQWLLLLLPTLCGPGTAAW (ID. DE SEQ. N°: 12)

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que incluem pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos dos aminoácidos 235-269 (ênfatizados abaixo por sublinhado duplo) da gelsolina plasmática humana (P06396; Muary e cols., *FEBS Lett.* 260(1): 85-87, 1990):

MAPHRPAPALLCALSLALCALSLPVRAATASRGASQAGAPQGRVPEARPN
SMVVEHPEFLKAGKEPGLQIWRVEKFDLVPVPTNLYGDFFTGDAYVILKTVQLR
NGNLQYDLHYWLGNECSQDESGAAAIFTVQLDDYLNGRAVQHHREVQGFESA
TFLGYFKSGLKYKKGGVASGFKHVVPNEVVVQRLFQVKGRRVVRATEVPVS
20 WESFNNGDCFILDGNNIHQWCGSNSNRYERLKATOVSKGIRDNERSGRARV
HVSEEGTEPEAMLQVLGPKPALPAGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGT
MSVSLVADENPFAQGALKSEDCFILDHGKDGKIFVWKGKQANTEERKAALK
TASDFITKMDYPKQTQVSVLPEGGETPLFKQFFKNWRDPDQTDGLGLSYLSS
HIANVERVPFDAATLHTSTAMAAQHGMDDDGTTGQKQIWRIEGSNKVPVDPA
TYGQFYGGDSYIILYNRYRHGGRQGGQIYNWQGAQSTQDEVAASAILTAQLDE
25 ELGGTPVQSRVVQGKEPAHLMSLFGGKPMIYKGGTSREGGQTAPASTRLFQ
VRANSAGATRAVEVLPAKAGALNSNDAFVLKTPSAAYLWVGTGASEAEKTGA
QELLRVLRAQPVQVAEGSEPDGFWEALGGKAAAYRTSPRLKDKKMDAHPRL
FACSNKIGRFVIEEVPGELMQEDLATDDVMLLDTWQVFWVWGKDSQEEEEK
TEALTSAKRYIETDPANRDRRTPIVVKQGFEPSPFVGWFLGWDDDDYWSVDP
30 LDRAMAELAAYERLKATQVSKGIRDNERSGRARVHVSEEGTEPEAM

(ID. DE SEQ. N°: 16).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que incluem pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos da região de formação de amilóide (aminoácidos 26-147; enfatizados por sublinhado duplo abaixo) da seqüência da proteína cistatina C, como revelado abaixo e relatado por Levy e cols., *Exp. Med.* 169(5): 1.771-1.778, 1989 (P01034). Uma sonda apropriada é qualquer porção desta de pelo menos 10 aminoácidos. Várias sondas podem ser posicionadas de acordo.

MAGPLRAPLLLLAILAVALAVSPAAGSSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVR
RALDFAVGEYNKASNDMYHSRALOVVRAROIVAGVNYFLDVELGRITCTK
TOPNLDNCPFHDOPHLKRKAFCSEFIYAVPWOGTMTLSKSTCODA

(ID. DE SEQ. N°: 17).

Uma sonda palindrômica da proteína cistatina C tomada dos aminoácidos 39-47 da seqüência acima, com um vinculador de quatro unidades de prolina; por exemplo:

EEVVSADMPPPPMDASVEEE (ID. DE SEQ. N°: 18)

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que incluem entre 10 e 23, inclusive, resíduos contíguos de glutamina de óligo- ou poliglutamina dos resíduos 18-40 (enfatizados por sublinhado duplo abaixo) da seqüência de proteína da proteína Huntingtina (proteína da doença de Huntington) revelada abaixo:

MATLEKLMKAFESLKSFOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOOPPPPPPPPPP
 PQLPQPPPQAQPLLPQPQPPPPPPPPPGPAVAEEPLHRPKKELSATKKD
 RVNHCLTICENIVAQSVRNSPEFQKLLGIMELFLLCSDDAESDVRMVADE
 CLNKVIKALMDSNLPRLQLELYKEIKKNGAPRSLRAALWRFAELHLVRP
 QKCRPYLVNLLPCLTRTSKRPEESVQETLAAAVPKIMASFGNFANDNEIK
 VLLKAFIANLKSSSPTIRRTAAGSAVSICQHSRRTQYFYSWLLNVLLGLL
 VPVEDEHSTLLILG

(ID. DE SEQ. N°: 19) (P42858; gi:1170192).

Uma sonda exemplar: QQQQQQQQQQQQQQQQQ (ID. DE SEQ. N°: 20).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que
 5 incluem pelo menos 6 resíduos de aminoácidos contíguos dos
 resíduos de aminoácidos 45-50 e 48-53 (ênfatizados abaixo)
 do polipeptídeo amilóide da ilhota humano envolvido em
 fibrilogênese, seqüência revelada abaixo, NP.sub.--000406
 [gi:4557655] Scrocchi e cols., *J. Struct. Biol.* 141(3):
 10 218-227, 2003:

MGILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLV
HSSNNFGAILSSTNVGSNTYGKRNAVEVLKREPLNYLPL

(ID. DE SEQ. N°: 21).

Sondas exemplares podem conter as seguintes
 15 seqüências, que são seqüências dentro da seqüência 45-53 da
 seqüência peptídica acima do ID. DE SEQ. N°: 21, que pode
 ser usada sem modificação ou pode ser usada para formar
 sondas palindrômicas aqui descritas:

LANFV (ID. DE SEQ. N°: 22)

20 VFNALPPPPLAKFV (ID. DE SEQ. N°: 23) (sonda palindrômica)

FLVHSS (ID. DE SEQ. N°: 24)

SSHVLFP PPPPFLVHSS (ID. DE SEQ. N°: 25) (sonda palindrômica).

Uma sonda que compreende seqüências de aminoácidos que
 incluem pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos dos
 25 resíduos de aminoácidos 11-19 (ênfatizados abaixo por
 sublinhado duplo) do fragmento do peptídeo de transtiretina
 (AAH20791 [gi: 18089145]; MacPhee e Dobson, *J. Mol. Biol.*,
 279(5): 1.203-1.215, 2000):

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPMLVKVLDVVRGSPAINVAV
HVFRKAADDTWEPFASGKTSESSELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWK
 30 **ALGISPFHEHAIEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE**

(ID. DE SEQ. N°: 26)

Uma sonda palindrômica com base na seqüência de referência enfatizada acima do ID. DE SEQ. N°: 26 (resíduos de aminoácidos 11-19); por exemplo, ESVFVLGALPPPPLAGLVFVSE.

5 (ID. DE SEQ. N°: 27).

Sondas que possuem pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 99% para aquelas exemplificadas acima, e sondas que
10 possuem seqüências equivalentes, também estão incluídas na invenção. Também estão incluídas sondas que englobam a seqüência de aminoácidos das sondas citadas acima e possuem um resíduo de aminoácido adicional no terminal N, um resíduo de aminoácido no terminal C, ou ambos, que são
15 adequadas para uso na ligação de um marcador à sonda (por exemplo, Lys, que fornece um grupo amino livre para ligação de um marcador à sonda).

Várias outras sondas podem ser facilmente produzidas sem experimentação desnecessária com o uso de técnicas
20 laboratoriais padronizadas e uma síntese química de peptídeo relacionada. Outras sondas e métodos para o projeto dessas sondas que podem ser usados nos métodos presentemente apresentados ou modificados para uso nos métodos presentemente apresentados podem ser facilmente
25 obtidos, e são descritos na U.S. 2006-0057671; Wurth e cols., *J. Mol. Biol.* 319: 1.279-1.290 (2002); e Kime cols., *J. Biol. Chem.* 280: 35.059-35.076 (2005), que são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

5. Marcadores

30 As sondas aqui reveladas podem compreender um

marcador. Por exemplo, a sonda pode consistir em uma sonda peptídica que é acoplada ou fundida, de forma covalente ou não covalente, a um marcador. Em uma modalidade, a sonda peptídica é coberta na extremidade (em uma ou em ambas as
5 extremidades do peptídeo) com uma porção ou entidade química que pode facilitar a análise da sonda peptídica, incluindo a detecção da sonda *per se* e a detecção do estado estrutural da sonda.

O marcador específico escolhido pode variar
10 amplamente, dependendo da técnica analítica a ser usada para análise. O marcador pode estar em complexo ou ligado covalentemente na extremidade amino ou carbóxi, ou próximo a ela, do peptídeo, que pode ter sua extremidade coberta com uma seqüência de peptídeos hidrofóbicos curtos. Em
15 alguns aspectos da invenção, tanto a extremidade amino quanto a extremidade carbóxi dos peptídeos da sonda são cobertos com pequenos peptídeos hidrofóbicos que variam em termos de tamanho de cerca de 1 a cerca de 5 aminoácidos. Esses peptídeos podem ser naturais ou sintéticos, mas são
20 preferivelmente naturais (ou seja, derivados da proteína-alvo). Um marcador pode ser anexado na extremidade amino e/ou carbóxi da sonda, ou próximo a ela.

Como aqui usado, um "marcador" é uma porção química ou bioquímica útil para marcação da sonda, e que,
25 opcionalmente, pode ser utilizado para avaliar o estado estrutural específico da sonda. Por exemplo, um marcador pode emitir um primeiro sinal com base em um primeiro estado estrutural e um segundo sinal com base em um segundo estado estrutural. O primeiro sinal e o segundo sinal podem
30 diferir em intensidade. Em algumas modalidades, quando o

sinal incluir emissão de luz, o primeiro sinal e o segundo sinal podem diferir no comprimento de onda de excitação e/ou no comprimento de onda de emissão.

"Marcadores" podem incluir agentes fluorescentes (por exemplo, fluoróforos, proteínas fluorescentes, nanocristais semicondutores fluorescentes), agentes fosforescentes, agentes quimioluminescentes, agentes cromogênicos, agentes quelantes, corantes, radionuclídeos, íons metálicos, sólidos metálicos, ligantes (por exemplo, biotina, haptenos de estreptavidina, e semelhantes), enzimas (por exemplo, beta-galactosidase, peroxidase de raiz-forte, glicose oxidase, fosfatase alcalina, e semelhantes), substratos de enzimas, co-fatores de enzimas (por exemplo, NADPH), inibidores de enzimas, agentes de cintilação, inibidores, partículas magnéticas, oligonucleotídeos, e outras porções conhecidas na técnica. Quando o marcador for um fluoróforo, uma ou mais características do fluoróforo poderão ser usadas para avaliar o estado estrutural da sonda marcada. Por exemplo, o comprimento de onda de excitação do fluoróforo pode diferir com base no estado estrutural da sonda marcada. Em algumas modalidades, o comprimento de onda de emissão, intensidade ou polarização de fluorescência pode variar com base no estado estrutural da sonda marcada.

Como aqui usado, um "fluoróforo" é um grupo químico que pode ser excitado pela luz para emitir fluorescência ou fosforescência. Um "extintor" é um agente que é capaz de extinguir um sinal fluorescente de um doador fluorescente. Um primeiro fluoróforo pode emitir um sinal fluorescente que excita um segundo fluoróforo. Um primeiro fluoróforo

pode emitir um sinal que é extinto por um segundo fluoróforo. As sondas aqui reveladas podem passar por transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET).

5 Fluoróforos e extintores podem incluir os seguintes agentes (ou fluoróforos e extintores vendidos sob os seguintes nomes comerciais): 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; umbeliferona (por exemplo, 4-Metilumbeliferona); ésteres de *acradimum*, 5-carbóxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-
10 Carboxifluoresceína (5-FAM); 5- Carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA); 5-FAM (5-Carboxifluoresceína); 5-HAT (Hidróxi Triptamina); 5-Hidróxi Triptamina (HAT); 5-ROX (carbóxi-X-rodamina); 5-TAMRA (5-Carboxitetrametilrodamina); 6-
15 Carboxiroadamina 6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-Amino-4-metilcumarina; 7-Aminoactinomicina D (7-AAD); 7-Hidróxi-4-metilcumarina; 9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridine; ABQ; Acid Fuchsin; ACMA (9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina); Acridina Laranja; Acridina Vermelha; Acridina Amarela; Acriflavina; Acriflavina Feulgen SITSA; Alexa Flúor 350TM; Alexa Flúor
20 430TM; Alexa Flúor 488TM; Alexa Flúor 532TM; Alexa Flúor 546TM; Alexa Flúor 568TM; Alexa Flúor 594TM; Alexa Flúor 633TM; Alexa Flúor 647TM; Alexa Flúor 660TM; Alexa Flúor 680TM; Alizarina Complexon; Alizarina Vermelha; Aloficocianina (APC); AMC; AMCA-S; AMCA (Aminometilcumarina); AMCA-X;
25 Aminoactinomicina D; Aminocumarina; Aminometilcumarina (AMCA); Anilina Azul; Estearato de antrociila; APC (Aloficocianina); APC-Cy7; APTS; Vermelho Brilhante Astrazon 4G; Laranja Astrazon R; Vermelho Astrazon 6B; Astrazon Amarelo 7 GLL; Atabrina; ATTO-TAGTM CBQCA; ATTO-
30 TAGTM FQ; Auramina; Aurofosfina G; Aurofosfina; BAO 9

(Bisaminofeniloxadiazol); Berberina Sulfato; Beta
 Lactamase; Azul BFP *shifted* GFP (Y66H); Proteína
 Fluorescente Azul; BFP/GFP FRET; Bimane; Bisbenzamida;
 Bisbenzimidaz (Hoechst); Blancofor FFG; Blancofor SV;
 5 BOBOTM-1; BOBOTM-3; Bodipy 492/515; Bodipy 493/503; Bodipy
 500/510; Bodipy 505/515; Bodipy 530/550; Bodipy 542/563;
 Bodipy 558/568; Bodipy 564/570; Bodipy 576/589; Bodipy
 581/591; Bodipy 630/650-X; Bodipy 650/665-X; Bodipy
 665/676; Bodipy FL; Bodipy FL ATP; Bodipy FL-Ceramida;
 10 Bodipy R6G SE; Bodipy TMR; Bodipy TMR-X conjugado; Bodipy
 TMR-X, SE; Bodipy TR; Bodipy TR ATP; Bodipy TR-X SE; BO-
 PROTM-1; BO-PRO-3; Sulfoflavina Brilhante FF; Calceína;
 Calceína Azul; Cálcio CrimsonTM; Cálcio Verde; Cálcio
 Laranja; Calcoflúor Branco; Carboxi-X-rodamina (5-ROX);
 15 Cascade BlueTM; Cascade Yellow; Catecolamina; CCF2
 (GeneBlazer); CFDA; Proteína Fluorescente CFP - Ciano;
 CFP/YFP FRET; Clorofila; Cromomicina A; CL-NERF (Ratio Dye,
 pH); CMFDA; Celenterazina f; Celenterazina fcp;
 Celenterazina h; Celenterazina hcp; Celenterazina ip;
 20 Celenterazina n; Celenterazina O; Cumarina Faloidina; C-
 ficocianina; CPM Metilcumarina; CTC; CTC Formazan; Cy2TM;
 Cy3.1 8; Cy3.5TM; Cy3TM; Cy5.1 8; Cy5.5TM; Cy5TM; Cy7TM; Ciano
 GFP; Fluorosensor de AMP cíclico (FicRhR); Dabcil; Dansil;
 Dansil Amina; Dansil Cadaverina; Cloreto de dansila; Dansil
 25 DHPE; Fluoreto de dansila; DAPI; Dapoxil; Dapoxil 2;
 Dapoxil 3; DCFDA; DCFH (Diacetato de
 Diclorodiidrofluoresceína); DDAO; DHR (Diidro-rodamina
 123); Di-4-ANEPPS; Di-8-ANEPPS (não proporção); DiA (4-Di-
 16-ASP); Diacetato de Diclorodiidrofluoresceína (DCFH); DiD
 30 - Traçador Lipofílico; DiD (DiIC18(5)); DIDS; Diidorodamina

123 (DHR); DiI (DiIC18(3)); Dinitrofenol; DiO (DiOC18(3));
 DiR; DiR (DiIC18(7)); DNP; Dopamina; DsRed; DTAF; DY-630-
 NHS; DY-635-NHS; EBFP; ECFP; EGFP; ELF 97; Eosina;
 Eritrosina; Eritrosina ITC; Brometo de Etídio; Homodímero
 5 de Etídio-1 (EthD-1); Eucrisina; EukoLight; Cloreto de
 Európio (III); EYFP; Fast Blue; FDA; Feulgen
 (Pararosanilina); FITC; Flazo Laranja; Fluo-3; Fluo-4;
 Fluoresceína (FITC); Diacetato de Fluoresceína; Flúor-
 Esmeralda; Flúor-Ouro (Hidroxiestilbamidina); Flúor-Rubi;
 10 Flúor X; FM 143TM; FM 4-46; Fura RedTM; Fura RedTM /Flúor-3;
 Fura-2; Fura-2/BCECF; Genacril Vermelho Brilhante B;
 Genacril Brilhante Amarelo 100F; Genacril Rosa 3G; Genacril
 Amarelo 5GF; GeneBlazer (CCF2); uma proteína fluorescente
 (por exemplo, GFP (S65T); vermelho GFP *shifted* (rsGFP); GFP
 15 do tipo selvagem, excitação não UV (wtGFP); GFP do tipo
 selvagem, excitação UV (wtGFP); e GFPuv); Ácido Gloxálico;
 Azul Granular; Hematoporfirina; Hoechst 33258; Hoechst
 33342; Hoechst 34580; HPTS; Hidroxicumarina;
 Hidroxiestilbamidina (Flúor-Ouro); Hidroxitriptamina; Indo-
 20 1; Indodicarbocianina (DiD); Indotricarbocianina (DiR);
 Intrawhite Cf; JC-1; JO-JO-1; JO-PRO-1; Laurodan; LDS 751
 (DNA); LDS 751 (RNA); Leucofor PAF; Leucofor SF; Leucofor
 WS; Lissamina Rodamina; Lissamina Rodamina B; Homodímero de
 Calceína/Etídio; LOLO-1; LO-PRO-1; Amarelo Lúcifer;
 25 luminol, Lyso Tracker Azul; Lyso Tracker Azul-Branco; Lyso
 Tracker Verde; Lyso Tracker Vermelho; Lyso Tracker Amarelo;
 LysoSensor Azul; LysoSensor Verde; LysoSensor Amarelo/Azul;
 Mag Verde; Magdala Vermelho (Floxina B); Mag-Fura Vermelho;
 Mag-Fura-2; Mag-Fura-5; Mag-Indo-1; Magnésio Verde;
 30 Magnésio Laranja; Verde Malaquita; Marina Azul; Maxilon

Flavina Brilhante 10 GFF; Flavina Brilhante Maxilon 8 GFF;
 Merocianina; Metoxicumarina; Mitotracker Verde FM;
 Mitotracker Laranja; Mitotracker Vermelho; Mitramicina;
 Monobromobimano; Monobromobimano (mBBBr-GSH);
 5 Monoclorobimano; MPS (Metil Verde Pironina Estilbeno); NBD;
 NBD Amina; Vermelho do Nilo; NEDTM; Nitrobenzoxadidol;
 Noradrenalina; Vermelho Fast Nuclear; Amarelo Nuclear;
 Nylosan Brilhante Iavin E8G; Oregon Verde; Oregon Verde
 488-X; Oregon VerdeTM; Oregon VerdeTM 488; Oregon VerdeTM
 10 500; Oregon VerdeTM 514; Azul Pacífico; Pararosnilina
 (Feulgen); PBF1; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; PE-
 Vermelho Texas [Vermelho 613]; Floxina B (Magdala
 Vermelho); Phorwite AR; Phorwite BKL; Phorwite Rev;
 Phorwite RPA; Fosfina 3R; Ficoeritrina B [PE]; Ficoeritrina
 15 R [PE]; PKH26 (Sigma); PKH67; PMIA; Pontocromo Azul Preto;
 POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1; PO-PRO-3; Primulina; Procion
 Amarelo; Iodeto de Propídio (PI); PyMPO; Pireno; Pironina;
 Pironina B; Pirozal Brilhante Flavín 7GF; QSY 7; Quinacrina
 Mostarda; Vermelho 613 [PE-Vermelho Texas]; Resorufina; RH
 20 414; Rhod-2; Rodamina; Rodamina 110; Rodamina 123; Rodamina
 5 GLD; Rodamina 6G; Rodamina B; Rodamina B 200; Rodamina B
 extra; Rodamina BB; Rodamina BG; Rodamina Verde; Rodamina
 Falicidina; Rodamina Faloidina; Rodamina Vermelho; Rodamina
 WT; Rosa Bengala; R-ficocianina; R-ficoeritrina (PE);
 25 RsGFP; S65A; S65C; S65L; S65T; Safira GFP; SBFI;
 Serotonina; Sevron Vermelho Brilhante 2B; Sevron Vermelho
 Brilhante 4G; Sevron Vermelho Brilhante B; Sevron Laranja;
 Sevron Amarelo L; sgBFPTM; sgBFPTM (BFP super brilho);
 sgGFPTM; sgGFPTM (GFP super brilho); SITS; SITS (Primulina);
 30 SITS (Ácido Estilbeno Isotiosulfônico); SNAFL calceína;

SNAFL-1; SNAFL-2; SNARF calceína; SNARF1; Sódio Verde; Spectrum Aqua; Spectrum Verde; Spectrum Laranja; Spectrum Vermelho; SPQ (6-metóxi-N-(3-sulfopropil)quinolínio); Estilbeno; Sulfo-rodamina B can C; Sulfo-rodamina G Extra; SYTO 11; SYTO 12; SYTO 13; SYTO 14; SYTO 15; SYTO 16; SYTO 17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; SYTO 85; SYTOX Azul; SYTOX Verde; SYTOX Laranja; TETTM; Tetraciclina; Tetrametilrodamina (TRITC); Vermelho TexasTM; conjugado de Vermelho Texas-XTM; Tiadicarbocianina (DiSC3); Tiazina Vermelha R; Tiazol Laranja; Tioflavina 5; Tioflavina S; Tioflavina TCN; Tiolito; Tiozol Laranja; Tinopol CBS (Calcofluor Branco); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; TriColor (PE-Cy5); TRITC Tetrametilrodamina-isotiocianato; True Azul; Tru Vermelho; Ultralite; Uranine B; Uvitex SFC; VICO; wt GFP; WW 781; X-Rodamina; XRITC; Xileno Laranja; Y66F; Y66H; Y66W; Amarelo GFP; YFP; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; YOYO-3; e seis destes. Fluoróforos podem incluir proteínas fluorescentes.

Os marcadores podem incluir derivados de fluoróforos que foram modificados para facilitar a conjugação com outra molécula reativa. Dessa forma, os marcadores podem incluir derivados reativos com amina como, por exemplo, derivados isotiocianato e/ou derivados éster de succinimidil do marcador.

Marcadores podem incluir uma proteína fluorescente que é incorporada em uma sonda como parte de uma proteína de fusão. Proteínas fluorescentes podem incluir proteínas

fluorescentes verdes (por exemplo, GFP, eGFP, AcGFP, TurboGFP, Emerald, Azami Verde, e ZsGreen), proteínas fluorescentes azuis (por exemplo, EBFP, Sapphire, e T-Sapphire), proteínas fluorescentes ciano (por exemplo, ECFP, mCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan 1 e Midoriishi Ciano),
 5 proteínas fluorescentes amarelas (por exemplo, EYFP, Topaz, Venus, mCitrine, YPet, PhiYFP, ZsYellow e mBanana) e proteínas fluorescentes laranjas e vermelhas (por exemplo, Kusabira Laranja, mOranje, dTomato, dTomato-Tandem, DsRed,
 10 DsRed2, DsRed-Express (T1), DsRED-Monômero, mTangerine, mStrawberry, AsRed2, mRFP1, JRed, mCherry, HcRed1, mRaspberry, HcRed-Tandem, mPlum e AQ143). Outras proteínas fluorescentes são descritas na técnica (Tsien, R.Y., *Annual. Rev. Biochem.* 67: 509-544 (1998); e Lippincott-Schwartz e cols., *Science* 300: 87-91 (2003)).
 15

Como observado acima, as sondas podem estar compreendidas em proteínas de fusão que também incluem uma proteína fluorescente acoplada no terminal N ou terminal C da sonda. A proteína fluorescente pode ser acoplada por
 20 meio de um vinculador peptídico, como descrito na técnica (U.S. 6.448.087; Wurth e cols., *J. Mol. Biol.* 319: 1.279-1.290 (2002); e Kim e cols., *J. Biol. Chem.* 280: 35.059-35.076 (2005), que são aqui incorporados por referência em suas totalidades). Em algumas modalidades, vinculadores
 25 adequados podem ter comprimento de cerca de 8-12 aminoácidos. Em modalidades adicionais, mais do que cerca de 75% dos resíduos de aminoácidos do vinculador são selecionados de resíduos de serina, glicina e alanina.

Em modalidades que compreendem exame de imagens *in vivo*, podem ser usados marcadores úteis para exame de
 30

imagens *in vivo*. Por exemplo, podem ser usados marcadores úteis para exames de ressonância magnética como, por exemplo, flúor-18, bem como marcadores quimioluminescentes. Em outra modalidade, a sonda é marcada com um marcador radioativo. Por exemplo, o marcador pode fornecer emissão de pósitron de uma energia suficiente para ser detectada pelas máquinas empregadas atualmente para essa finalidade. Um exemplo de um elemento desse tipo compreende oxigênio-15 (um isótopo de oxigênio que decai por emissão de pósitron) ou outro radionuclídeo. Outro exemplo é o carbono-11. Sondas marcadas com marcadores desse tipo podem ser administradas a um paciente, elas se localizam na proteína-alvo, e pode ser feito o exame de imagem do paciente (por varredura) para detectar a sonda localizada, identificando, dessa forma, locais de proteína-alvo localizada. As sondas marcadas podem ser administradas por qualquer meio adequado que permita a localização em locais da proteína-alvo, por exemplo, por injeção direta, por via intranasal ou oral. Em algumas modalidades, sondas marcadas radioativamente podem ser injetadas em um paciente, e a ligação da sonda à proteína-alvo monitorada externamente.

Marcadores podem incluir oligonucleotídeos. Por exemplo, as sondas peptídicas podem ser acopladas e um tag de oligonucleotídeo que pode ser detectado por métodos conhecidos na técnica (por exemplo, ensaios de amplificação como, por exemplo, PCR, TMA, b-DNA, NASBA, e semelhantes).

6. Sondas imobilizadas e seus usos

Em algumas modalidades, as sondas peptídicas são imobilizadas em um suporte sólido. Isso pode ser obtido por métodos conhecidos na técnica como, por exemplo, métodos

que compreendem a exposição de uma sonda a um suporte sólido por um período de tempo suficiente para permitir a imobilização da sonda no suporte sólido. Os métodos podem ainda compreender a remoção de sonda não ligada, o
5 entrecruzamento da sonda com o suporte sólido (por exemplo, quimicamente e/ou por exposição à radiação UV) e a secagem do suporte sólido e da sonda. Métodos de imobilização de peptídeos em suportes sólidos são conhecidos na técnica. Em uma modalidade, as sondas são imobilizadas em um estado
10 estrutural específico, por exemplo, em uma conformação específica (por exemplo, predominantemente hélice α /helicoidal aleatória ou predominantemente folha β), como descrito na U.S. 2006-0057671, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

15 As sondas imobilizadas a um suporte sólido podem ser usadas para detectar rápida e eficientemente a presença de proteína-alvo em uma amostra. Sondas imobilizadas também são úteis para ligar uma parte, basicamente toda ou toda uma proteína-alvo presente em uma amostra, e depois a
20 proteína-alvo pode ser separada do resto da amostra, por exemplo, para fornecer uma amostra purificada que possua um teor reduzido de proteína-alvo, que seja essencialmente livre de proteína-alvo, ou que seja completamente livre de proteína-alvo. Dessa forma, por exemplo, podem ser
25 preparadas composições biológicas, médicas ou consumíveis que possuem um teor reduzido de proteína-alvo.

O suporte sólido pode ser qualquer substância sólida conhecida que seja adequada à ligação de peptídeos e adequada ao uso com materiais biológicos. Muitos desses
30 suportes sólidos são conhecidos por aqueles habilitados na

técnica. Exemplos de materiais que são úteis como suportes sólidos incluem, sem limitação, plásticos, incluindo poliestireno, vidro, polissacarídeos, metais e vários polímeros, incluindo látex, acrílicos e náilons. Exemplos
5 de formas de suportes sólidos incluem, sem limitação, placas, glóbulos e membranas.

Em geral, um método de detecção de uma proteína-alvo com o uso de uma sonda imobilizada compreende o fornecimento de uma sonda imobilizada, o fornecimento de
10 uma amostra que contém ou suspeita de conter uma proteína-alvo, a exposição da amostra à sonda imobilizada sob condições e por um período de tempo suficiente para que a sonda imobilizada se ligue a uma proteína-alvo na amostra (se presente), e a detecção da presença de proteína-alvo
15 ligada à sonda imobilizada. A detecção pode ser feita por meio de qualquer técnica conhecida, como discutido e detalhado acima. Em algumas modalidades, a detecção compreende a avaliação da emissão de luz por um marcador como, por exemplo, fluorescência ou luminescência. Em
20 outras modalidades, a detecção ocorre por PAGE e coloração de proteínas presentes no gel. Ainda em outras modalidades, a detecção é feita por reação com um anticorpo específico para uma proteína-alvo de interesse. Outros exemplos não limitantes de técnicas de detecção foram apresentados acima
25 com referência aos marcadores.

As condições de reação podem ser selecionadas por aqueles habilitados na técnica de acordo com considerações de rotina. Condições adequadas incluem um ambiente aquoso, pH neutro (por exemplo, pH de cerca de 6,0 a cerca de 8,0),
30 sal moderado (por exemplo, de cerca de 100 mM a cerca de

400 mM de sal), e pouco ou sem detergentes, emulsificantes ou outras substâncias acessórias que possam inibir interações proteína-proteína. As quantidades de sonda imobilizada e de amostra a serem utilizadas irão variar, dependendo da quantidade de amostra disponível, de a quantidade de proteína-alvo suspeita de estar presente na amostra, da quantidade de tempo à qual o usuário deseja expor a amostra à sonda imobilizada, e de outras considerações.

Em geral, um método de redução do teor de proteína-alvo de uma amostra compreende o fornecimento de uma sonda imobilizada, o fornecimento de uma amostra que contém ou suspeita de conter uma proteína-alvo, a exposição da amostra à sonda imobilizada sob condições e por um período de tempo suficiente para que a sonda imobilizada se ligue a pelo menos algumas das proteínas-alvo na amostra (se presente), e a separação da sonda imobilizada e de complexos de sonda imobilizada-proteína-alvo da amostra. Em algumas modalidades, o método reduz a quantidade de proteína-alvo na amostra por uma quantidade que é detectável. Em outras modalidades, o método reduz a quantidade de proteína-alvo na amostra a uma quantidade abaixo dos limites de detecção. Em outras modalidades, o método elimina completamente proteínas-alvo de uma amostra.

Métodos de redução do teor de proteína-alvo de uma amostra podem ser efetuados sob condições similares às aquelas descritas acima para a detecção de proteína-alvo. A separação da sonda imobilizada e de complexos de sonda imobilizada-proteína-alvo da amostra pode ser feita por qualquer técnica adequada como, por exemplo, vertendo-se a

amostra, por remoção física da sonda imobilizada e de complexos da amostra etc. Aqueles habilitados na técnica conhecem várias formas de remoção de glóbulos, membranas e outros suportes sólidos de soluções aquosas, e qualquer uma dessas formas pode ser usada para separar a sonda imobilizada e os complexos imobilizados da amostra. Em algumas modalidades, a sonda imobilizada é uma sonda ligada a uma membrana que é permeável à amostra, por exemplo, sangue ou produtos sanguíneos como, por exemplo, plasma. Nessas modalidades, a amostra é filtrada através da membrana ligada à sonda para remover uma parte ou todas as proteínas-alvo da amostra, por exemplo, do sangue ou do produto sanguíneo. A passagem do fim da amostra através da membrana causa a separação da membrana ligada à sonda da amostra. Após a amostra ter sido filtrada, a membrana ligada à sonda pode ser testada quanto à presença de proteínas-alvo.

Como fica evidente a partir do que foi apresentado acima, a invenção também inclui a detecção da presença de proteína-alvo ligada à sonda imobilizada. A detecção pode ser feita por meio de qualquer técnica conhecida, como discutido e detalhado acima. Da mesma forma, várias etapas adicionais podem ser incluídas nos métodos, desde que essas etapas não façam com que os métodos fiquem incapazes de remover uma parte ou todas as proteínas de príon presentes em uma amostra.

D. Detecção de proteínas e de estruturas de proteína

Como observado acima, um aspecto da invenção fornece sondas para a detecção de proteínas em uma amostra ou *in vivo*, e para a detecção de proteínas em um estado

estrutural específico (por exemplo, um estado estrutural-alvo). Por exemplo, uma sonda peptídica pode ser marcada de forma que apresente fluorescência quando a sonda peptídica estiver em uma conformação em alfa-hélice ou helicoidal aleatória (ou em estado solúvel), e não apresente fluorescência quando a sonda peptídica estiver em uma conformação de folha beta (ou em estado agregado insolúvel). Da mesma forma, uma sonda peptídica pode ser marcada de tal forma que não forme excímeros quando a sonda peptídica estiver em uma conformação em alfa-hélice ou helicoidal aleatória (ou em estado solúvel), mas forme excímeros quando a sonda peptídica estiver em uma conformação de folha beta (ou em estado agregado insolúvel). Marcadores exemplares incluem fluoróforos ou proteínas fluorescentes como, por exemplo, pireno, triptofano, fluoresceína, rodamina, GFP e vários outros, como aqui descrito.

Tradicionalmente, as estruturas de proteínas têm sido determinadas por diversos métodos experimentais ou computacionais descritos na técnica. Veja, por exemplo, U.S. 2006-0057671; U.S. 6.448.087; Waldo e cols., *Nat. Biotech.* 17: 691-695 (1999); Wurth e cols., *J. Mol. Biol.* 319: 1.279-1.290 (2002); Kim e cols., *J. Biol. Chem.* 280: 35.069-35.076 (2005), que são aqui incorporados por referência em suas totalidades. Por exemplo, a estrutura da proteína pode ser avaliada experimentalmente por qualquer método capaz de produzir pelo menos estruturas de baixa resolução. Tais métodos atualmente incluem cristalografia por raios X e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN). A cristalografia por raios X é um método

para avaliação estrutural de proteínas, e se baseia na difração de radiação de raios X de um comprimento de onda característico por nuvens de elétrons que circundam os núcleos atômicos no cristal. A cristalografia por raios X
5 usa cristais de biomoléculas purificadas (mas essas freqüentemente incluem componentes solventes, co-fatores, substratos ou outros ligantes) para determinar a resolução quase atômica dos átomos que constituem a biomolécula em particular. Metodologias para o crescimento de cristal são
10 conhecidas na técnica, e tipicamente variam de biomolécula para biomolécula. Técnicas automatizadas de crescimento de cristal também são conhecidas.

A ressonância magnética nuclear (RMN) atualmente permite a determinação da conformação da solução (em vez da
15 estrutura cristal) de biomoléculas. Tipicamente, somente pequenas moléculas, por exemplo, proteínas de menos de cerca de 100-150 aminoácidos, podem ser usadas com essa técnica. No entanto, avanços recentes levaram à elucidação experimental das estruturas da solução de proteínas raia,
20 com o uso de técnicas como, por exemplo, marcação isotópica. A vantagem da espectroscopia por RMN sobre a cristalografia por raios X é que a estrutura é determinada em solução, e não em uma rede cristalina, em que as interações vizinhas à rede podem alterar a estrutura da
25 proteína. A desvantagem da espectroscopia por RMN é que a estrutura por RMN não é tão detalhada ou tão precisa quanto uma estrutura cristal. Geralmente, estruturas de biomoléculas determinadas por espectroscopia por RMN são de resolução moderada, comparadas com aquelas determinadas por
30 cristalografia.

No contexto da presente invenção, a conformação nativa ou alterada (por exemplo, após contacto com uma proteína-alvo) de uma sonda peptídica pode ser determinada por um ou mais métodos como, por exemplo, CD, infravermelho com transformada de Fourier, ultravioleta, RMN, ou fluorescência, espalhamento de luz, detecção de hidrofobicidade usando fluores extrínsecas como, por exemplo, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno (ANS) ou corante vermelho do Congo, transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET), extinção de fluorescência intrínseca de triptofano por meio de mudança conformacional ou monômero ou ligação em uma interface em um α - β heterodímero, ultracentrifugação de equilíbrio, e cromatografia por exclusão de tamanho. Veja, por exemplo, "PHYSICAL BIOCHEMISTRY: APPLICATIONS TO BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY", 2ª ed., W. H. Freeman & Co., Nova York, N.Y., 1982, para descrições dessas técnicas.

Como observado acima, em algumas modalidades, a sonda é modificada para compreender marcadores que sejam detectáveis por meios ópticos. Esses marcadores podem incluir triptofano (um aminoácido), pireno ou fluoróforos similares, ou uma proteína fluorescente, anexados nas posições terminais da sonda peptídica, ou perto delas. A adesão de marcadores como, por exemplo, fluoróforos, é obtida de acordo com métodos convencionais que são bem conhecidos na técnica.

1. Excímeros

Em uma modalidade, os marcadores possuem a capacidade de interagir de forma a produzir uma espécie conhecida como excímero. Um excímero é um aduto que não é necessariamente

covalente e que é formado entre uma entidade molecular que foi excitada por um fóton e uma entidade molecular não excitada idêntica. O aduto possui natureza transitória, e existe até que fluoresça por emissão de um fóton. Um
5 excímero representa a interação de dois fluoróforos, os quais, mediante excitação com uma luz de um comprimento de onda específico, emitem luz em um comprimento de onda diferente, que é também diferente em magnitude daquela emitida por qualquer um dos fluoróforos atuando
10 isoladamente. É possível reconhecer um excímero (ou a formação de um excímero) pela produção de uma nova banda fluorescente em um comprimento de onda que seja mais longo do que aquele do espectro de emissão usual. Um excímero pode ser distinguido da transferência de energia por
15 ressonância fluorescente, já que o espectro de excitação é idêntico àquele do monômero.

A formação do excímero é dependente do alinhamento geométrico dos fluoróforos, e é fortemente influenciada pela distância entre eles. Em uma modalidade, fluoróforos
20 estão presentes em cada terminal da sonda, e a formação de excímero entre fluoróforos é desprezível, desde que a conformação global da sonda seja de hélice α ou helicoidal aleatória. Isso é facilmente determinado por medida do comportamento da fluorescência da sonda no solvente a ser
25 usado para análise na ausência da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a interação da sonda com a proteína-alvo causa uma alteração estrutural (por exemplo, uma mudança conformacional) na sonda, de tal modo que ocorra a formação de excímero. Isso é facilmente medido pelos procedimentos
30 aqui descritos. Por exemplo, a conversão da estrutura da

sonda em relação àquela exibida na ausência de analito (hélice α ou helicoidal aleatória) em uma estrutura de folha β pode permitir que fluoróforos anexados às sondas formem excímeros que podem ser facilmente identificados.

5 Além disso, a magnitude da formação de excímero está diretamente relacionada à quantidade de analito protéico presente.

Dessa forma, de acordo com um aspecto da invenção, sondas marcadas formam excímeros quando adotam um estado
10 estrutural específico, por exemplo, um estado estrutural-alvo, como pode ocorrer quando as sondas interagem com a proteína-alvo no estado estrutural-alvo. A formação de excímeros pode ser detectada por uma mudança das propriedades ópticas. Essas mudanças podem ser medidas por
15 técnicas fluorimétricas conhecidas, que incluem UV, IR, CD, RMN ou fluorescência, dentre várias outras, dependendo do fluoróforo anexado à sonda. A magnitude dessas mudanças das propriedades ópticas está diretamente relacionada à quantidade de sonda que adotou o estado estrutural
20 associado à mudança, o que está diretamente relacionado à quantidade de proteína-alvo presente.

2. Dicroísmo circular

"Dicroísmo circular" ("CD") é observado quando matéria opticamente ativa absorve luz polarizada circular L e R de
25 forma ligeiramente diferente, como medido por um espectropolarímetro CD. As diferenças são muito pequenas e representam frações de graus em elipticidade. Os espectros de CD para tipos distintos de estruturas secundárias presentes em peptídeos e proteínas são distintos. A medida
30 e a comparação de curvas de CD de proteína em complexo vs.

que não estão em complexo representa um meio de medição preciso para os métodos aqui revelados.

3. O sistema GFP

Em uma modalidade, um sistema de proteína de fusão de GFP é usado para determinar o estado estrutural específico da sonda ou de uma proteína de teste. Foram descritas proteínas de fusão que incluem uma proteína de teste e proteína fluorescente verde (GFP) para determinar a solubilidade da proteína de teste. Veja, por exemplo, Waldo e cols., *Nat. Biotech.* 17: 691-695 (1999); Patente U.S. N° 6.448.087, Wurth e cols., *J. Mol. Biol.* 319: 1.279-1.290 (2002); Kim e cols., *J. Biol. Chem.* 280: 35.059-35.076 (2005), cada um deles aqui incorporado por referência em suas totalidades. Como se acredita que o enovelamento de GFP em sua estrutura fluorescente nativa ocorra lentamente (Cubitt e cols., *Trends Biochem. Sci.* 20: 448-455 (1995)), a fluorescência de uma proteína de fusão de GFP pode depender da solubilidade da proteína de teste. Caso a proteína de teste seja insolúvel, a porção GFP da proteína de fusão poderá ser retirada da solução com a proteína de teste, evitando, dessa forma o enovelamento em sua estrutura fluorescente.

No contexto da presente invenção, proteínas de fusão de GFP são úteis para a identificação de uma sonda ou proteína de teste em um estado estrutural específico, para a identificação de uma sonda específica para uma proteína de teste em um estado estrutural específico, e para a identificação de agentes que afetam o estado estrutural da proteína-alvo. Por exemplo, a fluorescência de uma fusão de GFP-sonda ou fusão de GFP-proteína de teste é indicativa de

uma sonda ou proteína de teste solúvel, com uma tendência baixa para formar auto-agregados. Em contraste, a ausência de fluorescência é indicativa da presença de uma sonda ou proteína de teste insolúvel ou de auto-agregação.

5 Dessa forma, um aspecto da invenção fornece uma proteína de fusão que compreende: (a) uma sonda peptídica para uma proteína-alvo, por exemplo, uma sonda peptídica que compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança
10 conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, em que a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e a sonda peptídica não compreende a sequência de comprimento total
15 da proteína-alvo; e (b) uma proteína fluorescente (por exemplo, proteína fluorescente verde (GFP)). Opcionalmente, a proteína de fusão ainda inclui um vinculador polipeptídico que liga a sonda peptídica e o polipeptídeo fluorescente. No contexto desse aspecto da invenção, "GFP"
20 inclui proteínas que exibem propriedades de enovelamento e fluorescência equivalentes à proteína GFP de comprimento total como, por exemplo, derivados ou fragmentos da proteína GFP de comprimento total que possui pelo menos cerca de 60% de identidade de sequência para a proteína GFP
25 de comprimento total.

 Proteínas-alvo adequadas incluem proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína amilóide beta ou peptídeo A β , amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina,
30 imunoglobulinas ou fragmentos microglobulina- β_2 destas, α -

sinucleína, rodopsina, $\alpha 1$ -antiquimotripsina, cistalinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina
 5 ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

10 Em algumas modalidades, a proteína-alvo é a proteína de príon (por exemplo, PrP^C, PrP^{Sc}, ou uma mistura destes), e a sonda peptídica pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 13 ou uma seqüência relacionada. Em outra modalidade, a proteína-alvo é proteína amilóide beta (por exemplo, A β 42, A β 40, ou
 15 uma mistura destes), e a sonda peptídica pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 32, ID. DE SEQ. N°: 4, ou uma seqüência relacionada. Em modalidades adicionais, a proteína-alvo é proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, e a sonda peptídica pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 11 ou uma
 20 seqüência relacionada. Ainda em outras modalidades adicionais, a proteína-alvo é a proteína transtiretina, e a sonda peptídica pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 26, ou uma seqüência relacionada. Ainda em outras modalidades adicionais, a proteína-alvo é a proteína cistatina C, e a
 25 sonda peptídica pode incluir o ID. DE SEQ. N°: 17 ou uma seqüência relacionada. Ainda em outras modalidades adicionais, a proteína-alvo é a proteína da doença de Huntington (ou seja, Huntingtina), e a sonda peptídica inclui o ID. DE SEQ. N°: 19, ou uma seqüência relacionada.

30 Como observado acima, a proteína de fusão pode emitir

um sinal fluorescente correlacionado à sua solubilidade. Dessa forma, por exemplo, uma proteína de fusão solúvel pode exibir um forte sinal fluorescente, enquanto uma proteína insolúvel não apresentará fluorescência. Embora
5 sem se prender a uma teoria em particular, acredita-se que, pelo menos no contexto de proteínas amilóides, a fluorescência de uma proteína de fusão também está correlacionada ao estado conformacional da sonda peptídica. Dessa forma, por exemplo, a proteína de fusão pode emitir
10 um sinal fluorescente quando a sonda peptídica estiver em uma conformação alfa-helicoidal, enquanto a proteína de fusão pode não emitir um sinal fluorescente quando a sonda peptídica estiver em uma conformação de folha beta.

Em algumas modalidades, a sonda peptídica está em uma
15 conformação alfa-helicoidal quando presente em uma solução de SDS 1,0% que possui um pH de cerca de 7. Em modalidades adicionais, a sonda peptídica está em uma conformação de folha beta quando presente em uma solução que possui um pH de cerca de 4,5. Opcionalmente, a proteína de fusão é
20 imobilizada em um suporte sólido (por exemplo, quando a proteína de fusão ainda compreende uma porção de avidina, e está acoplada ao suporte sólido por meio de uma porção de biotina).

As proteínas de fusão podem ser preparadas por
25 clonagem de uma seqüência de DNA que codifica a sonda peptídica em um vetor de expressão de GFP (veja, por exemplo, Waldo e cols., *Nature Biotechnol.* 17, 691-695 (1999)). Por exemplo, a seqüência de DNA que codifica a sonda peptídica pode ser obtida por amplificação por PCR de
30 uma seqüência-alvo que codifica a sonda peptídica ou,

alternativamente, por preparação de oligonucleotídeos superpostos que codificam a sonda peptídica quando anelados (veja, por exemplo, Kim e cols., *J. Mol. Biol.* 319: 1.279-1.290 (2002)). Subseqüentemente, a seqüência de DNA que
5 codifica a sonda peptídica pode ser tratada com enzimas de restrição, e clonada no vetor de expressão de GFP.

4. Ressonância de plasmônio de superfície

As estruturas biomoleculares também podem ser estudadas por avaliação por meio de "ressonância de
10 plasmônio de superfície" ou "SPR". O fenômeno de SPR é observado como uma queda da intensidade de luz refletida em um ângulo específico da interface entre um material opticamente transparente (por exemplo, vidro), e um material opaco, e depende, entre outros fatores, do índice
15 de refração do meio (por exemplo, uma solução de amostra) próximo à superfície do material opaco (veja WO 90/05295). Uma mudança do índice de refração na superfície do material opaco como, por exemplo, pela adsorção ou ligação de material a ele, causará uma mudança correspondente no
20 ângulo no qual ocorre a SPR. Em um ensaio de ligação de proteína baseado em SPR, uma sonda peptídica pode ser colocada em contato com uma proteína-alvo que está imobilizada em uma superfície de um suporte opaco. A
25 seguir, a interação da sonda peptídica com a proteína-alvo pode ser avaliada por monitoramento da SPR entre a interface da superfície do suporte opaco e um material transparente.

E. Métodos de detecção para proteínas-alvo

Em algumas modalidades dos métodos revelados, são
30 selecionadas sondas peptídicas para adição a uma amostra

desconhecida ou de teste ou para uso *in vivo*, para detectar proteína-alvo presente na amostra ou *in vivo*, incluindo proteína-alvo presente em um estado estrutural específico. Os métodos de detecção podem ser realizados seguindo as

5 regras gerais apresentadas na Patente U.S. 7.166.471; Pedido de Patente U.S. 10/728.246; Pedido PCT PCT/US2006/005095 e/ou Pedido U.S. 11/030.300, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência em suas totalidades.

10 Para modalidades *in vitro*, após uma sonda peptídica ser selecionada, ela é adicionada a uma amostra de teste. Em algumas modalidades como, por exemplo, com a detecção de proteína de príon, pode ser vantajoso submeter a amostra às metodologias de desagregação comumente conhecidas na

15 técnica como, por exemplo, sonificação, antes da adição da sonda. A etapa de desagregação permite que qualquer material da amostra potencialmente agregado se separe, de forma que esses materiais desagregados da amostra fiquem livres para combinar com a sonda peptídica recém

20 introduzida, facilitando, dessa forma, a interação entre a sonda e a proteína-alvo e a detecção da proteína-alvo.

Após se deixar que a amostra de teste ou a amostra de teste desagregada interaja com as sondas peptídicas, a mistura resultante é então submetida a métodos analíticos

25 comumente conhecidos na técnica para a detecção de interação entre a sonda e a proteína-alvo. Em algumas modalidades, a proteína-alvo é imobilizada em um suporte sólido. A sonda peptídica é colocada em contato com a proteína-alvo, e se permite que elas interajam.

30 Subseqüentemente, a sonda peptídica não ligada é removida,

e a sonda peptídica ligada é observada pela detecção de um sinal de um marcador detectável na sonda. Por exemplo, quando o marcador detectável for um fluoróforo, a sonda peptídica ligada poderá ser iluminada para estimular a emissão pelo fluoróforo. Quando o marcador detectável for um radioisótopo, o peptídeo ligado poderá ser colocado em contato com um cintilante para estimular emissão pelo cintilante. Alternativamente, a detecção pode ser efetuada com a utilização de anticorpos como, por exemplo, anticorpos para a proteína-alvo, que se ligarão a qualquer proteína-alvo ligada pela sonda.

Em algumas modalidades, a sonda peptídica e a proteína-alvo podem entrar em contato na presença de um agente de teste para avaliar a habilidade do agente de teste para inibir uma interação entre a sonda peptídica e proteína-alvo.

Em uma modalidade, a sonda possui uma conformação predominantemente de alfa-hélice ou helicoidal aleatória, antes de ser colocada em contato com a proteína-alvo, e passa por uma mudança para uma conformação de folha β quando colocada em contato com a proteína-alvo em uma conformação de folha β . De acordo com aspectos específicos dessa modalidade, a mudança conformacional da sonda propaga mudanças conformacionais adicionais em outras sondas que entram em contato com a sonda que passou pela mudança conformacional, amplificando, dessa forma, o sinal da reação de detecção. Dessa forma, amostras desconhecidas ou de teste que contêm conformação de folha β característica de proteínas anormalmente enoveladas ou que causam doenças resultam em um aumento na formação de folha β e,

freqüentemente, na formação de agregados insolúveis na mistura seguinte que contém tanto a amostra de teste quanto as sondas peptídicas. Inversamente, amostras desconhecidas ou de teste que não possuem estruturas secundárias predominantemente de folha β não catalisarão uma transição para a estrutura de folha β , nem induzirão a formação de agregados. Esse aspecto da invenção pode ser particularmente vantajoso quando a proteína-alvo for uma proteína de prion.

Por exemplo, uma amostra que compreende TSE pode ser analisada da seguinte forma. Em relação à **FIG. 2**, a linha de cima do esquema ilustra uma amostra desconhecida de proteína de TSE representada como contendo folhas β . As folhas β são desagregadas por sonificação. Sondas peptídicas marcadas são adicionadas e permite-se que se liguem à amostra. A conformação de folha β na amostra induz as sondas peptídicas a se adequar a uma conformação de folha β . A propagação de folha β entre as sondas peptídicas forma agregados. A transição resultante para uma forma predominantemente de folha β e a formação amplificada de agregados são detectadas por técnicas como, por exemplo, espalhamento de luz e CD. Em algumas modalidades, a sonda peptídica é marcada de forma fluorescente e é utilizada a detecção de fluorescência.

Em uma modalidade adicional, qualquer mudança conformacional propagada está diretamente correlacionada aos níveis de proteínas associadas a doenças (por exemplo, príons) com o estado progressivo (ou infectividade) da doença.

Em algumas modalidades, como aquelas relacionadas às

proteínas de príon, pode ser preferível utilizar os métodos atualmente apresentados pelos quais não há aumento dos produtos infecciosos em consequência da propagação. Isso pode ser obtido colocando-se uma "parada" nas ligações

5 entre a cadeia de infecção, transmissão e propagação da forma anormal. Essa parada pode ocorrer em um estágio de transição entre as formas de dímero e multímero do agregado. A formação física da forma de multímero pode ser bloqueada simplesmente impedindo-se a etapa que leva à sua

10 formação. Isso pode ser obtido pela utilização de uma sonda na qual a seqüência de interesse esteja anexada a um peptídeo não relevante, ou por um segmento "bloqueador" neutro, sabendo-se que as sondas nos vinculadores ou "amarras" têm maior probabilidade de se encontrar e causar

15 a amplificação do sinal.

Em algumas modalidades, a amostra de teste é submetida às condições que promovem a mudança estrutural, por exemplo, uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, o que

20 pode resultar em agregação. Tais condições são conhecidas na técnica. Por exemplo, a ligação de um ligante de metal poderia dirigir uma mudança na conformação da proteína e favorecer a agregação; a expressão ou clivagem de diferentes seqüências peptídicas pode promover agregação

25 avançada, o que leva à formação de fibrila e placa; mutações genéticas pontuais também podem alterar os níveis relativos de energia necessários pelas duas conformações distintas, resultando em mudanças intermediárias em transições estruturais; um aumento nos níveis de

30 concentração poderia ser suficiente para favorecer uma

transição conformacional. Em outras modalidades, a amostra de teste é "semeada" com agregados de seqüências peptídicas curtas. Por exemplo, proteínas de príon sintéticas e/ou recombinantes e fibrilas podem ser menos reativas com sondas peptídicas do que proteína de príon derivada biologicamente. Essa reatividade reduzida pode ser superada, no entanto, semeando-se a mistura de reação com agregados de seqüências pequenas derivadas de príons como, por exemplo, um peptídeo de príon que compreende resíduos 106-126 (PrP₁₀₆₋₁₂₆). Independentemente do mecanismo desencadeador inicial, o resultado final pode ser a propagação catalítica da conformação anormal, resultando na transformação estrutural de proteína previamente normal.

Em modalidades *in vivo*, uma sonda peptídica marcada é administrada a um paciente, por exemplo, por injeção local, permite-se que ela se localize em quaisquer locais de proteína-alvo ou estruturas de proteína-alvo de ordem superior presentes no paciente, e depois o paciente pode ser pesquisado para detectar os locais da sonda marcada localizada em locais de proteína-alvo ou de estruturas de proteína-alvo de ordem superior. Outras vias de administração também são contempladas, incluindo a via intranasal e a via oral. Como discutido acima, a sonda pode ser marcada com qualquer marcador adequado para exames de imagem *in vivo*. O paciente pode ser submetido a uma varredura de corpo inteiro para identificar qualquer local de proteína-alvo. Alternativamente, áreas específicas do paciente podem ser pesquisadas para determinar se a proteína-alvo está localizada nas áreas específicas. Áreas de interesse específicas podem incluir tecido vascular,

tecido linfático ou cerebral (incluindo o hipocampo ou os lobos frontais), ou outros órgãos como, por exemplo, o coração, os rins, fígado ou pulmões.

Como observado acima, em algumas modalidades, uma sonda peptídica é específica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico. Por exemplo, uma sonda peptídica pode se ligar preferencialmente à proteína-alvo em uma conformação em alfa-hélice ou helicoidal aleatória, e ter uma afinidade menor (ou não) pela proteína-alvo em uma conformação de folha beta. Inversamente, uma sonda peptídica pode se ligar preferencialmente à proteína-alvo em uma conformação de folha beta e ter uma afinidade menor (ou não) pela proteína-alvo em uma conformação em alfa-hélice ou helicoidal aleatória. Da mesma forma, uma sonda peptídica pode se ligar preferencialmente a uma proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação. Por exemplo, uma sonda peptídica pode se ligar preferencialmente aos monômeros solúveis da proteína-alvo, aos oligômeros solúveis da proteína-alvo, aos auto-agregados insolúveis (incluindo auto-agregados amorfos), às protofibrilas ou às fibrilas, e ter uma afinidade menor (ou não) pela proteína-alvo em um estado diferente. Tais sondas são úteis para a identificação de proteína-alvo no estado estrutural específico reconhecido preferencialmente pela sonda peptídica.

Como aqui usada, uma sonda peptídica que "se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação" significa que a sonda peptídica se liga de uma forma dose-dependente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação, e não se liga de uma forma

dose-dependente à proteína-alvo em um estado de auto-agregação diferente. Por exemplo, uma sonda peptídica pode se ligar preferencialmente à proteína-alvo em estados de ordem superior de auto-agregação, de tal forma que a sonda peptídica se ligue de forma dose-dependente aos oligômeros e às fibras e não se ligue de forma dose-dependente aos monômeros.

Por exemplo, sondas peptídicas que consistem em, ou que compreendem a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 36 ou ID. DE SEQ. N°: 45, reagem especificamente com oligômeros de A β 40 e A β 42, e não reagem especificamente com monômeros de A β 40 e A β 42. Dessa forma, essas sondas peptídicas são úteis para a identificação de estruturas de ordem superior de A β 40 e A β 42.

Dessa forma, um aspecto da invenção fornece métodos para a identificação de uma proteína-alvo presente em uma forma estrutural específica em uma amostra, que compreende: (a) o contato da amostra com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à forma estrutural específica da proteína-alvo, e (b) a detecção de qualquer ligação entre a sonda peptídica e qualquer proteína-alvo presente na forma estrutural específica.

Como discutido acima, a sonda peptídica pode ainda incluir um marcador (por exemplo, pireno, triptofano, um marcador de polipeptídeo fluorescente como, por exemplo, proteína fluorescente verde (GFP), e um marcador de radionuclídeo), e pode opcionalmente ser imobilizada em um suporte sólido.

Alternativamente, métodos *in vivo* para a identificação

de uma proteína-alvo presente em uma forma estrutural específica em um paciente podem compreender: (a) a administração ao paciente de uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à forma estrutural específica da proteína-alvo, e (b) a varredura do paciente para detectar qualquer sonda peptídica localizada, detectando, dessa forma, qualquer proteína-alvo na forma estrutural específica que possa estar presente no paciente. Como discutido acima, a sonda peptídica pode ser marcada com qualquer marcador adequado à detecção por exames de imagem *in vivo*, e a sonda pode ser administrada por qualquer via de administração adequada. Como observado acima, o paciente pode ser submetido a uma varredura de corpo inteiro, ou áreas específicas podem ser pesquisadas ou examinadas, por exemplo, tecido vascular, tecido linfático ou cerebral (incluindo o hipocampo ou os lobos frontais), ou outros órgãos como, por exemplo, o coração, os rins, o fígado ou os pulmões.

A forma estrutural da proteína-alvo pode incluir uma conformação de folha beta ou uma conformação alfa-helicoidal. Em algumas modalidades, a forma estrutural da proteína-alvo é um monômero de proteína. Em outras modalidades, a forma estrutural da proteína-alvo é um oligômero solúvel de proteína. As formas estruturais também podem incluir auto-agregados insolúveis de proteína (por exemplo, auto-agregados amorfos insolúveis, protofibrilas, e fibrilas).

Por exemplo, no contexto de AD, sondas peptídicas podem ser usadas para identificar proteínas A β solúveis,

ADDLs, agregados insolúveis de proteína A β , protofibrilas e fibrilas presentes em uma amostra. A habilidade para identificar formas estruturais específicas da proteína A β oferece vantagens clínicas significativas. Por exemplo, a presença e a carga de proteína A β 42 e estruturas de ordem superior de A β (por exemplo, ADDLs, protofibrilas e fibrilas) podem ser usadas para identificar um paciente em risco para AD ou um paciente que sofre de AD e/ou a extensão até a qual a doença progrediu. As mesmas informações também poderiam ser usadas para determinar a necessidade de um regime terapêutico ou para um regime mais ou menos agressivo do que o que estiver sendo usado no momento, e para monitorar a eficácia de certo regime terapêutico.

Em uma modalidade, as sondas peptídicas são usadas para determinar a localização de proteína A β 42 ou de estruturas de ordem superior de A β no paciente. Por exemplo, amostras biológicas de segmentos específicos do cérebro podem ser obtidas e analisadas quanto à presença de proteína A β 42 ou estruturas de ordem superior de A β . Alternativamente, as sondas marcadas podem ser administradas ao paciente, por exemplo, por injeção local; permite-se que ela se localize em quaisquer locais de proteína A β 42 ou estruturas de ordem superior de A β presentes no paciente, e depois o paciente pode ser pesquisado para detectar os locais de sonda marcada localizados nos locais de proteína A β 42 ou estruturas de ordem superior de A β . Locais de interesse específicos podem incluir o hipocampo ou os lobos frontais do cérebro. Outros locais de interesse incluem tecido vascular, tecido

linfático e outros órgãos como, por exemplo, o coração, os rins, o fígado ou os pulmões.

Outro aspecto da invenção fornece um método para determinação das quantidades de A β 42 e/ou A β 40 em uma amostra, e a proporção de A β 42 para A β 40 em uma amostra. Como observado acima, a quantidade de A β 42 (ou "carga") circulante no plasma ou LCR do paciente está correlacionada com doenças como, por exemplo, AD e LLMD. Similarmente, uma proporção elevada de A β 42 para A β 40 é indicativa de um estado de doença. A presente invenção fornece métodos de determinação desses valores com o uso de sondas peptídicas que se ligam preferencialmente a A β 42 ou A β 40 e, dessa forma, podem ser usadas para quantificar a quantidade de A β 42 ou A β 40 presente em uma amostra. Testando-se uma amostra com cada tipo de sonda (simultânea ou seqüencialmente), as cargas absolutas e relativas podem ser determinadas. Essa informação pode ser usada, por exemplo, para identificar um paciente em risco para AD ou um paciente que sofre de AD e/ou a extensão até a qual a doença progrediu. As mesmas informações também poderiam ser usadas para determinar a necessidade de um regime terapêutico ou para um regime mais ou menos agressivo do que o que estiver sendo usado naquele momento, e para monitorar a eficácia de certo regime terapêutico. Informações similares poderiam ser obtidas por métodos *in vivo*, como discutido nos parágrafos anteriores.

Da mesma forma, no contexto de proteínas de príon, as sondas peptídicas podem ser usadas para identificar monômeros solúveis de PrP, agregados solúveis de PrP, agregados insolúveis de PrP, protofibrilas e/ou fibrilas

presentes em uma amostra ou *in vivo*. A habilidade para identificar formas estruturais específicas de PrP^{Sc} oferece vantagens clínicas significativas. Por exemplo, acredita-se que a forma de agregado solúvel de PrP^{Sc} seja a forma mais infecciosa; dessa forma, a identificação daquela forma de PrP^{Sc} pode ser usada para identificar um indivíduo infectado. As mesmas informações também poderiam ser usadas para determinar a necessidade de um regime terapêutico ou de um regime mais ou menos agressivo do que o que estiver sendo usado naquele momento, e para monitorar a eficácia de certo regime terapêutico.

Em uma modalidade, as sondas peptídicas são usadas para determinar a localização de proteína PrP^{Sc} ou estruturas de PrP^{Sc} de ordem superior (por exemplo, agregados solúveis) em um paciente. Por exemplo, amostras biológicas de segmentos específicos do cérebro podem ser obtidas e analisadas quanto à presença de proteína PrP^{Sc} ou estruturas de PrP^{Sc} de ordem superior. Alternativamente, as sondas marcadas podem ser administradas ao paciente, por exemplo, por injeção local, permite-se que ela se localize em quaisquer locais de proteína PrP^{Sc} ou estruturas de PrP^{Sc} de ordem superior presentes no paciente, e depois o paciente pode ser pesquisado para detectar os locais de sonda marcada localizados nos locais de proteína PrP^{Sc} ou estruturas de PrP^{Sc} de ordem superior.

Outro aspecto da invenção fornece um método para determinação das quantidades de PrP^{Sc} em uma amostra, ou da quantidade de uma forma específica de PrP^{Sc} em uma amostra. Como observado acima, a forma de agregado solúvel de PrP^{Sc} é altamente infecciosa. A presente invenção fornece métodos

de determinação da quantidade daquela forma de PrP^{Sc} presente em uma amostra, com o uso de sondas peptídicas que se ligam preferencialmente à forma de agregado solúvel de PrP. Aquelas informações podem ser usadas, por exemplo, para avaliar a carga infecciosa de um paciente e/ou a extensão até a qual a doença progrediu. As mesmas informações também poderiam ser usadas para determinar a necessidade de um regime terapêutico ou de um regime mais ou menos agressivo do que o que estiver sendo usado naquele momento, e para monitorar a eficácia de certo regime terapêutico. Informações similares poderiam ser obtidas por métodos *in vivo*, como discutido nos parágrafos anteriores.

A invenção também fornece métodos de identificação de sondas que são específicas para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico. Em algumas modalidades, a tendência de uma sonda para adotar um estado estrutural específico corresponde à especificidade da sonda por uma proteína-alvo naquele estado estrutural específico. Dessa forma, uma sonda com uma tendência elevada para formar auto-agregados insolúveis é específica para a proteína-alvo em um estado auto-agregado insolúvel; uma sonda com uma tendência para formar auto-agregados solúveis é específica para a proteína-alvo em um estado auto-agregado solúvel, e uma sonda sem tendência para formar agregados é específica para a proteína-alvo em um estado não agregado (por exemplo, um estado monomérico). Em algumas modalidades, a sonda pode exibir uma tendência baixa para formar auto-agregados. Por exemplo, a sonda pode incluir a seqüência de aminoácidos de uma variante de A β 42 que possui substituições de aminoácidos 141D e A42Q (ou seja, "o

mutante DQ").

Sondas específicas para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico que se enquadra em um espectro de estados estruturais que varia de um limite inferior de monômeros solúveis a um limite superior de auto-agregados insolúveis podem ser identificadas de acordo com a presente invenção como, por exemplo, por utilização do sistema GFP. Por exemplo, uma proteína de fusão que compreende: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo e (ii) GFP pode ser submetida às condições que promovem auto-agregação, e qualquer sinal fluorescente pode ser detectado. A intensidade do sinal pode ser correlacionada com a especificidade da sonda por uma proteína-alvo em um estado estrutural específico. Por exemplo, em algumas modalidades, um sinal de intensidade maior indica que a sonda possui uma tendência baixa para formar agregados e, dessa forma, é específica para uma proteína-alvo em uma extremidade inferior do espectro de estados estruturais, por exemplo, um monômero solúvel. Inversamente, em algumas modalidades, um sinal de intensidade menor indica que a sonda possui uma tendência maior para formar agregados e é específica para uma proteína-alvo em uma extremidade superior do espectro de estados estruturais como, por exemplo, um agregado insolúvel. Um sinal intermediário pode indicar que a sonda possui uma tendência intermediária para formar agregados e é específica para uma proteína-alvo em uma extremidade intermediária do espectro de estados estruturais como, por exemplo, um oligômero solúvel.

Sondas específicas para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico também podem ser identificadas por

preparação de amostras de proteína em diferentes estados estruturais específicos, e depois testando-se a habilidade de uma sonda peptídica para se ligar preferencialmente à proteína em um ou mais dos diferentes estados estruturais específicos. Por exemplo, uma sonda peptídica pode ser colocada em contato com uma amostra de uma proteína em um estado estrutural específico, e sua interação com a proteína avaliada usando, por exemplo, qualquer uma das metodologias descritas acima. Esse processo pode ser repetido com o uso de amostras de proteína em diferentes estados estruturais específicos, e os resultados podem ser comparados para determinar se a sonda peptídica se liga preferencialmente a uma proteína em um ou mais dos diferentes estados estruturais específicos.

F. Métodos de rastreamento para a identificação de agentes que modulam a agregação

As sondas aqui reveladas podem ser usadas na avaliação de métodos para a identificação de agentes que modulam a auto-agregação de uma proteína-alvo.

Por exemplo, para avaliar agentes que modulam a auto-agregação de uma proteína-alvo, é preparada uma proteína de fusão que compreende uma sonda peptídica para a proteína-alvo e um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína, por exemplo, GFP (em algumas modalidades, o marcador está ligado ao terminal C da sonda peptídica, diretamente ou por meio de um vinculador). Como discutido acima, no sistema GFP, a fluorescência da proteína de fusão está inversamente correlacionada com a tendência da sonda peptídica para formar auto-agregados insolúveis. Dessa forma, por exemplo, caso seja observado

que a proteína de fusão emite um sinal fluorescente, a sonda peptídica possuirá uma tendência baixa para formar auto-agregados insolúveis. Inversamente, caso seja observado que a proteína de fusão não emite um sinal fluorescente, a sonda peptídica possuirá uma tendência maior para formar auto-agregados insolúveis. Outros marcadores descritos acima podem ser usados no lugar de GFP. Aqueles habilitados na técnica reconhecem que alguns marcadores emitirão um sinal que está inversamente correlacionado com agregação, enquanto outros emitirão um sinal que está diretamente correlacionado com a agregação. Por conveniência, a invenção é descrita com referência ao sistema GFP.

Em algumas circunstâncias, pode ser desejável determinar a tendência relativa de uma sonda peptídica para formar agregados. Para essa finalidade, um sinal gerado por uma proteína de fusão de referência (por exemplo, que compreende GFP e uma sonda peptídica de referência) é comparado com um sinal gerado por uma proteína de fusão de teste (por exemplo, que compreende GFP e uma sonda peptídica de teste). No sistema GFP, um sinal de fluorescência crescente se correlaciona com uma tendência menor para formar agregados.

Em algumas modalidades, sondas peptídicas com uma tendência elevada para formar auto-agregados insolúveis são usadas no rastreamento de métodos para a identificação de agentes que modulam a auto-agregação de uma proteína-alvo. Em um aspecto dessa modalidade, a proteína de fusão de GFP (por exemplo, sonda peptídica-GFP) é clonada em um vetor para expressão indutível em uma célula hospedeira (por

exemplo, *E. coli*). A expressão é induzida em *E. coli* na presença de um agente de teste para inibição da auto-agregação da proteína-alvo. A fluorescência da proteína de fusão (em função da porção GFP) é medida, e a fluorescência na presença de um agente de teste identifica o agente de teste como um inibidor potencial da auto-agregação da proteína-alvo.

Em outro aspecto, o método de rastreamento compreende um ensaio *in vitro*. Por exemplo, uma proteína de fusão de GFP é clonada em um vetor para expressão "livre de células" da forma conhecida na técnica. A proteína de fusão é então expressa na presença de um agente de teste, e a fluorescência é medida. Novamente, a fluorescência na presença de um agente de teste identifica o agente de teste como um inibidor potencial da auto-agregação da proteína-alvo.

Em variações dessas modalidades, uma proteína de fusão de GFP é expressa na ausência do agente de teste e na presença do agente de teste, e um aumento em fluorescência identifica um agente de teste que inibe a agregação.

Em outras variações dessas modalidades, a proteína de fusão é expressa na presença da proteína de teste (e do agente de teste).

Agentes de teste adequados para os métodos de rastreamento podem incluir anticorpos, agentes quelantes, quelantes tridentatos de ferro, dicetonas, análogos de 2-piridoxal isonicotinil hidrazona, taquipiridina, clioquinol, quelantes inibidores da ribonucleotídeo redutase, ácido 2,3-diidroxibenzóico, Picolinaldeído, Nicotinaldeído, 2- Aminopiridina, 3-Aminopiridina, topical

2-furildioxima, ácido n-butírico, fenilbutirato, Tributirina, ácido suberoilanicida hidroxâmico, 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridinona, rilopirox, piroctona, quelantes relacionados ao ácido benzóico, ácido salicílico, nicotinamida, Clioquinol, sulfato de heparina, trimetilamina N-óxido, polietileno glicol (PEG), cátions de cobre, sulfóxido de dimetila, Dexrazoxano, dopamina, ácido tânico, triazina, levodopa, pergolida, bromocriptina, selegilina, glucosamina ou análogos desta, tetrapirróis, ácido nordiidroguaiarético, polifenóis, tetraciclina, ácido polivinilsulfônico, ácido 1,3-propanodissulfônico, peptídeo de degradação de folha β (iA β 5), nicotina, ou sais ou derivados destes.

Proteínas-alvo adequadas para métodos de rastreamento podem ser qualquer uma daquelas discutidas acima. Os métodos de rastreamento podem ser usados para identificar agentes que modulam a agregação de qualquer proteína-alvo que seja susceptível à auto-agregação, incluindo proteínas de prion e A β 42. Esses métodos também podem identificar agentes que se ligam à proteína-alvo. A ligação de um agente a um monômero da proteína-alvo evitará a auto-agregação da proteína-alvo. Similarmente, a ligação de um agente a um oligômero solúvel ou a um agregado insolúvel evitará agregação adicional e a formação de protofibrila e fibrila, enquanto a ligação de um agente a uma protofibrila ou fibrila evitará a extensão adicional daquela estrutura. Além de bloquear a agregação adicional, essa ligação também pode mudar o equilíbrio, retornando a um estado mais favorável para monômeros solúveis, impedindo ainda a progressão da doença e aliviando os sintomas da doença.

A ligação de proteína-alvo por um agente também pode interferir diretamente com uma atividade prejudicial exibida pela proteína-alvo.

Em uma modalidade específica, a atividade de um agente
5 de teste identificado como descrito acima é confirmada em um ensaio posterior. Por exemplo, uma forma solúvel da proteína-alvo ou uma sonda peptídica para a proteína-alvo é preparada com o uso de solventes orgânicos, sonificação e filtração (Bitan e cols., *Methods in Molec. Biol.*, pp. 3-9
10 (2005, Humana Press). Após preparação, a forma solúvel da proteína-alvo ou sonda é diluída em tampão aquoso que inclui um agente de teste identificado como descrito acima, e permite-se que a proteína-alvo ou sonda se agregue sob agitação ou sob repouso. A agregação é então medida por
15 qualquer um dos métodos descritos acima como, por exemplo, pela utilização de uma sonda marcada e detecção da formação de excímero ou CD, ou por outros métodos conhecidos na técnica como, por exemplo, por medida de fluorescência de Tioflavina T (Levine-III, H., *Protein Sci.* 2: 404-410
20 (1993) ou ligação de vermelho do Congo, para confirmar que um agente de teste inibe a agregação.

Em uma modalidade, a atividade de um agente de teste identificado como descrito acima com o uso de uma proteína de fusão de GFP-sonda peptídica é confirmada por avaliação
25 da fluorescência de uma proteína de fusão de GFP-proteína-alvo na presença do agente de teste.

A habilidade de um agente de teste para inibir a agregação também pode ser avaliada por observação da agregação de uma proteína-alvo (ou de uma sonda) na
30 presença do agente de teste sob microscopia eletrônica. Uma

diminuição dose-dependente da agregação confirma que o agente de teste inibe a agregação.

A invenção também fornece um rastreamento de fármaco mais personalizado, ou seja, por identificação de agentes ativos que interagem com estados estruturais específicos da proteína-alvo. Nessa modalidade, a habilidade de um agente de teste para interagir com uma sonda com uma tendência para formar um estado estrutural específico é usada para identificar agentes que interagem com proteína-alvo naquele estado estrutural específico. Por exemplo, sondas com uma tendência baixa para se auto-agregar podem ser usadas para identificar agentes ativos que se ligam aos monômeros da proteína-alvo; sondas com uma tendência para formar oligômeros solúveis (por exemplo, aquelas que mimetizam a estrutura de A β ADDLs) podem ser usadas para identificar agentes ativos que se ligam aos oligômeros solúveis; sondas com uma tendência para formar agregados insolúveis podem ser usadas para identificar agentes ativos que se ligam aos monômeros insolúveis da proteína-alvo. Em algumas modalidades, sondas com uma tendência baixa para auto-agregação podem ser usadas para identificar agentes ativos que se ligam à proteína-alvo em ensaios de competição. Por exemplo, quando a sonda e o agente ativo formarem um complexo, uma sonda adicional, que opcionalmente pode ser derivatizada, pode ser usada para competir com a sonda do complexo.

Em outra variação, agentes ativos que interagem com um estado estrutural específico da proteína-alvo são identificados por contato do agente ativo com uma amostra de proteína-alvo, separando-se porções dos complexos de

agente ativo-proteína-alvo de proteína-alvo que não está em complexo, e determinando-se o estado estrutural específico da proteína-alvo em complexo com o uso de sondas para estados estruturais específicos, como aqui descrito.

5 G. Agentes terapêuticos de teste

Qualquer agente que sabidamente ou com suspeita de inibir o estado estrutural específico associado a um estado de doença pode ser usado nos métodos de rastreamento para avaliar sua habilidade para modular a agregação e, dessa
10 forma, sua aptidão como um agente terapêutico. Por exemplo, agentes que sabidamente ou com suspeita de inibir a formação da conformação de folha β de uma proteína-alvo, de inibir a formação de oligômeros ou de auto-agregados amorfos insolúveis da proteína-alvo, ou de inibir a
15 formação de fibrilas, podem ser avaliados pelos presentes métodos para identificar agentes terapêuticos. Sondas peptídicas projetadas como descrito acima (com ou sem um marcador) também são adequadas como agentes de teste para avaliar sua provável utilidade como agentes terapêuticos.

20 Exemplos de agentes terapêuticos de teste incluem agentes que sabidamente ou com suspeita de possuírem atividade anti-amilóide ou atividade anti-amiloidogênica. Um "agente anti-amilóide" ou "agente anti-amiloidogênico" é um agente que, direta ou indiretamente, impede que
25 proteínas se agreguem e/ou formem placas amilóides ou depósitos, e/ou promove desagregação ou redução de placas amilóides ou de depósitos. Por exemplo, um agente anti-amilóide pode impedir que uma proteína assuma uma conformação que esteja envolvida na agregação e/ou formação
30 de oligômeros, fibrilas, placas amilóides etc. Dessa forma,

por exemplo, um agente anti-amilóide pode impedir que uma proteína assuma uma conformação de folha beta. Agentes anti-amilóide incluem proteínas como, por exemplo, anticorpos anti-amilóide e sondas peptídicas, e também
5 incluem pequenas moléculas químicas como, por exemplo, fármacos de pequena molécula.

1. Agentes anti-amilóide tradicionais

Agentes anti-amilóide incluem agentes quelantes (por exemplo, agentes quelantes para metais de transição como, por exemplo, cobre e ferro, como quelantes tridentatos de ferro), dicetonas (por exemplo, beta-dicetonas), análogos de 2-piridoxal isonicotinil hidrazona, taquipiridina, clioquinol, quelantes inibidores da ribonucleotídeo redutase, ácido 2,3-diidroxibenzóico, Picolinaldeído, Nicotinaldeído, 2-Aminopiridina, 3-Aminopiridina, topical 2-furildioxima, ácido n-butírico, fenilbutirato, Tributirina, ácido suberoilanolida hidroxâmico, 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridinona, rilopirox, piroctona, quelantes relacionados ao ácido benzóico, ácido
15 salicílico, nicotinamida, Clioquinol, sulfato de heparina, trimetilamina N-óxido (TMNO), polietileno glicol (PEG), cátions de cobre (por exemplo, Cu^{++}), sulfóxido de dimetila (DMSO), e Dexrazoxano.

Agentes anti-amilóide também incluem agentes
25 geralmente citados na técnica como "destruidores de amilóide" (*amyloid busters*) ou "destruidores de plaque". Esses incluem fármacos que são peptidomiméticos e interagem com fibrilas amilóides para, lentamente, dissolvê-las. O termo "peptidomimético" significa que uma biomolécula
30 simula a atividade de outra molécula do peptídeo

biologicamente ativo. Os termos "destruidor de amilóide" ou "destruidor de placas" também incluem agentes que absorvem co-fatores necessários para que as fibrilas amilóides permaneçam estáveis.

5 Agentes anti-amilóide também incluem dopamina, ácido tânico, triazina, levodopa, pergolida, bromocriptina, selegilina, glucosamina ou análogos desta (por exemplo, 4-desóxi-D-glucosamina ou 4-desóxi-acetilglucosamina), tetrapirróis, ácido nordiidroguaiarético (NDGA), polifenóis
10 (por exemplo, miricetina (Myr), morina (Mor), quercetina (Qur), kaempferol (Kmp), ($\pm$)-catequina (Cat), (-)-epicatequina (epi-Cat)), rifampicina (RIF), tetraciclina (TC), ácidos sulfônicos de pequena molécula (por exemplo, ácido polivinilsulfônico e ácido 1,3-propanodissulfônico),
15 sulfonatos e sulfatos de pequena molécula (por exemplo, etanossulfonato, 1-propanossulfonato, 1,2-etanodissulfonato, 1,3-propanodissulfonato, 1,4-butanodissulfonato, 1,5-propanodissulfonato, 1,6-hexanodissulfonato, poli(vinilsulfonato), 1,2-etanodiol
20 dissulfato, 1,3-propanodiol dissulfato e 1,4-butanodiol dissulfato), ciclohexanohexol (por exemplo, epi-ciclohexanohexol, cilo-ciclohexanohexol e mio-ciclohexanohexol), peptídeo de degradação de folha β (iA β 5), nicotina, ou sais, ácidos ou derivados destes.

25 Agentes anti-amilóide também podem incluir anticorpos, por exemplo, anticorpos específicos para a proteína-alvo, ou anticorpos específicos para um estado estrutural específico da proteína-alvo.

2. Sondas peptídicas como agentes anti-amilóide

30 Como observado acima, as sondas peptídicas da presente

invenção são úteis como agentes anti-amilóide na prevenção e tratamento de doenças amiloidogênicas como, por exemplo, AD, e na prevenção de estágios avançados de doenças amiloidogênicas. Como descrito acima, uma sonda peptídica
5 para certa proteína-alvo se liga especificamente àquela proteína, e pode se ligar preferencialmente a uma forma estrutural específica da proteína-alvo.

Embora sem se prender a uma teoria em particular, acredita-se que a ligação de proteína-alvo por uma sonda
10 peptídica evitará a formação de montagens de ordem superior da proteína-alvo, evitando ou tratando, dessa forma, a doença associada à proteína-alvo e/ou evitando a progressão adicional da doença. Por exemplo, a ligação de uma sonda peptídica a um monômero da proteína-alvo evitará a auto-
15 agregação da proteína-alvo. Similarmente, a ligação de uma sonda peptídica a um oligômero solúvel ou a um agregado insolúvel evitará a agregação e formação de protofibrila e fibrila adicionais, enquanto a ligação de uma sonda peptídica a uma protofibrila ou fibrila evitará a extensão
20 adicional daquela estrutura. Além de bloquear a agregação adicional, essa ligação também pode mudar o equilíbrio, retornando a um estado mais favorável aos monômeros solúveis, impedindo ainda mais a progressão da doença e aliviando os sintomas da doença.

25 A ligação de proteína-alvo por uma sonda peptídica também pode interferir diretamente com qualquer atividade prejudicial exibida pela proteína-alvo. Dessa forma, por exemplo, os efeitos neurotóxicos de ADDLs poderiam ser inibidos pela ação de ligação de uma sonda peptídica
30 específica para os ADDLs. Dessa forma, em uma modalidade, a

ligação por sondas peptídicas bloqueia a interação de ADDLs e protofibrilas com sinapses e membranas neuronais. Em algumas modalidades, quando a proteína-alvo se ligar à outra proteína (por exemplo, um receptor), as sondas peptídicas poderão ser projetadas para competir com a proteína-alvo pela ligação à outra proteína. Por exemplo, uma sonda peptídica pode ser projetada para competir por um receptor para a proteína-alvo, quando o receptor estiver presente em membranas neuronais ou membranas de células basais.

Em algumas modalidades, sondas peptídicas podem ser projetadas para se ligar às proteínas como, por exemplo, laminina, moléculas de adesão de células efetoras (ECAMS) (por exemplo, selectina) e glicosaminoglicanos (GAGS) (Veja U.S. 2006-0135529). Por exemplo, as sondas peptídicas podem ser projetadas para se ligar ao glicosaminoglicano (GAG) e inibir interações de GAG com moléculas de adesão de células efetoras (ECAM) como, por exemplo, selectina.

Dessa forma, em uma modalidade, é fornecido um método para evitar a formação de agregados protéicos de uma proteína-alvo, que compreende o contato da proteína-alvo com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de agregados protéicos de ordem superior da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente a um estado estrutural específico da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente aos monômeros da proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de agregados protéicos. Em outras modalidades, a

sonda peptídica se liga preferencialmente aos oligômeros solúveis da proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de agregados insolúveis protéicos. Em outras modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente a

5 agregados insolúveis da proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de fibrilas da proteína-alvo. Em modalidades específicas, a sonda peptídica se liga preferencialmente a agregados insolúveis como, por exemplo, auto-agregados amorfos, protofibrilas e fibrilas.

10 O contato pode ser efetuado por qualquer meio que resulte no contato da sonda peptídica com a proteína-alvo. Para métodos *in vivo*, para evitar a formação de agregados protéicos de uma proteína-alvo em um paciente, a sonda peptídica pode ser administrada ao paciente por qualquer

15 meio adequado, por exemplo, por injeção direta, por exemplo, em um local de proteína-alvo localizada ou em um local de interesse, por exemplo, aqueles descritos acima, ou por administração intranasal ou oral.

H. Agentes de direcionamento

20 As sondas peptídicas da invenção também são úteis como agentes de direcionamento para liberar outros agentes ativos (por exemplo, qualquer um dos agentes listados acima) às proteínas-alvo, por exemplo, às proteínas A β , ou a formas específicas de A β , por exemplo, A β 42, monômeros de

25 A β 42, ADDLs de A β 42, agregados insolúveis de A β 42, fibrilas etc. Nessa modalidade da invenção, uma sonda peptídica é combinada com em ou mais agentes ativos, por exemplo, por conjugação diretamente ou por meio de um vinculador, por métodos conhecidos na técnica. O agente ativo pode ser um

30 agente terapêutico ativo, como qualquer um daqueles

conhecidos na técnica e aqueles mencionados acima, ou ele pode ser um agente de detecção, como qualquer um daqueles conhecidos na técnica e aqueles descritos acima com relação aos marcadores de sonda peptídica. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se localiza na proteína-alvo presente em um local específico no paciente, por exemplo, um ou mais de tecido vascular, tecido linfático, cérebro ou outros órgãos, por exemplo, rins, fígado, coração ou pulmões, liberando, dessa forma, o agente terapêutico nesses locais específicos.

Dessa forma, em uma modalidade, é fornecido um método para o tratamento de uma doença associada a uma proteína-alvo, que compreende o contato da proteína-alvo com uma proteína de fusão que compreende: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo, e (ii) um agente terapêutico. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente a um estado estrutural específico da proteína-alvo. O contato pode ser efetuado por qualquer meio que resulte no contato da sonda peptídica com a proteína-alvo, como discutido acima, por exemplo, por injeção, por via intranasal ou oral.

Em algumas modalidades, a doença é doença de Alzheimer, a proteína-alvo é A β 42, A β 40, ou ambas, e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, quelantes de metais pesados e porções com carga. Em outras modalidades, a doença é TSE, a proteína-alvo é proteína de príon, e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, quelantes de metais pesados e porções com carga. Em outras

modalidades, a doença é amiloidose sistêmica senil ou polineuropatia amilóide familiar, a proteína-alvo é transtiretina, e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, quelantes de metais
5 pesados e porções com carga. Em algumas modalidades, a doença é doença de Huntington, a proteína-alvo é Huntingtina, e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga. Em outras modalidades, a doença é doença de
10 Parkinson, a proteína-alvo é alfa α -sinucleína e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga.

Também é fornecido um método de liberação de um agente terapêutico que compreende a combinação do agente
15 terapêutico com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, e a administração da combinação de sonda peptídica-agente terapêutico a um paciente que dela necessite. Em algumas modalidades, a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo
20 que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, mas não compreende a sequência de comprimento total
25 da proteína-alvo. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação. Em algumas modalidades, a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do
30 grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e

agregados insolúveis. Em algumas modalidades, o agente terapêutico possui atividade anti-amilóide. Em algumas modalidades, a sonda peptídica é combinada com o agente terapêutico via conjugação, diretamente ou por meio de um
5 vinculador.

Pacientes adequados para prevenção ou tratamento podem ser identificados por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, os pacientes podem ser identificados por detecção da proteína-alvo em amostras biológicas obtidas dos
10 pacientes ou por métodos *in vivo* descritos acima, por identificação de outros fatores de risco (por exemplo, uma mutação genética, apoE ou varredura por PET que mostre depósitos ou placas amilóides), ou por uma história familiar de doença amiloidogênica (incluindo AD e LLMD). Em
15 uma modalidade da invenção, as amostras de sangue são testadas quanto à presença de uma ou mais proteínas amilóides, por exemplo, A β 42, e pacientes com níveis elevados daquela proteína, ou com proporções A β 42 A β 40 elevadas, são selecionados para tratamento.

20 I. Controles

Em qualquer um dos métodos aqui revelados, podem ser processados controles (positivos, negativos ou ambos) para validar o ensaio. Controles positivos geralmente compreendem a realização dos métodos com amostras que
25 sabidamente compreendem pelo menos uma proteína-alvo (tipicamente de um tipo específico conhecido), e podem ser usados para confirmar que os métodos são capazes de detectar aquela proteína, e/ou que são específicos para aquela proteína em particular. Geralmente, um controle
30 positivo compreende uma amostra (em qualquer estágio do

procedimento) à qual é adicionada intencionalmente uma proteína-alvo conhecida, tipicamente em uma quantidade conhecida. Controles negativos geralmente compreendem a realização dos métodos com amostras que sabidamente não
5 contêm nenhuma proteína-alvo, e podem ser usados para confirmar que os métodos não estão fornecendo sistematicamente resultados falso-positivos. Outros controles podem ser processados em um ou mais estágios específicos nos métodos para verificar se aqueles estágios
10 estão funcionando da forma esperada. Aqueles habilitados na técnica conhecem controles adequados e podem projetá-los e implementá-los, sem experimentação desnecessária.

J. Amostras e espécimes

O termo "espécime de teste" é uma amostra de material
15 a ser testado e é equivalente, em termos de significado, e usado de forma intercambiável com o termo "amostra". A amostra pode ser preparada a partir de tecido (por exemplo, uma porção de carne moída, uma quantidade de tecido obtida por um procedimento de biópsia, sangue ou uma fração de
20 sangue, por exemplo, plasma) por homogeneização em um homogeneizador de vidro, ou pode ser usada diretamente da forma obtida. A quantidade de amostra pode ser qualquer quantidade adequada à aplicação na qual a amostra é usada. Por exemplo, caso seja usado sangue ou uma fração de
25 sangue, ela poderá ter cerca de 1 µl, cerca de 100 µl, cerca de 1 ml, cerca de 10 ml, cerca de 100 ml, cerca de um litro, ou mais. Em algumas aplicações, podem ser usados volumes maiores de sangue ou de produtos sangüíneos como uma amostra, incluindo quantidades acima de um litro.
30 Quando tecido solido for a fonte da amostra, a amostra

deverá ter entre cerca de 1 mg e 1 g, preferivelmente entre 10 mg e 250 mg, idealmente entre 20 e 100 mg.

Proteínas em amostras ou espécimes podem ser detectadas em forma agregada ou na presença de outros
5 constituintes celulares como, por exemplo, lipídeos, outras proteínas ou carboidratos. Uma preparação da amostra para análise pode ser homogeneizada ou submetida a uma ruptura similar de tecido ou estruturas agregadas, e restos celulares podem ser removidos por centrifugação. Esse
10 processo pode ser realizado na presença de uma solução salina tamponada e pode utilizar um entre vários detergentes como, por exemplo, SDS, Triton X-100 ou sarcosil. A concentração adicional da amostra pode ser obtida por tratamento com qualquer um entre vários agentes;
15 (por exemplo, fosfotungstata), o qual é empregado de acordo com o método de Safar e cols., *Nature Medicine* 4: 1.157-1.165, 1998.

Uma amostra pode ser obtida para teste e diagnóstico da seguinte forma. Uma amostra pode ser preparada a partir
20 de tecido (por exemplo, uma porção de carne moída, ou uma quantidade de tecido obtida por um procedimento de biópsia) por homogeneização em um homogeneizador de vidro ou por um pilão e almofariz na presença de nitrogênio líquido. A quantidade de material deve estar entre cerca de 1 mg e 1
25 gm, preferivelmente entre 10 mg e 250 mg, por exemplo, entre 20 mg e 100 mg. O material a ser coletado pode ser suspenso em um solvente adequado, preferivelmente solução salina tamponada com fosfato em um pH entre 7,0 e 7,8. A
adição de inibidores de RNase é opcional. O solvente pode
30 conter um detergente (por exemplo, Triton X-100, SDS,

sarcosil, dioxicolato, IgePal (NP40)). A homogeneização é realizada por diversas excursões do homogeneizador, preferivelmente entre 10 e 25 golpes; por exemplo, entre 15 e 20 golpes. A amostra suspensa é centrifugada
5 preferivelmente entre 100 e 1.000 x g por 5-10 minutos, e o material sobrenadante coletado para análise. Em algumas amostras, pode ser preferível tratar o material sobrenadante com um reagente adicional como, por exemplo, ácido fosfotúngstico, de acordo com o procedimento descrito
10 por Safar e cols., *Nature Medicine* 4: 1.157-1.165, 1998, e como modificado por Wadsworth, *The Lancet* 358: 171-180, 2001.

A quantidade de amostra a ser testada se baseia em uma determinação do teor de proteína da solução de
15 sobrenadante, como medido pelo procedimento descrito por Bradford (*Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976). Um método rápido e sensível para a determinação de quantidades de microgramas de proteína utiliza o princípio da ligação proteína-corante. De preferência, a quantidade de proteína
20 na amostra a ser testada está entre cerca de 0,5 mg e 2 mg de proteína.

Além do procedimento descrito acima para material de tecido, podem ser obtidas amostras de teste de soro, formulações farmacêuticas que possam conter produtos de
25 origem animal, líquido cefalorraquidiano, saliva, urina ou outros líquidos corpóreos. Amostras líquidas podem ser testadas diretamente, ou podem ser submetidas ao tratamento com agentes como, por exemplo, ácido fosfotúngstico, como descrito acima.

30 **K. Kits**

Podem ser preparados kits para a prática dos métodos aqui revelados. Tipicamente, os kits incluem pelo menos um componente ou uma combinação embalada de componentes para a prática de um método revelado. O termo "combinação embalada" significa que os kits fornecem uma embalagem única que contém uma combinação de um ou mais componentes, por exemplo, sondas, tampões, instruções, e semelhantes. Um kit contendo um recipiente único está incluído dentro da definição de "combinação embalada". Em algumas modalidades, os kits incluem pelo menos uma sonda. Por exemplo, os kits podem incluir uma sonda que é marcada com um fluoróforo ou uma sonda que é um membro de uma proteína de fusão. No kit, a sonda pode estar imobilizada, e pode ser imobilizada em uma conformação específica. Por exemplo, uma sonda imobilizada pode ser fornecida em um kit para se ligar especificamente à proteína-alvo, para detectar proteína-alvo em uma amostra e/ou para remover proteína-alvo de uma amostra.

Os kits podem incluir alguns ou todos os componentes necessários para a prática de um método aqui revelado. Tipicamente, os kits incluem pelo menos uma sonda, opcionalmente imobilizada, em pelo menos um recipiente. Os kits podem incluir múltiplas sondas, opcionalmente imobilizada, em um ou mais recipientes. Por exemplo, as múltiplas sondas podem estar presentes em um único recipiente ou em recipientes separados, cada um contendo uma sonda única.

Em certas modalidades, uma sonda única (incluindo múltiplas cópias da mesma sonda) é imobilizada em um único suporte sólido e fornecida em um único recipiente. Em

outras modalidades, duas ou mais sondas, cada uma específica para uma proteína-alvo diferente ou para uma forma diferente de uma única proteína-alvo, são fornecidas em um único recipiente. Em algumas modalidades, a mesma sonda imobilizada é fornecida em múltiplos recipientes diferentes (por exemplo, em forma de uso único), ou múltiplas sondas imobilizadas são fornecidas em múltiplos recipientes diferentes. Em modalidades adicionais, as sondas são imobilizadas em múltiplos tipos diferentes de suportes sólidos. Qualquer combinação de sonda(s) imobilizada(s) e recipiente(s) é contemplada para os kits aqui revelados, e o profissional é livre para selecionar entre as várias combinações para obter um kit adequado para certo uso desejado.

Um recipiente dos kits pode ser qualquer recipiente que seja adequado para embalar e/ou conter as sondas aqui reveladas. Materiais adequados incluem, sem limitação, vidro, plástico, papelão ou outro produto de papel, e metal. O recipiente pode abrigar completamente as sondas imobilizadas, ou pode simplesmente cobrir a sonda para minimizar a contaminação por poeira, óleos etc. Os kits podem compreender um único recipiente ou vários recipientes e, quando estiverem presentes vários recipientes, cada recipiente poderá ser igual aos outros recipientes, diferentes dos outros ou diferentes de alguns, mas não de todos os outros recipientes.

Os próprios kits podem ser feitos de qualquer material adequado. Exemplos não limitantes de materiais de kit são papelão ou outro produto de papel, plástico, vidro e metal.

Os kits podem compreender alguns ou todos os reagentes

e suprimentos necessários à imobilização de uma ou mais sondas ao suporte sólido, ou alguns ou todos os reagentes e suprimentos necessários para a ligação de sondas imobilizadas às proteínas de príon em uma amostra.

5 Os kits aqui revelados podem incluir uma ou mais sondas não imobilizadas e um ou mais suportes sólidos que incluam ou não uma sonda imobilizada. Tais kits podem compreender alguns ou todos os reagentes e suprimentos necessários para a imobilização de uma ou mais sondas ao
10 suporte sólido, ou alguns ou todos os reagentes e suprimentos necessários para a ligação de sondas imobilizadas às proteínas de príon em uma amostra.

MODALIDADES EXEMPLARES

A seguir, será apresentada uma lista de modalidades
15 exemplares:

1. Uma proteína de fusão que compreende:

(a) uma sonda peptídica para uma proteína-alvo, em que: (i) a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo
20 que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (ii) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (iii) a sonda peptídica não compreende a sequência
25 de comprimento total da proteína-alvo; e

(b) proteína fluorescente verde (GFP).

2. A proteína de fusão da modalidade 1, que compreende ainda um vinculador polipeptídico que liga a sonda peptídica e o polipeptídeo GFP.

30 3. A proteína de fusão da modalidade 1, em que a

proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína amilóide beta ou peptídeo A β , amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos de microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

4. A proteína de fusão da modalidade 3, em que a proteína-alvo é uma proteína de prion.

5. A proteína de fusão da modalidade 4, em que a proteína de prion é PrP^C, PrP^{Sc}, ou uma mistura destes.

6. A proteína de fusão da modalidade 4, em que a sonda peptídica compreende o ID. DE SEQ. N°: 13 ou uma seqüência que possui pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 13.

7. A proteína de fusão da modalidade 3, em que a proteína-alvo é proteína amilóide beta.

8. A proteína de fusão da modalidade 7, em que a proteína amilóide beta é A β 42, A β 40, ou uma mistura destes.

9. A proteína de fusão da modalidade 7, em que a sonda peptídica compreende a seqüência do ID. DE SEQ. N°: 32, a seqüência do ID. DE SEQ. N°: 4, ou uma seqüência que possui

pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 32 ou ID. DE SEQ. N°: 4.

10. A proteína de fusão da modalidade 3, em que a proteína-alvo é proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota.

11. A proteína de fusão da modalidade 10, em que a sonda peptídica compreende a seqüência do ID. DE SEQ. N°: 11 ou uma seqüência que possui pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 11.

10 12. A proteína de fusão da modalidade 3, em que a proteína-alvo é proteína transtiretina.

13. A proteína de fusão da modalidade 12, em que a sonda peptídica compreende a seqüência do ID. DE SEQ. N°: 26 ou uma seqüência que possui pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 26.

14. A proteína de fusão da modalidade 3, em que a proteína-alvo é proteína cistatina C.

15. A proteína de fusão da modalidade 14, em que a sonda peptídica compreende a seqüência do ID. DE SEQ. N°: 17 ou uma seqüência que possui pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 17.

16. A proteína de fusão da modalidade 3, em que a proteína-alvo é proteína da doença de Huntington.

17. A proteína de fusão da modalidade 15, em que a sonda peptídica compreende a seqüência do ID. DE SEQ. N°: 19 ou uma seqüência que possui pelo menos cerca de 90% de identidade de seqüência para o ID. DE SEQ. N°: 19.

18. A proteína de fusão da modalidade 1, em que a referida proteína de fusão emite um sinal fluorescente quando a sonda peptídica estiver em uma conformação alfa-

helicoidal.

19. A proteína de fusão da modalidade 1, em que a referida proteína de fusão não emite um sinal fluorescente quando a sonda peptídica estiver em uma conformação de
5 folha beta.

20. A proteína de fusão da modalidade 1, em que a sonda peptídica está em uma conformação alfa-helicoidal, quando presente em uma solução de SDS 1,0% que possui um pH de cerca de 7.

10 21. A proteína de fusão da modalidade 1, em que a sonda peptídica está em uma conformação de folha beta, quando presente em uma solução que possui um pH de cerca de 4,5.

15 22. A proteína de fusão da modalidade 1, em que a proteína de fusão é imobilizada em um suporte sólido.

23. A proteína de fusão da modalidade 22, em que a proteína de fusão ainda compreende uma porção de avidina, e está acoplada ao suporte sólido por meio de uma porção de biotina.

20 24. Um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende:

(A) o contato de uma proteína de fusão e de um agente de teste, a proteína de fusão compreendendo:

25 (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:
(a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a
30 sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma

conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a sequência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

(B) a detecção de um sinal gerado pelo marcador; e

(C) a correlação do sinal com a capacidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

25. O método de modalidade 24, em que uma diminuição do sinal está relacionada à habilidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

26. O método de modalidade 24, em que um aumento do sinal está relacionado à habilidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

27. O método de modalidade 24, em que a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína amilóide beta ou peptídeo ABETA, amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos de microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

28. O método de modalidade 24, em que o agente de

teste é um agente quelante.

29. O método de modalidade 24, em que o agente de teste é selecionado do grupo de quelantes tridentatos de ferro, dicetonas, análogos de 2-piridoxal isonicotinil hidrazona, taquipiridina, clioquinol, quelantes inibidores da ribonucleotídeo redutase, ácido 2,3-diidroxibenzóico, Picolinaldeído, Nicotinaldeído, 2-Aminopiridina, 3-Aminopiridina, topical 2-furildioxima, ácido n-butírico, fenilbutirato, Tributirina, ácido suberoilanelida hidroxâmico, 6-ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridinona, rilopirox, piroctona, quelantes relacionados ao ácido benzóico, ácido salicílico, nicotinamida, sulfato de heparina, trimetilamina N-óxido, polietileno glicol (PEG), cátions de cobre, sulfóxido de dimetila, Dexrazoxano, dopamina, ácido tânico, triazina, levodopa, pergolida, bromocriptina, selegilina, glucosamina ou análogos desta, tetrapirróis, ácido nordiidroguaiarético, polifenóis, tetraciclina, ácido polivinilsulfônico, ácido 1,3-propanodissulfônico, peptídeo de degradação de folha β (iA β 5), nicotina, ou sais ou derivados destes.

30. O método de modalidade 24, em que o marcador compreende um fluoróforo.

31. O método de modalidade 24, em que o fluoróforo compreende pireno ou triptofano.

32. O método de modalidade 24, em que o marcador compreende um polipeptídeo fluorescente.

33. O método de modalidade 32, em que o polipeptídeo fluorescente compreende proteína fluorescente verde (GFP).

34. O método de modalidade 24, em que o marcador compreende um radionuclídeo.

35. O método de modalidade 24, em que a proteína de fusão é imobilizada em um suporte sólido.

36. O método de modalidade 24, em que a proteína de fusão ainda compreende uma porção de avidina, e está
5 acoplada ao suporte sólido por meio de uma porção de biotina.

37. O método de modalidade 24, que compreende ainda, antes da etapa de detecção (b), a submissão da sonda peptídica às condições que promovem agregação, em que a
10 intensidade do sinal está diretamente relacionada à habilidade do agente para inibir a agregação.

38. Um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende:

15 (A) o contato da proteína-alvo, uma proteína de fusão, e um agente de teste, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:
(a) a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo
20 que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a sequência de
25 comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

(B) a detecção de um sinal gerado pelo marcador; e

(C) a correlação do sinal com a capacidade do agente
30 para inibir a agregação da proteína-alvo.

39. O método de modalidade 38, em que o sinal está diretamente correlacionado com a habilidade do agente para inibir a agregação.

40. O método de modalidade 38, em que o sinal está
5 inversamente correlacionado com a habilidade do agente para inibir a agregação.

41. Um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende:

10 (A) a submissão de uma proteína de fusão às condições que promovem agregação, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:
(a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo
15 que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de
20 comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

(B) a detecção de um primeiro sinal gerado pelo marcador;

25 (C) a submissão da proteína de fusão às condições que promovem agregação na presença de um agente de teste, e a detecção de um segundo sinal gerado pelo marcador; e

(D) a avaliação das intensidades relativas do primeiro e segundo sinais, identificando, dessa forma, um agente que
30 inibe a agregação da proteína-alvo.

42. O método de modalidade 41, em que uma intensidade maior do segundo sinal, comparada com a do primeiro sinal, identifica um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

5 43. O método de modalidade 41, em que uma intensidade maior do primeiro sinal, comparada com a do segundo sinal, identifica um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

10 44. Um método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, que compreende:

(A) o contato de uma proteína de fusão e da proteína-alvo, em que a proteína de fusão compreende:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:

15 (a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma
20 conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

25 (B) a detecção de um primeiro sinal gerado pelo marcador;

(C) o contato da proteína de fusão, da proteína-alvo e de um agente de teste, e a detecção de um segundo sinal gerado pelo marcador; e

30 (D) a avaliação das intensidades relativas do primeiro

e segundo sinais, identificando, dessa forma, um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

45. O método de modalidade 44, em que uma intensidade maior do segundo sinal, comparada com a do primeiro sinal, identifica um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

46. O método de modalidade 44, em que uma intensidade maior do primeiro sinal, comparada com a do segundo sinal, identifica um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

47. Um método para a identificação de uma proteína-alvo presente em uma forma estrutural específica em uma amostra, que compreende:

(a) o contato da amostra com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente a uma forma estrutural específica da proteína-alvo;

(b) a detecção de qualquer ligação entre a sonda peptídica e qualquer proteína-alvo presente na forma estrutural específica.

48. O método de modalidade 47, em que a forma estrutural da proteína-alvo é uma conformação de folha beta.

49. O método de modalidade 47, em que a forma estrutural da proteína-alvo é uma conformação alfa-helicoidal.

50. O método de modalidade 47, em que a forma estrutural da proteína-alvo é um monômero da proteína.

51. O método de modalidade 47, em que a forma estrutural da proteína-alvo é um oligômero solúvel da

proteína.

52. O método de modalidade 47, em que a forma estrutural da proteína-alvo é um auto-agregado insolúvel da proteína.

5 53. O método de modalidade 52, em que a forma estrutural da proteína-alvo é selecionada de auto-agregados amorfos insolúveis, protofibrilas e fibrilas.

54. O método de modalidade 47, em que proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do
10 polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína beta ou peptídeo A β amilóide, amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos de microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas,
15 tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da
20 doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

55. O método de modalidade 47, em que a sonda peptídica ainda compreende um marcador de fluoróforo.

25 56. O método de modalidade 55, em que o fluoróforo compreende pireno ou triptofano.

57. O método de modalidade 47, em que a sonda peptídica ainda compreende um marcador de polipeptídeo fluorescente.

30 58. O método de modalidade 57, em que o marcador de

polipeptídeo fluorescente compreende proteína fluorescente verde (GFP).

59. O método de modalidade 47, em que a sonda peptídica ainda compreende um marcador de radionuclídeo.

5 60. O método de modalidade 47, em que a sonda peptídica é imobilizada em um suporte sólido.

61. O método de modalidade 60, em que a sonda peptídica ainda compreende uma porção de avidina, e está acoplada ao suporte sólido por meio de uma porção de biotina.

62. Um método de identificação de uma sonda peptídica para uma proteína-alvo que exibe uma tendência aumentada ou diminuída para formar agregados em relação a uma sonda peptídica de referência, que compreende:

15 (A) a detecção de um primeiro sinal gerado por uma proteína de fusão de referência que compreende:

(i) a sonda peptídica de referência que compreende:
(a) uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) em que a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica de referência não compreende a sequência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) proteína fluorescente verde;

(B) a detecção de um segundo sinal gerado por uma proteína de fusão de teste que compreende uma sonda peptídica de teste e proteína fluorescente verde, em que a sonda peptídica de teste é um mutante da sonda peptídica de

referência que compreende uma inserção, eliminação ou substituição de aminoácidos em relação à seqüência de aminoácidos da sonda peptídica de referência; e

(C) a correlação da intensidade do segundo sinal em
5 relação ao primeiro sinal, identificando, dessa forma, uma sonda peptídica para uma proteína-alvo que exibe uma tendência aumentada ou diminuída para formar agregados em relação à sonda peptídica de referência.

63. O método de modalidade 62, em que uma intensidade
10 aumentada do segundo sinal em relação à intensidade do primeiro sinal indica uma tendência diminuída da sonda peptídica de teste para formar agregados, e uma intensidade diminuída do segundo sinal em relação à intensidade do primeiro sinal sonda indica uma tendência aumentada da
15 sonda peptídica de teste para formar agregados.

64. O método de modalidade 62, em que uma intensidade
diminuída do segundo sinal em relação à intensidade do primeiro sinal indica uma tendência diminuída da sonda peptídica de teste para formar agregados, e uma intensidade
20 aumentada do segundo sinal em relação à intensidade do primeiro sinal indica uma tendência aumentada da sonda peptídica de teste para formar agregados.

65. O método de modalidade 62, em que a sonda
peptídica de teste possui pelo menos cerca de 15% de
25 identidade de seqüência para a sonda peptídica de referência.

66. O método de modalidade 62, em que a sonda
peptídica de teste é projetada por um processo que
compreende a introdução de uma mutação aleatória da
30 seqüência na seqüência de aminoácidos da sonda peptídica de

referência.

67. Um método de identificação de uma sonda peptídica específica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico que se enquadra em um espectro de estados estruturais que varia de um limite inferior de monômeros solúveis a um limite superior de auto-agregados insolúveis, que compreende:

(A) a submissão de uma proteína de fusão às condições que promovem auto-agregação, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que: (a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) proteína fluorescente verde;

(B) a detecção de um sinal gerado pela proteína de fusão; e

(C) a correlação da intensidade do sinal com a especificidade da sonda peptídica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico, identificando, dessa forma, uma sonda peptídica específica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico.

68. O método de modalidade 67, em que um sinal de intensidade maior indica que a sonda peptídica é específica para uma proteína-alvo em uma extremidade inferior do

espectro de estados estruturais, e um sinal de intensidade menor indica que a sonda peptídica é específica para uma proteína-alvo em uma extremidade superior do espectro de estados estruturais.

5 69. O método de modalidade 67, em que um sinal de intensidade menor indica que a sonda peptídica é específica para uma proteína-alvo em uma extremidade inferior do espectro de estados estruturais, e um sinal de intensidade maior indica que a sonda peptídica é específica para uma
10 proteína-alvo em uma extremidade superior do espectro de estados estruturais.

70. Um método para evitar a formação de agregados protéicos de uma proteína-alvo, que compreende o contato da proteína-alvo com uma sonda peptídica para a proteína-alvo,
15 em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de agregados protéicos de ordem superior da proteína-alvo.

71. O método de modalidade 70, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente aos monômeros da
20 proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de agregados protéicos.

72. O método de modalidade 70, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente aos oligômeros solúveis da proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de
25 agregados insolúveis protéicos.

73. O método de modalidade 70, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente a agregados insolúveis da proteína-alvo, evitando, dessa forma, a formação de fibrilas da proteína-alvo.

30 74. O método de modalidade 73, em que os agregados

insolúveis protéicos compreendem um ou mais de auto-agregados amorfos, protofibrilas e fibrilas.

75. Um método para o tratamento de uma doença associada a uma proteína-alvo, que compreende o contato da
5 proteína-alvo com uma proteína de fusão que compreende: (i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo, e (ii) um agente terapêutico.

76. O método de modalidade 75, em que a doença é
10 doença de Alzheimer, a proteína-alvo é A β 42, A β 40, ou ambos, e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga.

77. O método de modalidade 75, em que a doença é TSE,
15 a proteína-alvo é proteína de príon e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga.

78. O método de modalidade 75, em que a doença é amiloidose sistêmica senil ou polineuropatia amilóide
20 familiar, a proteína-alvo é transtiretina e o agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga.

79. O método de modalidade 75, em que a doença é doença de Huntington, a proteína-alvo é Huntingtina e o
25 agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga.

80. O método de modalidade 75, em que a doença é doença de Parkinson, a proteína-alvo é α -sinucleína e o
30 agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em quelantes de metais pesados e porções com carga.

81. Uma composição terapêutica que compreende:

(a) uma sonda peptídica para uma proteína-alvo, em que: (i) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, (ii) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e (iii) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

(b) um excipiente farmacêutico.

82. A composição da modalidade 81, que compreende ainda um agente terapêutico adicional.

83. A composição da modalidade 82, em que o agente terapêutico adicional possui atividade anti-amilóide.

84. Um método de liberação de um agente terapêutico para a prevenção da agregação de uma proteína-alvo que compreende uma combinação do agente terapêutico com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta, e a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação de folha beta e em que a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo.

85. O método de modalidade 84, em que o agente terapêutico possui atividade anti-amilóide.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são ilustrativos e não devem ser interpretados como limitantes da presente especificação.

Exemplo 1: Construção de proteínas de fusão de GFP-sonda peptídica

5 Um oligonucleotídeo de dsDNA que codifica uma sonda peptídica para proteína de prion humana ou A β 42 é sintetizado. O oligonucleotídeo de dsDNA inclui sítios de restrição nas extremidades 5' e 3' para clonagem do oligonucleotídeo de dsDNA em um vetor de expressão de GFP
10 (veja Waldo e cols., *Nature Biotechnol.* 17: 691-695 (1999)). Um oligonucleotídeo de dsDNA e um vetor de expressão de GFP são digeridos com as enzimas de restrição correspondentes, e o oligonucleotídeo de dsDNA é ligado no vetor de expressão de GFP para criar uma proteína de fusão
15 de GFP-vetor de expressão. O vetor de expressão é usado para transformar *E. coli* que cresceu sob seleção com canamicina. Para uma variante GFP-sonda peptídica em particular, é criada uma proteína de fusão de GFP-vetor de expressão que inclui um A β 42 mutante de comprimento total
20 que possui substituições 141D e A42Q (ou seja, "o mutante DQ"), cujo mutante passa por agregação lenta.

Exemplo 2: Rastreamento da expressão de proteína de fusão de GFP

Bibliotecas de DNA são isoladas da cepa de *E. coli*
25 transformada, e transformadas em outra cepa adequada para expressão de proteína indutível por IPTG. As bactérias transformadas são plaqueadas em papel de nitrocelulose. Após crescimento de um dia para o outro a 37°C, os papéis de nitrocelulose são transferidos para placas de LB que
30 incluem canamicina para seleção e IPTG (1 mM) para indução

de expressão. As colônias são contadas e o fenótipo verde versus branco é observado, com o fenótipo verde correspondendo à proteína de fusão solúvel (por exemplo, sonda peptídica não agregada) e o fenótipo branco correspondendo à proteína de fusão insolúvel (por exemplo, sonda peptídica agregada).

Exemplo 3: Medida da fluorescência de GFP

Colônias são retiradas e desenvolvidas em meios líquidos LB contendo canamicina. Após as culturas alcançarem uma absorbância (A_{600nm}) de 0,8, a expressão é induzida por adição de IPTG até uma concentração de 1 mM, e o crescimento é continuado a 37°C ou a 30°C. Após indução, as culturas são diluídas em solução salina tamponada com Tris até uma A_{600nm} de 0,15. A fluorescência é medida com o uso de um espectrofluorômetro com excitação a 490 nm e emissão a 510 nm. A **Fig. 4** fornece resultados exemplares da medida de fluorescência de GFP da fusão de sonda peptídica de Alzheimer-GFP (Alz) e fusão de sonda peptídica de Príon-GFP (Pri). As medidas são feitas após indução de expressão e incubação das células por 3 horas a 37°C (gráfico da esquerda) ou 5 horas a 30°C (gráfico da direita). A expressão de GFP-proteínas de fusão também é avaliada por remoção de 200 µl de cultura de células e análise do teor de células inteiras por SDS-PAGE.

Exemplo 4: Avaliação da fluorescência de GFP para inibidores da agregação de príon

Uma proteína de fusão de GFP-sonda peptídica que sabidamente gera um fenótipo branco no ensaio descrito acima (por exemplo, para formar agregados) é usada para identificar agentes que inibem a agregação. O vetor para a

expressão de uma proteína de fusão de GFP-sonda peptídica (príon) é transformado em células bacterianas para expressão indutível por IPTG. As bactérias transformadas cresceram em meios LB suplementados com canamicina para
5 seleção. Quando as culturas alcançam uma $OD_{600} = 0,8$, uma alíquota de cultura (100 μ l) é transferida para um poço de uma placa multipoços. Os agentes de teste são adicionados a cada poço, e a expressão de proteína é induzida por adição de IPTG até uma concentração final de 1 mM. As amostras são
10 incubadas com agitação suave a 37°C. Após 3 horas de incubação, a fluorescência de cada poço é medida a 512 nm (excitação 490 nm) usando uma leitora de placas automatizada. Para confirmar que as densidades celulares são consistentes em todas as amostras, a OD_{600} também é
15 medida. Os agentes de teste são testados em várias concentrações. Os agentes de teste que geraram um fenótipo verde são identificados como agentes que inibem a agregação.

Exemplo 5: Identificação de sonda peptídica específica para
20 **PrP^{Sc} infeccioso**

Uma sonda peptídica específica para uma forma altamente infecciosa de PrP^{Sc} é identificada da seguinte forma:

São preparadas amostras de proteína PrP^{Sc} em
25 diferentes estados agregados, por exemplo, pelos métodos descritos em Silveira e cols., *Nature* 437: 257-61 (2005). Resumidamente, uma preparação de proteína PrP^{Sc} purificada (por exemplo, de cérebro de hamster infectado por scrapie) é submetida ao tratamento com, por exemplo, detergentes
30 e/ou sonificação, e depois fracionada por tamanho (usando,

por exemplo, fracionamento campo de fluxo-fracionamento de fluxo, ou "FlFFF") em diversas frações (por exemplo, as trinta frações relatadas em Silveira) para a obtenção de amostras de proteína de príon em diferentes estados
5 agregados. Opcionalmente, uma preparação paralela da amostra é realizada usando amostras equivalentes de cérebro normal.

Sonda peptídica marcada com pireno específica para proteína PrP^{Sc} é colocada em contato com cada amostra, e
10 sua interação com qualquer PrP^{Sc} presente na amostra é avaliada. Como discutido acima, a interação de sondas peptídicas marcadas com pireno com PrP^{Sc} pode ser avaliada com o uso de fluorescência em estado estável. A interação entre marcadores de pireno observada quando as sondas
15 peptídicas marcadas interagem com PrP^{Sc} leva à formação de dímeros e/ou excímeros fluorescentes. Dessa forma, a proporção característica da intensidade fluorescente associada aos dímeros de pireno (I_D , medida a 495 nm) para aquela de monômeros de pireno (I_M , medida a 378 nm) pode
20 ser usada para avaliar a interação entre as sondas marcadas e qualquer PrP^{Sc} presente na amostra, com uma I_D/I_M maior estando relacionada a uma reatividade maior (a Fig. 5 ilustra a fluorescência característica de monômeros de sonda peptídica marcada com pireno e dímeros).

25 A Fig. 6 ilustra a reatividade de uma sonda peptídica específica para proteína PrP^{Sc} com PrP^{Sc} presente em cada uma das trinta frações obtidas como descrito acima (o eixo y mostra as proporções I_D/I_M relativas; o tamanho dos agregados de PrP^{Sc} presentes em cada fração aumenta ao
30 longo do eixo x). A sonda peptídica possuía a seguinte

seqüência de aminoácidos:

VVAGAAAAGAVHKMNTKPKMKHVAGAAAAGAVV (ID. DE SEQ. N°: 43).

Esses dados indicam que essa sonda interage preferencialmente com PrP^{Sc} presente nas frações 3, 16, 10-
5 12, 23 e 29 (de acordo com Silveira e cols., *supra*, a forma mais infecciosa de PrP^{Sc} é encontrada na fração 12). Pelo menos duas tendências são evidentes a partir desses dados, a significância potencial das quais são ressaltadas abaixo.

Em primeiro lugar, a sonda peptídica reage com
10 agregados de PrP^{Sc} menores em relação aos agregados de PrP^{Sc} maiores. A reatividade da sonda peptídica com agregados PrP^{Sc} menores pode oferecer significância clínica porque, por exemplo, a técnica estabelecida indica que as formas de PrP^{Sc} mais infecciosas são formas de agregados menores, e
15 não agregados ou fibrilas maiores.

Em segundo lugar, a reatividade da sonda peptídica com as partículas fracionadas é periódica, e não linear, com a maior sensibilidade por µg de PrP^{Sc} observada com frações que correspondem aos agregados de PrP^{Sc} que variam de <30
20 kD até 1.000 kD. Essa periodicidade pode refletir uma montagem estrutural hierárquica de unidades oligoméricas PrP^{Sc} que atuam como substratos únicos para a sonda peptídica. A periodicidade também ressalta a significância potencial da habilidade para o design de sondas peptídicas
25 que se ligam preferencialmente ao PrP^{Sc} em diferentes estados estruturais, para o direcionamento de estruturas infecciosas de PrP^{Sc} através de espécies, por exemplo, para detectar espécies variantes que são de importância clinicamente particular com fontes zoonóticas de PrP se em
30 seres humanos.

A ligação preferencial da sonda peptídica com agregados de PrP^{Sc} menores em relação aos agregados de PrP^{Sc} maiores pode ainda ser demonstrada com experimentos de sonificação. Por exemplo, foi demonstrado que amostras não fracionadas de homogeneizados de cérebro de hamster infectado que exibem pouca ou nenhuma reatividade com a sonda peptídica exibem reatividade aumentada após serem submetidas à sonificação. A reatividade aumenta com o tempo de sonificação, com reatividade aumentada observada após 5 a 10 minutos de sonificação. Como a sonificação quebra os agregados de PrP^{Sc} presentes nas amostras extraídas em agregados de PrP^{Sc} menores, esses resultados podem indicar que a sonda peptídica está reagindo diretamente com um novo pool de estruturas oligoméricas de PrP^{Sc} menores geradas por sonificação. Adicional ou alternativamente, a sonificação pode estar conduzindo a reorganização dos agregados de PrP^{Sc} em diferentes estados estruturais (por exemplo, diferentes estados conformacionais) que são mais reativos com a sonda peptídica. Novamente, a reatividade da sonda peptídica com agregados de PrP^{Sc} menores pode apresentar significância clínica, como discutido acima.

Exemplo 6: Detecção de PrP^{Sc} em sangue de carneiros

Uma sonda peptídica específica para PrP^{Sc} (ID. DE SEQ. N°: 43) é usada para detectar PrP^{Sc} em sangue de carneiros da seguinte forma: sonda peptídica marcada com pireno é colocada em contato com amostras preparadas a partir de soros obtidos de carneiros com scrapie, carneiros terminais e carneiros normais, e a fluorescência resultante é medida da forma descrita acima (as amostras são preparadas como descrito em Grosset e cols., *Peptides* 26: 2.193-200 (2005),

adotando o método de preparação de tecido para soro). A **Fig. 7** ilustra que a sonda peptídica reagiu com PrP^{Sc} em soros de carneiros infectados, e não reagiu com soros de carneiros normais. Na Figura, "HP 1" designa uma amostra de pool de soros de carneiros saudáveis com 3 meses de idade; "HP 2" designa uma amostra de pool de soros de carneiros saudáveis com 2 anos de idade; "ln1" a "ln4" designam soro de carneiros com scrapie com 18-24 meses de idade, e "ln5" designa soro de um carneiro terminal. Esses dados demonstram que a sonda peptídica exibiu 100% de sensibilidade e especificidade nesse ensaio, e detectou com precisão PrP^{Sc} no sangue de carneiros.

Em outro ensaio, as amostras de sangue de carneiros descritas acima foram sonificadas, antes da reação com a sonda peptídica. A **Fig. 8** ilustra que a sonificação aumentou a proporção sinal/ruído por redução no nível de fundo nas amostras "normais". A **Fig. 8** também ilustra uma melhor distinção de amostras infectadas com o pool normal com idades equivalentes (HP 2) de animais com 2 anos de idade versus o pool de animais com 3 meses de idade.

Exemplo 7: Detecção de PrP^{Sc} na camada de células brancas, soro e plasma de carneiros

Uma sonda peptídica específica para PrP^{Sc} (ID. DE SEQ. N°: 43) é usada para detectar PrP^{Sc} nos componentes sangüíneos de carneiro da seguinte forma: a sonda peptídica marcada com pireno é colocada em contato com amostras da camada de células brancas, soro e plasma de carneiros infectados (scrapie) e normais (saudáveis), e a fluorescência resultante é medida da forma descrita acima. A **Fig. 9** ilustra que a sonda peptídica exibe uma

reatividade relativa com componentes sangüíneos de carneiro na ordem de camada de células brancas > soro > plasma.

Exemplo 8: Identificação da sonda peptídica de A β

Uma sonda peptídica de A β é identificada da seguinte forma: é construída uma proteína de fusão que compreende uma sonda peptídica específica para A β (ID. DE SEQ. N°: 36) e GFP. São construídas proteínas de fusão de referência que compreendem (i) A β 42 (ID. DE SEQ. N°: 42) e GFP ou (ii) o clone mutante de A β 42 GM6 (ID. DE SEQ. N°: 44) e GFP. As proteínas são expressas e a fluorescência de GFP é detectada como descrito acima. Como mostrado na Fig. 10, a proteína de fusão de A β 42-GFP exibe pouca fluorescência, porque a agregação rápida da porção A β 42 evita um enovelamento adequado da porção GFP necessário para a fluorescência. Em contraste, a proteína de fusão de mutante-GFP exibe um nível elevado de fluorescência, pois GM6 é um mutante de A β 42 de enovelamento lento; dessa forma, a porção GM6 não interfere tanto com o enovelamento da porção GFP necessário para a fluorescência. A proteína de fusão de sonda peptídica-GFP exibe um nível intermediário de fluorescência, indicando que a porção de sonda peptídica interfere em um nível moderado com o enovelamento de GFP. Esses dados indicam que a sonda peptídica de A β (ID. DE SEQ. N°: 36) será útil em métodos de identificação de agentes que afetam a agregação do peptídeo A β .

Exemplo 9: Especificidade da sonda peptídica de A β por oligômeros de A β

Uma sonda peptídica específica para A β (ID. DE SEQ. N°: 36) é usada para detectar formas estruturais

específicas de A β 40 e A β 42. A sonda peptídica é marcada em cada terminal com pireno. A sonda peptídica é colocada em contato com diferentes amostras que compreendem oligômeros de A β 42, oligômeros de A β 40 e monômeros de A β 40.

5 Os estados morfológicos da proteína A β são determinados tanto por ligação de tioflavina T quanto por dicroísmo circular, usando a metodologia descrita acima. Por exemplo, os peptídeos são levados até em TFE/Tris 30% para medida do dicroísmo circular e o software de
10 desconvolução CDPRO é usado para cálculo da estrutura secundária (Cellcon II (Freeware), Robert Woody, "Colorado State Universtiy"). A sonda peptídica marcada exhibe 18,3% de estrutura de α hélice, 27,6% de estrutura de fita (folha) β e 54,1% de estrutura girada/desordenada. A sonda
15 peptídica exhibe 19,4% de estrutura de α hélice, 25,1% de estrutura de fita (folha) β e 55,5% de estrutura girada/desordenada. As fibras de A β 42 exibem 12,6% de estrutura de α hélice, 60,2% de estrutura de fita (folha) β e 27,2% de estrutura girada/desordenada. As fibras de A β 40
20 exibem 5,6% de estrutura de α hélice, 58,4% de estrutura de fita (folha) β e 35,9% de estrutura girada/desordenada. A amostra de oligômeros de A β 42 (incluindo dímeros, trímeros, tetrâmeros, hexâmeros e 12-mers) exhibe 3,2% de estrutura de α hélice, 52,7% de estrutura de fita (folha) β e 45,4 % de
25 estrutura girada/desordenada.

A interação entre a sonda peptídica e a amostra é detectada por excitação a 350 nm e varredura de fluorescência de 360 a 600 nm. A sonda peptídica reage com fibras e oligômeros de A β 40 e fibras e oligômeros de A β 42
30 de uma forma dose-dependente, mas não reage com monômero de

A β 40 de uma forma dose-dependente. **Fig. 11A** (fibras e monômero) e **11B** (oligômeros). Esses dados mostram que a sonda peptídica se liga preferencialmente às formas oligoméricas de A β 40 e A β 42.

5 **Exemplo 10: Detecção de peptídeo A β em amostras de LCR humano**

Uma sonda peptídica específica para A β /3 (ID. DE SEQ. N°: 36) é usada para detectar A β 40 e A β 42 em amostras de líquido cefalorraquidiano humano (LCR) obtidas de pacientes com Alzheimer e de pacientes saudáveis com idades combinadas. A sonda peptídica é marcada em cada terminal com pireno. Amostras de 40 μ l de LCR são incubadas com 2 μ M de sonda peptídica, e são incubadas por 1 hora, antes da excitação a 350 nm e varredura de fluorescência de 360 a 10 600 nm. Os dados são apresentados na **Fig. 12** como a proporção da região excimérica (430-530 nm) em relação à região monomérica (370-385 nm). A sonda peptídica é capaz de estratificar pacientes com Alzheimer (preto) de pacientes saudáveis com idades combinadas (branco). Os 15 resultados mostrados na **Fig. 12** possuem um valor p = 0,0005. A **Fig. 12A** apresenta os dados para cada paciente, enquanto a **Fig.12B** apresenta os dados médios para cada grupo de pacientes. As amostras de pacientes também foram testadas quanto à proteína A β usando um kit comercial 20 baseado em anticorpos (Biosource ELISA, Invitrogen), mas aquele ensaio não detectou a proteína A β , indicando que a sonda peptídica é mais sensível. 25

É realizado um ensaio similar com o uso de uma sonda peptídica biotinilada específica para A β (ID. DE SEQ. N°: 30 36) que é imobilizada em glóbulos magnéticos, e com

amostras de soro de 200 µl de pacientes com Alzheimer e de pacientes saudáveis com idades combinadas. A sonda peptídica biotinilada é imobilizada aos glóbulos magnéticos Dynal revestidos com estreptavidina. Esses glóbulos são incubados diretamente com as amostras de soro por 1 hora; depois, os glóbulos magnéticos e o material capturado são precipitados para remover as amostras de soro. A seguir, 200 µl de sonda peptídica marcada com dipireno (ID. DE SEQ. N°: 36) em uma concentração de 2 µM pré-equilibrada em trifluoretanol 40%:Tris 10 mM 60%, pH 7,4, são adicionados diretamente aos glóbulos e ao material capturado, e são incubados por mais 3-5 horas, antes de precipitar os glóbulos magnéticos e transferir o líquido para uma placa de microtitulação para análise como descrito acima.

A sonda peptídica é capaz de estratificar pacientes com Alzheimer (preto) de pacientes saudáveis com idades combinadas (branco). Os resultados, mostrados na Fig. 13, possuem um valor p de 0,045. As amostras de pacientes também foram testadas quanto à proteína Aβ com o uso de um kit comercial baseado em anticorpos (Biosource ELISA, Invitrogen), mas, novamente, aquele ensaio não detectou a proteína Aβ, indicando que a sonda peptídica é mais sensível.

Exemplo 11: Direcionamento às placas de Aβ

A seguir, será ilustrada a habilidade das sondas peptídicas para direcionamento às placas de Aβ (por exemplo, auto-agregados insolúveis de proteína Aβ associados à doença de Alzheimer), tanto *in vitro* quanto *in vivo*. É usada uma sonda peptídica específica para Aβ (ID. DE SEQ. N°: 36) e marcado cada terminal com pireno.

São feitos estudos *in vitro* em cortes de cérebro de camundongos transgênicos que superexpressam APP751 humano com mutações London e Swedish (hAPP751a). Essa proteína é um mutante de A β que forma placas neuríticas nos camundongos transgênicos. Tecido de camundongos não transgênicos da prole serviu como tecido de controle.

Dois tipos diferentes de lâminas de tecido são avaliados: *crio-cut* (congeladas e cortadas) e embebidas em parafina e cortadas. A sonda peptídica é incubada nas lâminas de cérebro e a ligação da sonda peptídica ao cérebro, e aos depósitos/placas amilóides em particular, é avaliada qualitativamente. Para fins de referência, lâminas consecutivas são coradas por imunohistoquímica com um anticorpo anti-A β , o anticorpo 6E10 ou Tioflavina S. O uso de controles anti-A β confirma a especificidade da coloração em placas neuríticas.

As imagens são registradas em um microscópio Nikon E800 com uma câmara PixelFly montada. Para registros de mosaicos de imagens, o microscópio é equipado com uma mesa automática controlada pelo software StagePro. As imagens da coloração da sonda peptídica e da coloração de anticorpo e Tioflavina S, respectivamente, são sobrepostas no software Adobe PhotoShop.

Utilizando-se a concentração de 0,5 ml/mg de sonda peptídica, a coloração específica da placa é aparente, tanto em lâminas de parafina quanto *crio-cut*. A superposição com coloração de anticorpo de lâminas consecutivas revelou que a coloração em lâminas de parafina é mais específica para as placas do que a coloração em lâminas *crio-cut*. Nessas últimas amostras, as células da

camada neuronal do hipocampo são marcadas, o que também ocorre com tecido cerebral em torno das placas no córtex. Dessa forma, a qualidade da coloração pode ser melhor em cortes de parafina. Além da coloração de placas neuríticas, a sonda peptídica também corou especificamente vasos sangüíneos que abrigam peptídeo amilóide humano, que estão tipicamente presentes em transgênicos hAPP751_{SL}.

Estudos *in vivo* usam quatro camundongos transgênicos homozigotos hAPP751_{SL} com 10 meses de idade e quatro controles da prole (irmãos que não carregam o transgene). A sonda peptídica marcada é administrada por via intranasal, a 10 µl de líquido por administração (em concentrações de 0,1 a 2,0 mg/ml), com um intervalo de administração planejado de meia a uma hora, ajustado de acordo com a condição do animal após o tratamento.

Ao final do tratamento, os camundongos são sacrificados e o LCR e os cérebros são extraídos (todos os camundongos são sedados por anestesia por inalação padronizada, Isoflurano, Baxter).

O líquido cefalorraquidiano é obtido por dissecação romba e exposição do forame magno. Com a exposição, uma pipeta de Pasteur é inserida na profundidade aproximada de 0,3 - 1 no forame magno. O LCR é coletado por sucção e ação capilar, até que o fluxo cesse completamente. O LCR é imediatamente congelado e mantido a -80°C até ser usado.

Após coleta do LCR, o estômago, o conteúdo do estômago e os cérebros são removidos rapidamente. Os cérebros são hemisseccionados, e o hemisfério direito de todos os camundongos são fixados por imersão em paraformaldeído 4%/PBS recém produzido (pH 7,4) por 1 hora em temperatura

ambiente, e transferidos para uma solução de sacarose 15%/PBS por 24 horas para assegurar a proteção criogênica. A seguir, os cérebros são congelados em isopentano líquido no dia seguinte e armazenados a -80°C até serem utilizados para investigações histológicas. A outra metade do cérebro é imediatamente congelada por choque em isopentano líquido para uso futuro.

São registradas imagens de camundongos transgênicos tratados com a maior dose de sonda peptídica e de camundongos de controle e de um controle de veículo transgênico (por exemplo, o diluente usado para a sonda peptídica) para confirmar que a sonda peptídica atravessa a barreira hematoencefálica (BBB), o que de fato ocorre.

Para avaliar a especificidade da coloração pela sonda peptídica, a fluorescência é excitada usando um filtro de UV-2A e B-1E de um microscópio para detectar autofluorescência provável no espectro inferior. As partes fluorescentes são registradas nas lâminas consecutivas para assegurar que impurezas (por exemplo, poeira) não causem fluorescência. As lâminas transgênicas são coradas com Tioflavina S para avaliar a carga da placa.

Como observado acima, camundongos transgênicos hAPP751_{SL} expressam hAPP em certos vasos sanguíneos na periferia do cérebro. A sonda peptídica se liga ao amiloide e se aglomera fora do vaso sanguíneo no cérebro. Nos camundongos não transgênicos, a sonda peptídica alcança o bulbo olfatório, mas não se liga a uma estrutura morfológica específica.

Ficará evidente para aqueles habilitados na técnica que podem ser feitas várias modificações e variações na

prática da presente invenção, sem se afastar do escopo ou do espírito da invenção. Outras modalidades da invenção ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica considerando-se a especificação e a prática da invenção.

- 5 Deseja-se que a especificação e os exemplos sejam considerados apenas como exemplares, com o verdadeiro escopo e espírito da invenção sendo indicados pelas reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a identificação de uma proteína-alvo presente em um estado específico de auto-agregação em uma amostra, caracterizado por compreender:

5 (a) o contato da amostra com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação; e

10 (b) a detecção de qualquer ligação entre a sonda peptídica e qualquer proteína-alvo presente no estado específico de auto-agregação identificando, dessa forma, qualquer proteína-alvo presente no estado específico de auto-agregação.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, 15 caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e auto-agregados insolúveis.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, 20 caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica se liga preferencialmente a auto-agregados insolúveis da proteína-alvo selecionados do grupo que consiste em auto-agregados amorfos insolúveis, protofibrilas e fibrilas.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, 25 caracterizado pelo fato de que a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína beta ou peptídeo A β amilóide, amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, 30 imunoglobulinas ou fragmentos microglobulina- β_2 destas, α -

sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

10 5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica ainda compreende um marcador detectável.

15 6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do ID. DE SEQ. N°: 36 e ID. DE SEQ. N°: 45.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica é imobilizada em um suporte sólido.

20 8. Método *in vivo* para a identificação de uma proteína-alvo presente em um paciente em um estado específico de auto-agregação, caracterizado por compreender:

25 (a) a administração ao paciente de uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo no estado específico de auto-agregação e em que a sonda peptídica é marcada com um marcador detectável; e

30 (b) avaliação do indivíduo quanto à sonda peptídica marcada localizada na proteína-alvo presente no paciente,

identificando, dessa forma, a proteína-alvo presente no paciente no estado específico de auto-agregação.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e auto-agregados insolúveis.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, proteína beta ou peptídeo A β amilóide, amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

11. Método para evitar a formação de agregados protéicos de uma proteína-alvo, caracterizado por compreender o contato da proteína-alvo com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação evitando, dessa forma, a formação de agregados protéicos de ordem superior da

proteína-alvo.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e auto-agregados insolúveis.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a proteína-alvo é selecionada do grupo que consiste na proteína precursora do polipeptídeo amilóide da ilhota, amilóide proteína beta ou peptídeo A β , amilóide sérico A, insulina, amilina, componente não beta-amilóide, príons, hemoglobina, imunoglobulinas ou fragmentos microglobulina- β_2 destas, α -sinucleína, rodopsina, α 1-antiquimotripsina, cistatinas, tau, p53, presenilinas, receptor de lipoproteína de baixa densidade, apolipoproteínas, superóxido dismutase, proteínas do neurofilamento, transtiretina, procalcitonina ou calcitonina, fator natriurético atrial, gelsolina, regulador transmembrana da fibrose cística, proteína da doença de Huntington, cadeia alfa do fibrinogênio, fenilalanina hidroxilase, colágeno, beta-hexosaminidase e proteína cistatina C.

14. Método de liberação de um agente terapêutico a uma proteína-alvo, caracterizado por compreender a combinação do agente terapêutico com uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, e a sonda peptídica passa por uma mudança

conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet* e em que a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo, e

5 administração da combinação de sonda peptídica-agente terapêutico a um paciente que dela necessite.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico possui atividade anti-amilóide.

10 16. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação.

15 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo em um estado específico de auto-agregação selecionado do grupo que consiste em monômeros, oligômeros solúveis e agregados insolúveis.

20 18. Método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, caracterizado por compreender:

(A) o contato de uma proteína de fusão e de um agente de teste, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:
25 (a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma
30 conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-*

sheet, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

5 (B) a detecção de um sinal gerado pelo marcador; e

(C) a correlação do sinal com a capacidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

19. Método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, caracterizado
10 por compreender:

(A) o contato da proteína-alvo, uma proteína de fusão, e um agente de teste, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:

15 (a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

(B) a detecção de um sinal gerado pelo marcador; e

25 (C) a correlação do sinal com a capacidade do agente para inibir a agregação da proteína-alvo.

20. Método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, caracterizado por compreender:

30 (A) a submissão de uma proteína de fusão às condições

que promovem agregação, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:

(a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo

5 que passa por uma mudança conformacional de uma conformação

alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, (b) a

sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma

conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-*

sheet, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência

10 de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

(B) a detecção de um primeiro sinal gerado pelo marcador;

15 (C) a submissão da proteína de fusão às condições que promovem agregação na presença de um agente de teste, e a detecção de um segundo sinal gerado pelo marcador; e

(D) a avaliação das intensidades relativas do primeiro e segundo sinais identificando, dessa forma, um agente que
20 inibe a agregação da proteína-alvo.

21. Método de avaliação da capacidade de um agente para inibir a agregação de uma proteína-alvo, caracterizado por compreender:

(A) o contato de uma proteína de fusão e a proteína-
25 alvo, em que a proteína de fusão compreende:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:

(a) a sonda peptídica compreende uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo

que passa por uma mudança conformacional de uma conformação

30 alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, (b) a

sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, e (c) a sonda peptídica não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

5 (ii) um marcador que gera um sinal dependente do estado de agregação da proteína de fusão;

 (B) a detecção de um primeiro sinal gerado pelo marcador;

 (C) o contato da proteína de fusão, da proteína-alvo e
10 de um agente de teste, e a detecção de um segundo sinal gerado pelo marcador; e

 (D) a avaliação das intensidades relativas do primeiro e segundo sinais identificando, dessa forma, um agente que inibe a agregação da proteína-alvo.

15 22. Método de identificação de uma sonda peptídica para uma proteína-alvo que exhibe uma tendência aumentada ou diminuída para formar agregados em relação a uma sonda peptídica de referência, caracterizado por compreender:

 (A) a detecção de um primeiro sinal gerado por uma
20 proteína de fusão de referência que compreende:

 (i) uma sonda peptídica de referência que compreende:

 (a) uma seqüência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma
25 conformação *beta-sheet*, (b) em que a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, e (c) a sonda peptídica de referência não compreende a seqüência de comprimento total da proteína-alvo; e

30 (ii) proteína verde fluorescente;

(B) a detecção de um segundo sinal gerado por uma proteína de fusão de teste que compreende uma sonda peptídica de teste e proteína verde fluorescente, em que a sonda peptídica de teste é um mutante da sonda peptídica de referência que compreende uma inserção, eliminação ou substituição de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos da sonda peptídica de referência; e

(C) a correlação da intensidade do segundo sinal em relação ao primeiro sinal identificando, dessa forma, uma sonda peptídica para uma proteína-alvo que exibe uma tendência aumentada ou diminuída para formar agregados em relação à sonda peptídica de referência.

23. Método de identificação de uma sonda peptídica específica para uma proteína-alvo em um estado estrutural específico que se enquadra em um espectro de estados estruturais que varia de um limite inferior de monômeros solúveis a um limite superior de auto-agregados insolúveis, caracterizado por compreender:

(A) a submissão de uma proteína de fusão às condições que promovem auto-agregação, a proteína de fusão compreendendo:

(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que:
(a) a sonda peptídica compreende uma sequência de aminoácidos que corresponde a uma região da proteína-alvo que passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, (b) a sonda peptídica passa por uma mudança conformacional de uma conformação alfa-helicoidal para uma conformação *beta-sheet*, e (c) a sonda peptídica não compreende a sequência de comprimento total da proteína-alvo; e

(ii) proteína verde fluorescente;

(B) a detecção de um sinal gerado pela proteína de fusão; e

(C) a correlação da intensidade do sinal com a
5 especificidade da sonda peptídica para uma proteína-alvo em
um estado estrutural específico identificando, dessa forma,
uma sonda peptídica específica para uma proteína-alvo em um
estado estrutural específico.

24. Método para o tratamento de uma doença associada a
10 uma proteína-alvo, caracterizado por compreender o contato
da proteína-alvo com uma proteína de fusão que compreende:
(i) uma sonda peptídica para a proteína-alvo, em que a
sonda peptídica se liga preferencialmente à proteína-alvo,
e (ii) um agente terapêutico.

FIGURA 1

Encefalopatias espongiformes transmissíveis:
conformadores de TSE

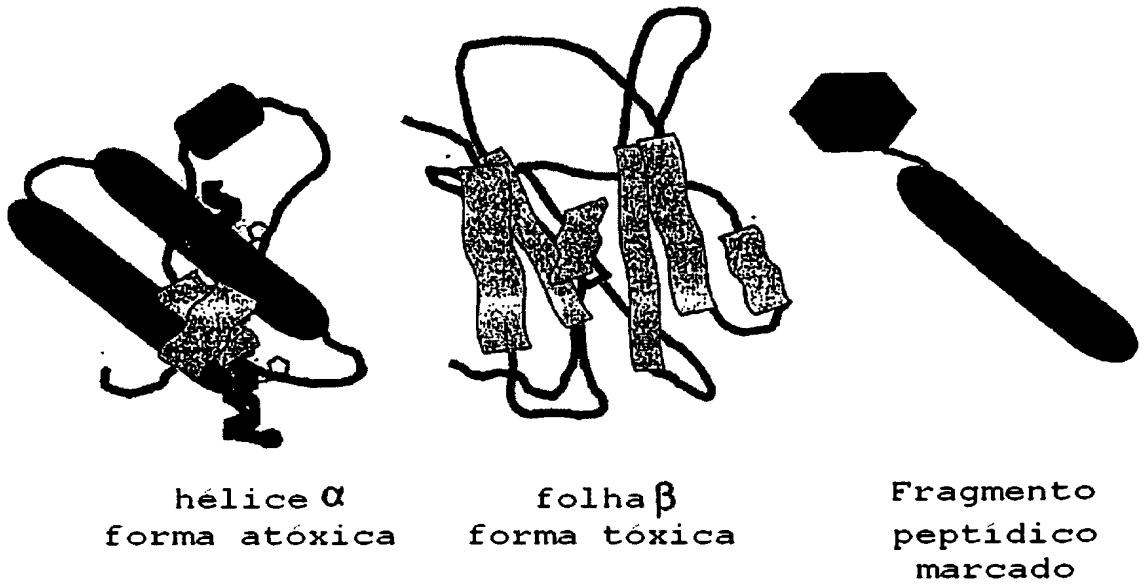


FIGURA 2

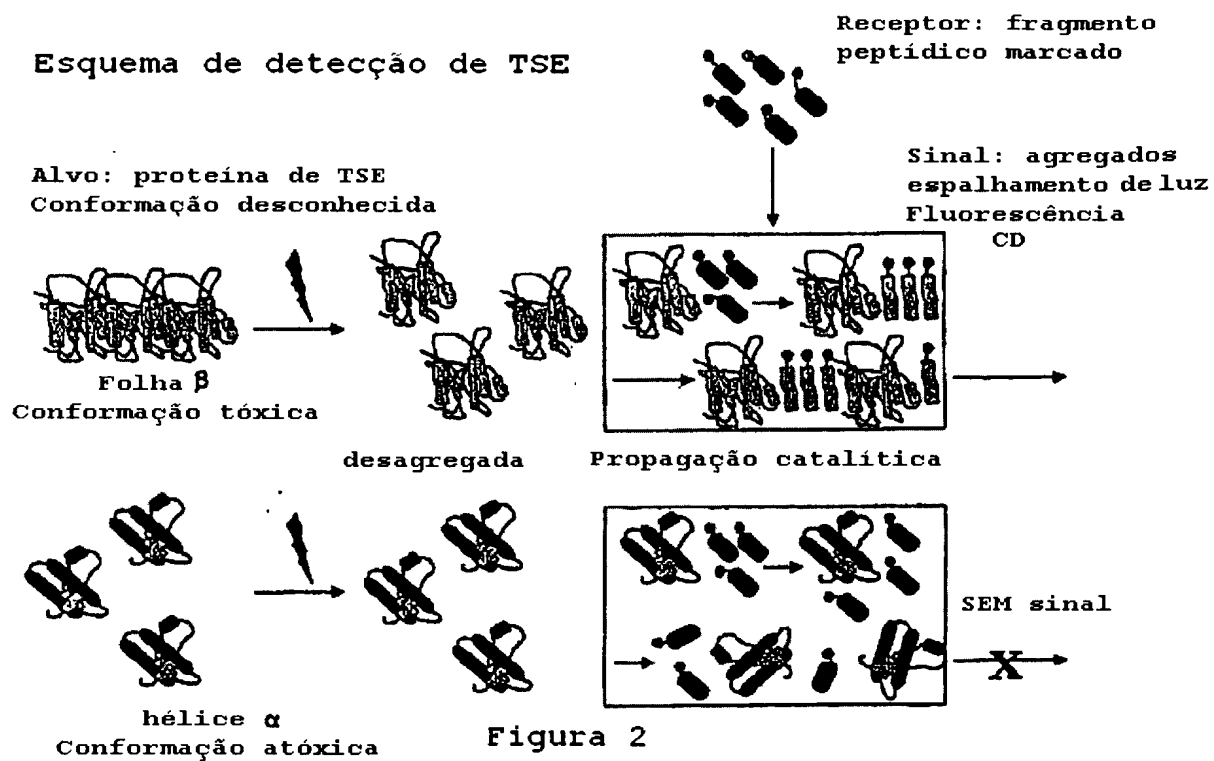


FIGURA 3

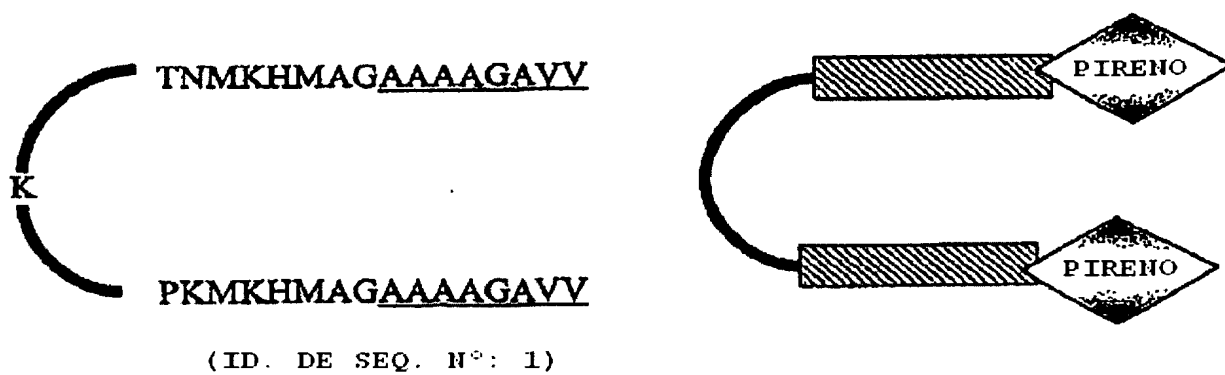


FIGURA 4

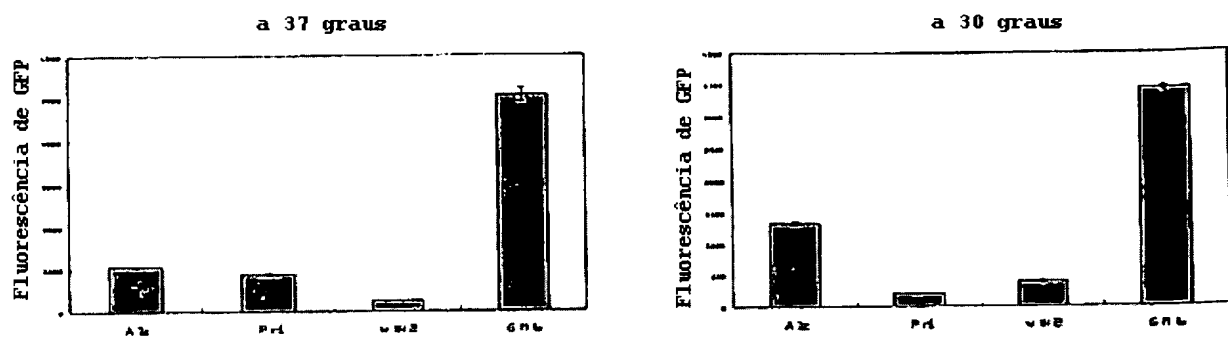


FIGURA 5

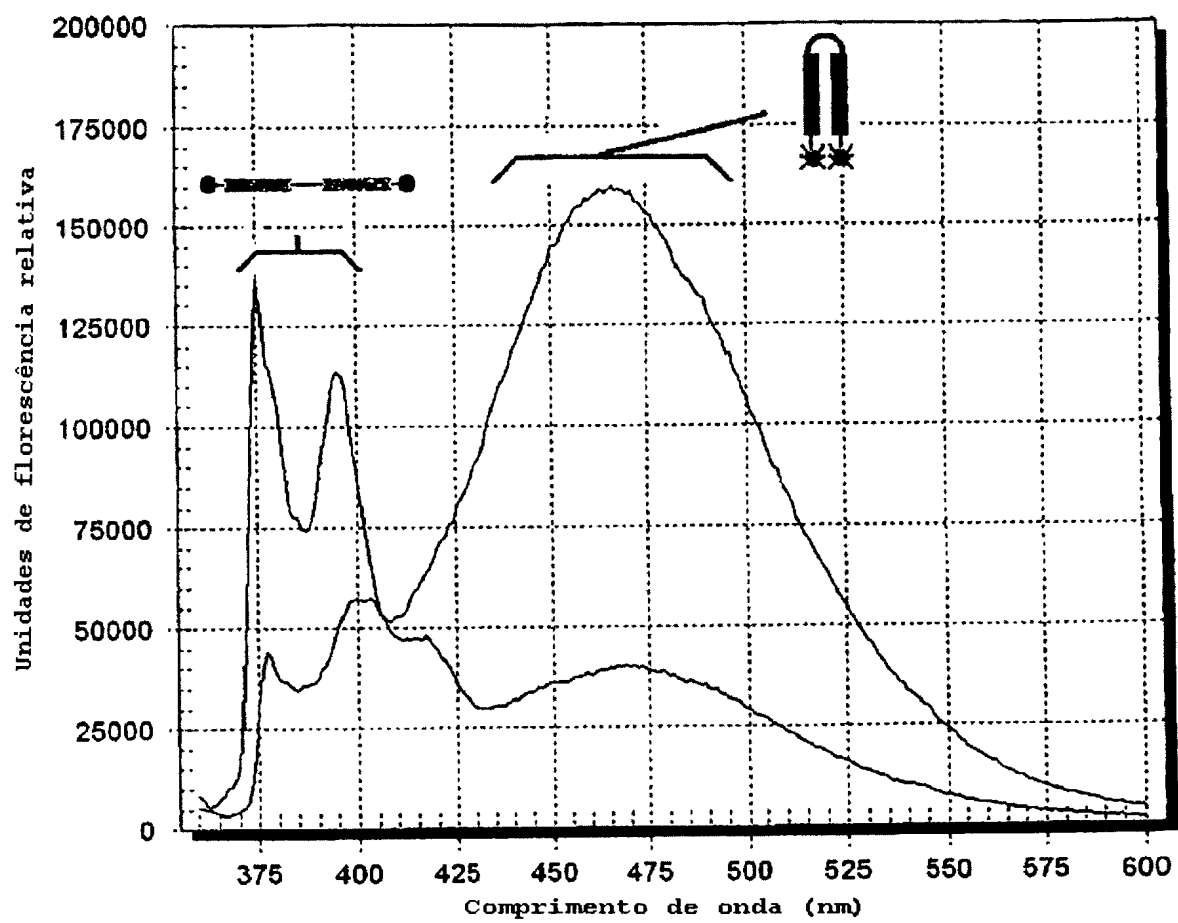


FIGURA 6

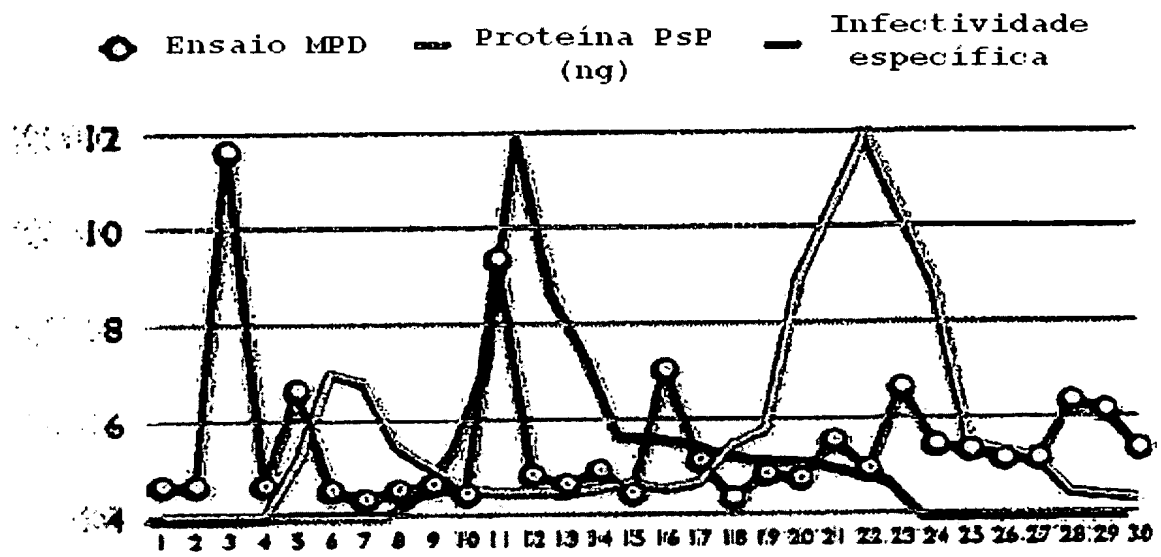


FIGURA 7

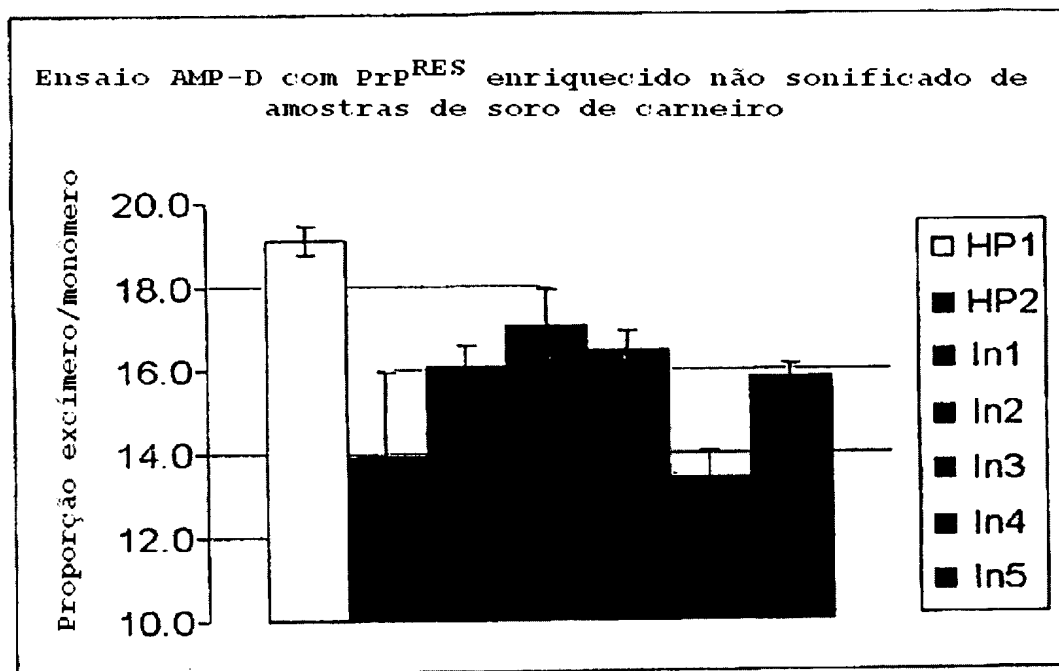


FIGURA 8

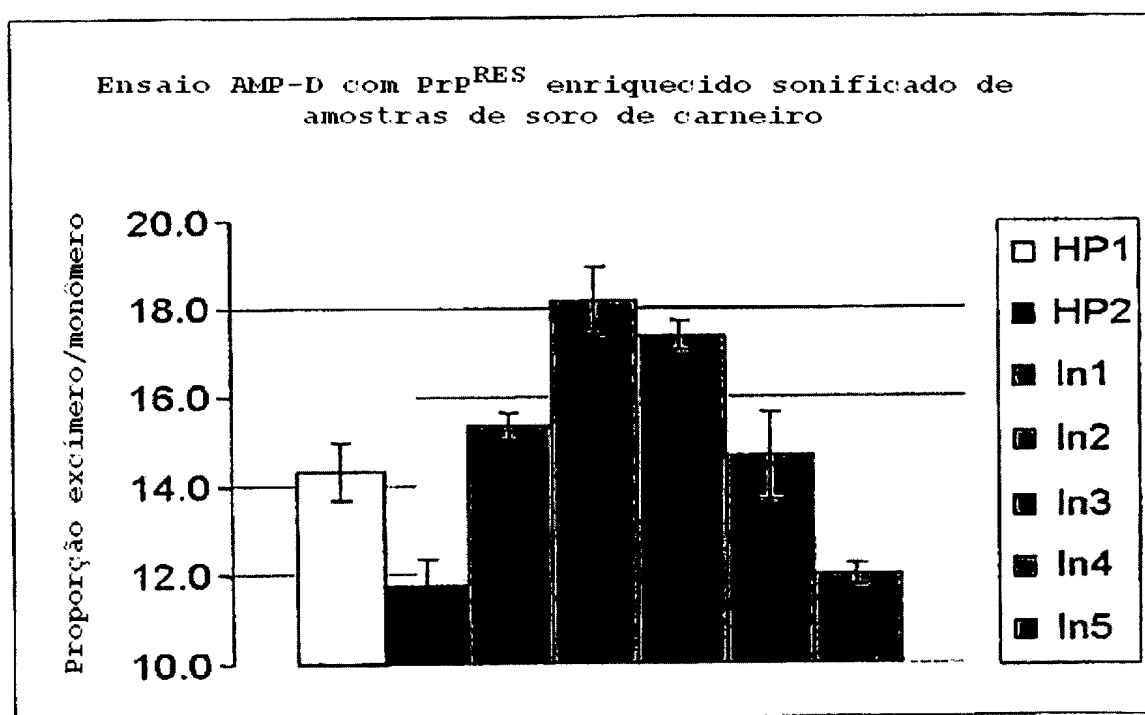


FIGURA 9

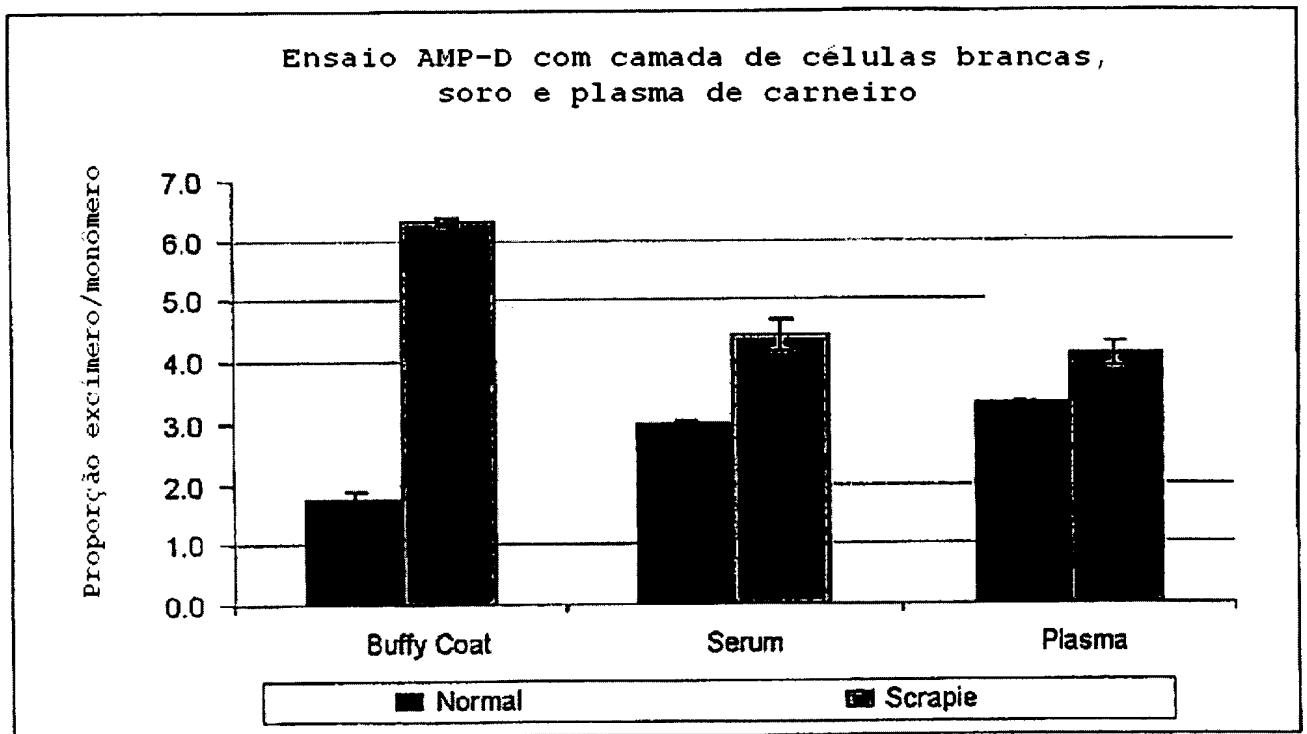


FIGURA 10

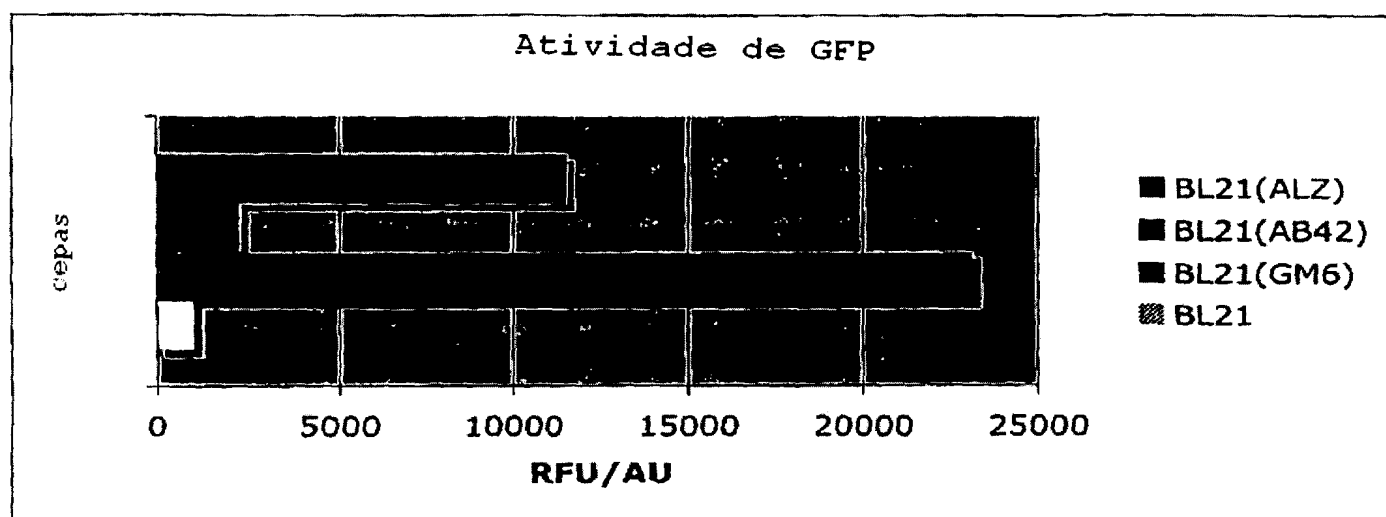


FIGURA 11A

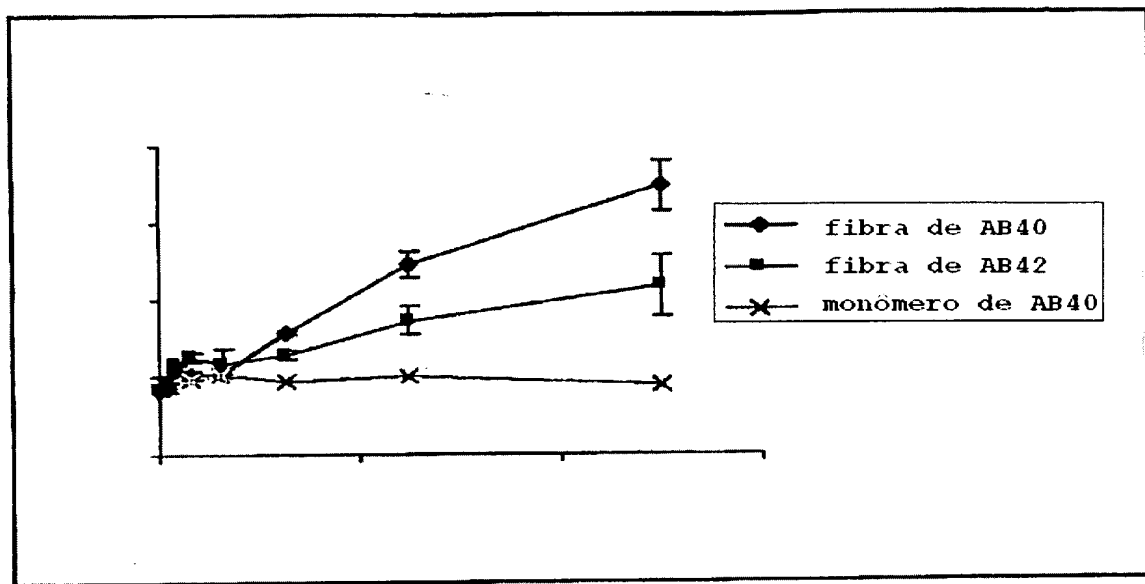


FIGURA 11B

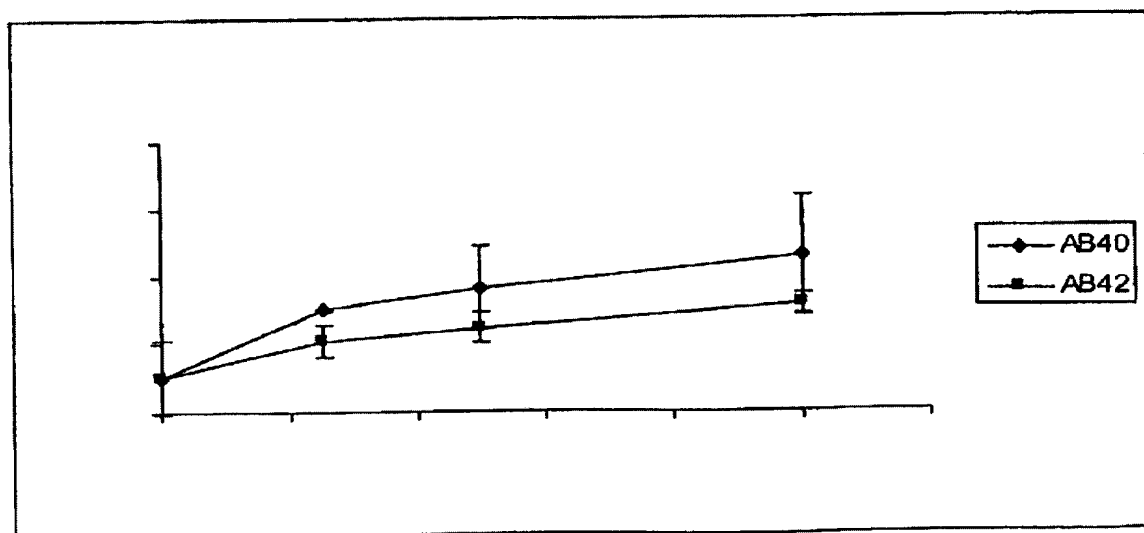


FIGURA 12A

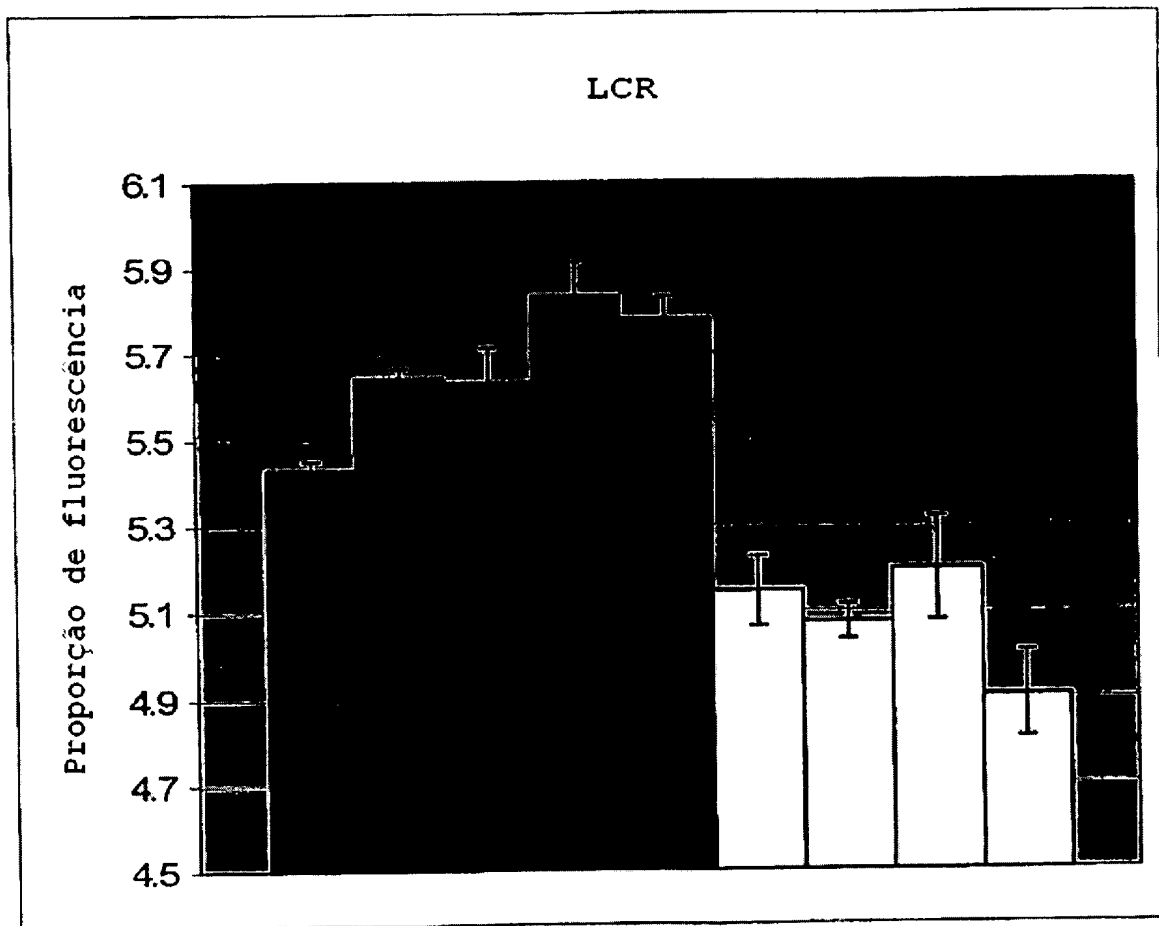


FIGURA 12B

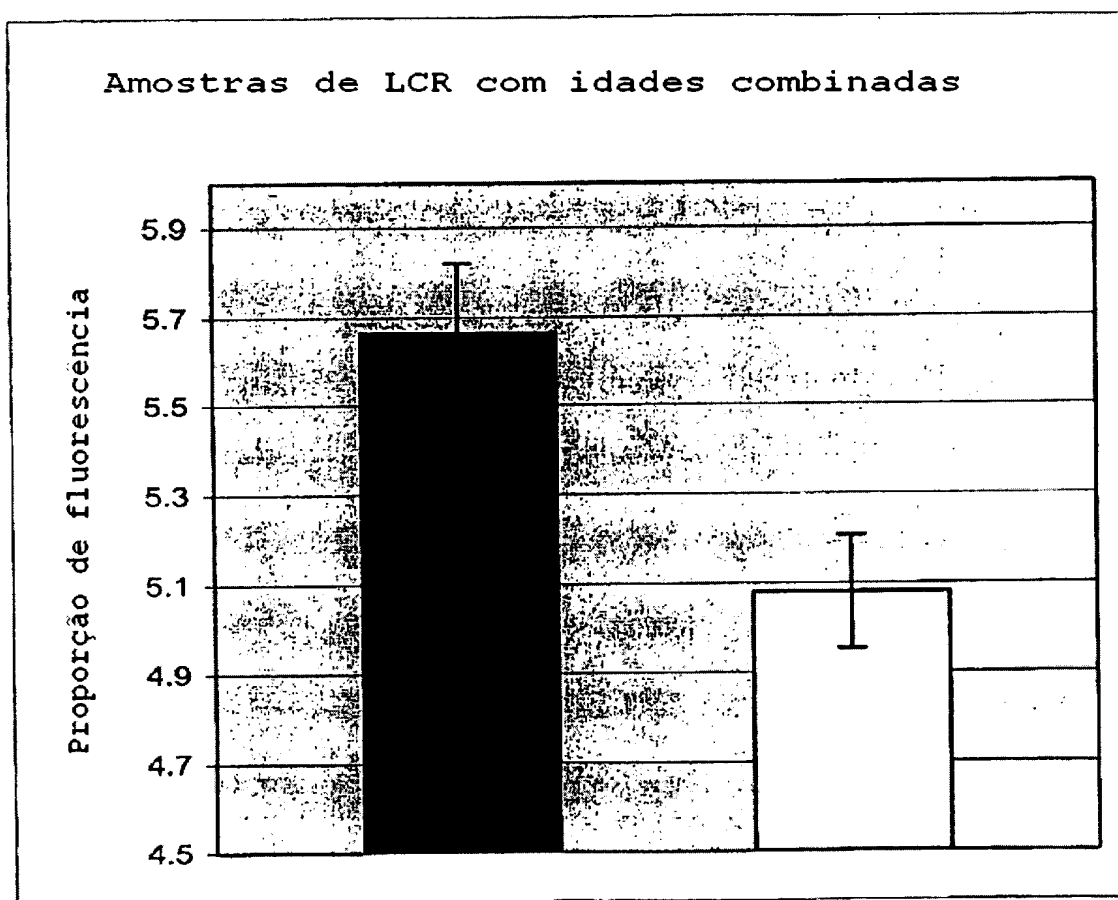
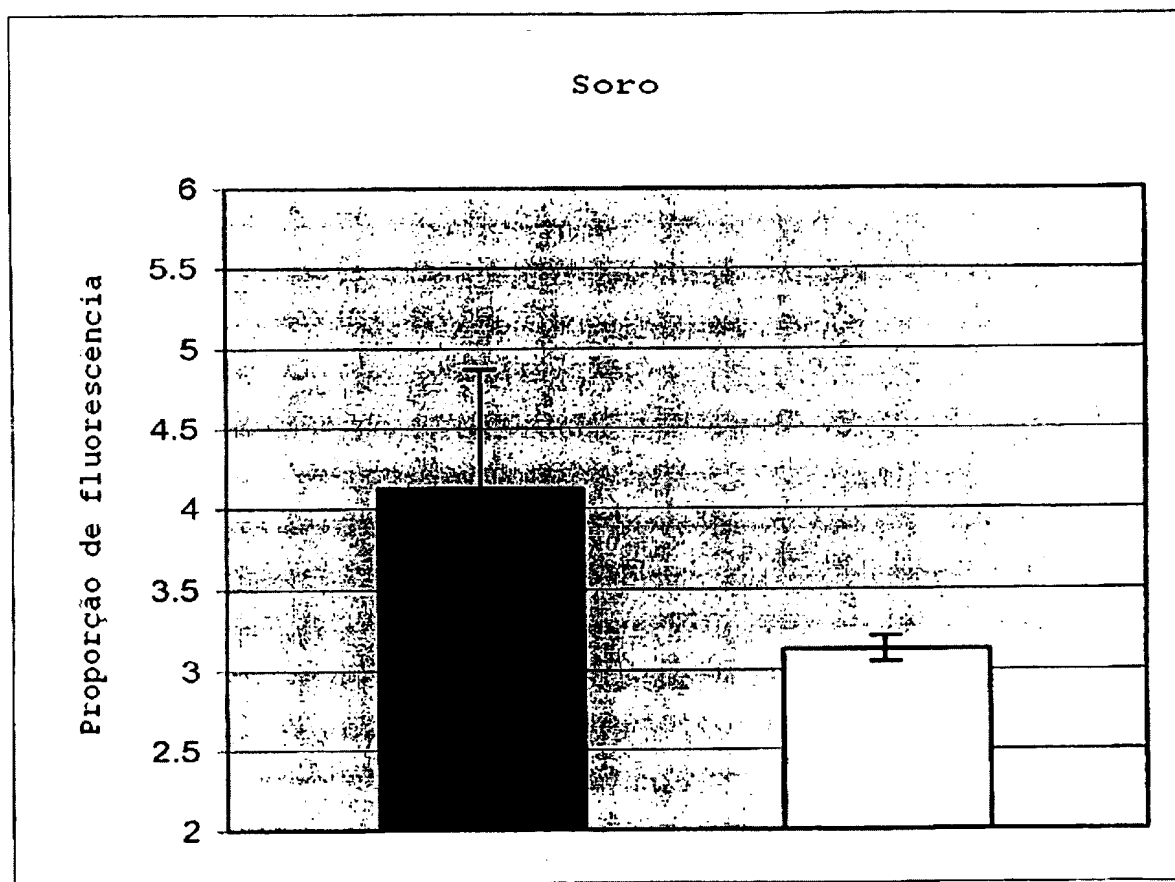


FIGURA 13



RESUMO

SONDAS PEPTÍDICAS PARA FINS DIAGNÓSTICOS E TERAPÊUTICOS

São apresentados agentes e métodos que podem ser usados para diagnosticar e tratar a diversas doenças associadas a proteínas conformacionalmente alteradas. Os agentes e métodos podem ser usados para identificar e liberar fármacos úteis para o tratamento de doenças associadas a proteínas conformacionalmente alteradas.