(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 527 408**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2003 E 10176708 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2312318**

(54) Título: **Ligandos de proteínas priones y procedimientos de uso**

(30) Prioridad:

03.12.2002 US 430423 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2015

(73) Titular/es:

NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY (50.0%)
2401 Research Drive, Suite 1122
Raleigh, NC 27695-8218, US y
PATHOGEN REMOVAL AND DIAGNOSTIC TECHNOLOGIES, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

HAMMOND, DAVID J.;
LATHROP, JULIA T.;
CERVENAKOVA, LARISA y
CARBONELL, RUBEN G.

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ligandos de proteínas priones y procedimientos de uso

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de las interacciones proteína-ligando y más en particular se refiere a la identificación de ligandos que se unen a proteínas priones y procedimientos de uso de los ligandos para detectar o eliminar priones de muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

La proteína prión natural o celular "PrPc" está ampliamente distribuida en todos los mamíferos y tiene una secuencia de aminoácidos y una estructura de proteína particularmente bien conservadas. Se cree que los priones infecciosos están compuestos de una forma modificada de la proteína prión (PrPc) celular normal y se denominan "PrPsc". Los priones tienen algunas propiedades en común con otros patógenos infecciosos, pero no parece que contengan ácido nucleico. En cambio, se propone que está implicado un cambio conformacional post-traduccional en la conversión de PrPc no infecciosa en PrPsc infecciosa durante el que las hélices α se transforman en láminas β. La PrPc contiene tres hélices α y tiene poca estructura en lámina β; en cambio, PrPsc es rica en lámina β. Se cree que la conversión de PrPc a PrPsc conduce al desarrollo de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) durante las que la PrPsc se acumula en el sistema nervioso central (SNC) y se acompañada con cambios neuropatológicos y disfunción neurológica. La PrPsc, denominada a menudo la forma "tembladera" de la proteína prión, se considera necesaria y, posiblemente suficiente para la transmisión y patogénesis de estas enfermedades neurodegenerativas transmisibles de animales y seres humanos.

Ejemplos específicos de EET incluyen la tembladera, que afecta a ganado ovino y a cabras; la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), que afecta al ganado vacuno; encefalopatía transmisible del visón, encefalopatía espongiforme felina y enfermedad consuntiva crónica (CWD) de ciervo mulo, ciervo de cola blanca, ciervo de cola negra y alce. En seres humanos, las enfermedades EET se pueden presentar como, kuru, enfermedad Creutzfeldt-Jakob (ECJ), Síndrome Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS), insomnio letal y variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (vECJ). Recientemente la vECJ ha aparecido en seres humanos como resultado de la BSE epidémica en Gran Bretaña y lo más probable es que esté provocada por el consumo de productos alimentarios procedentes de ganado vacuno infectado con BSE o "enfermedad de las vacas locas". Un número desconocido de personas en el Reino Unido ingirió alimentos potencialmente contaminados con tejido nervioso de ganado vacuno infectado con BSE durante mediados de los 80 a principios de los 90. Debido a que el periodo de incubación para la enfermedad contraída por vía oral puede ser de más de 20 años en seres humanos, puede que la incidencia real de la vECJ no se haga evidente durante muchos años. Hasta la fecha, se sabe que más de 130 personas han contraído la enfermedad, principalmente en el Reino Unido; sin embargo, se han notificado casos en Canadá, Francia, Hong Kong, Irlanda, Italia, y en los Estados Unidos. La exportación de productos alimentarios de ganado bovino contaminado desde el Reino Unido a todo el mundo indica una posible presencia global de BSE y, por consiguiente, la probabilidad de vECJ. La detección de la BSE en la mayoría de los países europeos, Japón e Israel es consistente con estas observaciones. En consecuencia, es de profunda importancia la capacidad para detectar y retirar la proteína prión infecciosa de una variedad de materiales incluyendo productos alimentarios.

Históricamente, el diagnóstico de TSE se basó en la aparición de signos clínicos de la enfermedad y sólo se pudo confirmar por examen histológico post-mortem del tejido cerebral. Una característica de todas las EET es la falta de una respuesta inmunitaria medible para el agente. Por tanto, no se producen anticuerpos y no se puede usar ninguna prueba serológica convencional para identificar a los animales infectados. Recientemente, la identificación de la proteína prión anormal en el cerebro ha mejorado la capacidad para hacer un diagnóstico de la enfermedad.

Además de la ingestión de productos infectados de origen bovino, la transfusión de sangre y el trasplante de órganos representan otro modo potencial de transmisión de vECJ entre los seres humanos. Actualmente se desconoce la probabilidad de transmisibilidad de vECJ en seres humanos por transfusión de sangre, pero basándose en los datos obtenidos en modelos animales experimentales incluyendo la transmisión a partir de ovejas infectadas experimentalmente por vía oral con BSE y ovejas infectadas de forma natural con tembladera, parece ser una posibilidad muy probable. A diferencia de otras EET humanas, la PrPsc está presente en el sistema linforreticular de los pacientes con vECJ, aumentando de este modo la probabilidad de que el agente infeccioso esté en la sangre y su transmisión a través de una transfusión de sangre. Otros factores que elevan la preocupación sobre el riesgo de transmisión por transfusión incluyen el número desconocido, pero probablemente alto, de personas expuestas a BSE y la falta de una prueba de diagnóstico preclínico para vECJ. Además, parece que la virulencia de vECJ se potencia tras la adaptación de la especie en primates y ratones, lo que indica que la transmisión de ser humano a ser humano puede ser más eficaz que de vaca a ser humano. Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar procedimientos para prevenir la transmisión de vECJ por transfusión de sangre. Estas medidas pueden incluir la identificación temprana de donantes infectados y su aplazamiento, retirada e inactivación de los agentes de EET en productos alimentarios y sanitarios derivados de animales destinados al consumo o a la aplicación para animales o seres humanos, productos derivados de sangre de bovino o de seres humanos y trasplantes de órganos.

Desafortunadamente, la PrPsc es extraordinariamente resistente a los procedimientos de inactivación químicos y físicos, y es difícil de conseguir un procedimiento de inactivación.

La retirada de priones a través de la interacción específica con ligandos parece más prometedora. Ya se han identificado varios ligandos que se unen a proteínas priones. Se han rastreado colecciones de péptidos combinatorias para ligandos que se unen a la secuencia de repetición de octapéptido (PHGGGWGQ (SEC ID N.º: 220)) encontrada en todas las proteínas priones mamíferas conocidas y se descubrieron una serie de ligandos, como se describe en el documento WO 01 77687. Otros materiales incluyen una variedad de polímeros, por ejemplo, polimetacrilato de TosoBioSep, resinas de intercambio de iones generalmente (véase la patente de los Estados Unidos n.º 5.808.011 de Gawryl y cols.), ligandos que interaccionan con placas amiloides por ejemplo, rojo Congo (Ingrosso, L., y cols., Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. J. Virology 69: 506-508 (1995)), 4-yodo, 4-desoxi-doxorubicina (Tagliavini, F., y cols., Effectiveness of anthracycline against experimental prion diseases in Syrian hamsters. Science 276: 1119-1122 (1997)), anfotericina B, porfirinas y ftalocianinas (Priola, S.A., y cols., Porphyrin and Phthalocyanine antiscrapie compounds, Science 287: 1503-1506 (2000)), metales (Stockel y cols., Biochemistry, 37, 7185-7193 (1998)), péptidos que interaccionan con PrP para formar complejos (véase la patente de los Estados Unidos 5.750.361 de Prusiner y cols. y Soto, C. y cols., Reversion of prion protein conformational changes in synthetic β-sheet breaker peptides, Lancet, 355: 192-197 (2000)), heparina y otros polianiones polisulfatados (Caughey, B., y cols., Binding of the Protease-sensitive form of prion protein PrP to Sulphated Glycosaminoglycan and Congo Red, J. Virology 68: 2135-2141(1994)), anticuerpos (Kascsak, R.J., y cols., Immunodiagnosis of prion disease, Immunological Invest. 26: 259-268 (1997)), y otras proteínas, por ejemplo, plasminógeno (Fischer, M.B. y cols., Binding of disease-associated prion protein to plasminogen., Nature 408: 479-483 (2000)). Actualmente, no se ha caracterizado totalmente ningún ligando ni se ha encontrado ningún ligando que se pueda unir a un prión a partir de una amplia variedad de medios, aunque algunos pueden ser útiles en circunstancias específicas (véase la patente de los Estados Unidos N.º 5.808.011 de Gawryl y cols.).

US5416013 se refiere a polipéptidos aislados que son proteasas de IL-1β y derivados de estos que son capaces de escindir una secuencia de aminoácidos particular, incluida la secuencia de aminoácidos en el extremo N- terminal de la IL-1β humana.

US5498695 se refiere a péptidos de *para*-nitroanilida y métodos de empleo de tales péptidos para detectar inhibidores de la enzima convertidora de interleucina 1β.

Hasta la fecha, las enfermedades EET en los seres humanos son mortales al 100%. Desafortunadamente, incluso aunque se han notificado un número de compuestos, incluyendo amfotericinas, polianiones sulfatados, colorante rojo Congo y antibióticos de antraciclina, como agentes terapéuticos prospectivos, todos han demostrado sólo un ligero potencial para impedir la propagación de priones, y ninguno ha mostrado tener ningún efecto sobre la retirada de priones pre-existentes de un huésped infectado. Por tanto, sigue habiendo una necesidad urgente de proporcionar nuevos agentes terapéuticos.

Se cree que el ensamblaje y el desensamblaje de proteínas normalmente solubles en formas conformacionalmente alteradas e insolubles es un proceso causativo en una variedad de otras enfermedades, muchas de las cuales son enfermedades neurológicas. La relación entre el comienzo de la enfermedad y la transición desde la proteína normal hasta la conformacionalmente alterada es poco conocida. Ejemplos de tales proteínas insolubles, además del prión incluyen: péptido β-amiloide en placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer y angiopatía amiloide cerebral (CAA); depósitos de α-sinucleína en cuerpos de Lewy de la enfermedad de Parkinson, tau en ovillos neurofibrilares en demencia frontotemporal y enfermedad de Pick; superóxido dismutasa en esclerosis lateral amiotrófica; y huntingtina en la enfermedad de Huntington.

A menudo, estas proteínas altamente insolubles forman agregados compuestos de fibrillas no ramificadas con la característica común de una conformación de lámina β plegada. En el sistema nervioso central, puede estar presente amiloide en vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos (depósitos cerebrovasculares) y en el parénquima cerebral (placas). Estudios neuropatológicos en modelos de seres humanos y animales indican que las células próximas a depósitos amiloides están alteradas en sus funciones normal.

El mecanismo preciso por el que se forman las placas neuríticas y la relación de la formación de placas con los procesos neurodegenerativos asociados a enfermedad son en gran parte desconocidos. Se necesitan metodologías que puedan separar fácilmente o que puedan distinguir entre dos o más formas conformacionales diferentes de una proteína, por ejemplo, PrPc y PrPsc, para entender el proceso de conversión y para encontrar estructuras que interaccionan específicamente con la forma asociada a la enfermedad. Las metodologías actuales para la separación o para la distinción entre isoformas incluyen: la movilidad diferencial en geles de poliacrilamida en presencia de un caótropo tal como urea, es decir, geles con gradiente transversal de urea (TUG); sensibilidad diferencial al tratamiento de proteasa, por ejemplo, proteinasa K (PK) y la detección del producto de digestión resistente a PK de PrPsc denominado PrPres; estabilidad de temperatura diferencial; solubilidad relativa en detergentes no iónicos; y la capacidad de las estructuras fibrilares para unirse a determinados productos químicos, por ejemplo, rojo Congo e isoflavina S. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad no cubierta de identificar reactivos de alta afinidad que sean específicos para la proteína conformacionalmente alterada y especialmente de formas asociadas con la enfermedad.

Estos reactivos podrían ser útiles para el desarrollo de posibles kits de diagnóstico, para la separación y purificación de las distintas formas de la proteína, para la retirada de formas infecciosas de la enfermedad de agentes terapéuticos, productos biológicos, vacunas y alimentos, y para el tratamiento.

Sumario de la invención

Se describen en el presente documento ligandos que se unen a proteínas priones y sus aplicaciones. Los ligandos son péptidos que se unen con selectividad y especificidad a analitos de priones. Los ligandos se pueden unir a una o más formas de proteína prión, incluyendo proteína prión celular (PrPc), proteína prión infecciosa (PrPsc), y proteína prión recombinante (PrPr). Los priones de distintas especies, incluyendo seres humanos y hámsteres, se unen por los ligandos. También se proporcionan composiciones que contienen los ligandos de unión a proteínas priones sobre un soporte tal como una resina o una membrana.

Los ligandos son útiles para detectar o retirar una proteína prión de una muestra, tal como un fluido biológico o una muestra ambiental. Los ligandos se usan para detectar o retirar todas las proteínas priones de la muestra o se pueden escoger selectivamente para detectar o retirar una forma única de proteína prión y por lo tanto, se pueden usar para distinguir entre proteína prión infecciosa y no infecciosa en la muestra de pacientes afectados con EET humanas y de animales afectados con tembladera, BSE y CWD.

Se reivindica un ligando de unión a priones según la reivindicación 1, un procedimiento *ex vivo* de detección de una proteína prión en una muestra según la reivindicación 3 y un procedimiento *ex vivo* de retirada de una proteína prión de una muestra según la reivindicación 4.

También se describe un procedimiento de tratamiento o de retardo del desarrollo de una patología asociada a prión en un sujeto. Por ejemplo, los ligandos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de patologías tales como ECJ, vECJ, GSS, insomnio letal, tembladera, BSE y CWD. Estos ligandos pueden actuar inhibiendo la polimerización de PrPsc o a través de la inhibición de la interacción de PrPsc y PrPc disminuyendo de este modo el desarrollo de PrPsc adicional.

También se describe un procedimiento para la identificación de ligandos adicionales, en particular de ligandos específicos para las formas conformacionalmente alteradas de proteínas, algunas de las cuales están implicadas en el desarrollo de enfermedades. La metodología descrita también es apropiada para el descubrimiento, la evaluación o el rastreo de un gran número de candidatos de fármacos potenciales que se unen directamente a PrPsc. Características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1. Señales quimioluminiscentes de perlas de una colección combinatoria que une haPrPc y haPrPsc de homogeneizado cerebral. PrPc y PrPsc se detectaron a través de la unión de un anticuerpo monoclonal específico (3F4) y anticuerpos secundarios conjugados de fosfatasa alcalina específicos para 3F4. La luz producida por un sustrato quimioluminiscente específico para fosfatasa alcalina se detectó sobre una película de autorradiografía. Las ubicaciones de las señales generadas por perlas de una colección combinatoria están numeradas. Los ligandos sobre las perlas se secuenciaron posteriormente. Estas perlas no produjeron una señal antes de la transferencia y desnaturalización, pero emitieron una fuerte señal después de la transferencia y desnaturalización de proteínas unidas y marcadas con el anticuerpo 3F4 conjugado a enzima.

FIGURA 2. Unión de huPrPc de extractos de cerebro humano normal a resinas de afinidad en un formato de columna. El homogeneizado cerebral y las perlas se prepararon y se equilibraron en tampones de fosfato (PBS) o bien de citrato fosfato dextrosa (CPD). La fuerza de la señal en las bandas de Western es una función de la fuerza de unión de PrPc a la resina. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular (PM); el carril 2, 20 µl de homogeneizado cerebral humano normal al 0,1%. El carril 3-8, PrPc eluida a partir de perlas.

FIGURA 3. Unión de huPrPsc de extractos de cerebro humano infectado con ECJ a resinas de afinidad en un formato de lote. La figura es una banda de Western que muestra la cantidad de prión eluido de perlas tras el contacto con un homogeneizado que contiene huPrPsc de un paciente con ECJ esporádica. Las perlas se lavaron tras el contacto con el homogeneizado que se trató con PK para revelar la presencia de PrPres o bien se mantuvo sin tratar. Éstos se hirvieron en tampón que contenía SDS para liberar proteína unida, y las muestras se redisolvieron por SDS-PAGE seguido de transferencia de bandas de Western. La unión de huPrPsc y PrPc a las resinas se demostró por la presencia de bandas específicas de PrP tras sondeo con un anticuerpo monoclonal, 3F4. Las secuencias de péptidos están indicadas en la parte superior del gel. Las muestras digeridas con PK se identifican como (+), las no digeridas como (-).

FIGURA 4. Unión de huPrPsc de extractos de cerebro humano infectado con ECJ a resinas de afinidad en un formato de columna. Las secuencias de péptidos están indicadas en la parte superior del gel. Las muestras previamente digeridas con PK se identifican como + y las no digeridas como -. Los controles incluyeron 20 µl de homogeneizado cerebral al 1%. PrPc y PrPsc se detectaron específicamente usando anticuerpo monoclonal 3F4 y se visualizaron por

detección de una señal quimioluminiscente.

FIGURA 5. Diagrama del ajuste de la transferencia de "bandas de perlas". Las perlas se someten a ensayo en un ges tras la incubación con materiales de partida. La proteína unida se transfiere desde las perlas y se captura sobre la membrana por medio de transferencia de forma capilar del tampón como se indica.

FIGURA 6. Retirada de PrPres de RBCC infectados por distintas resinas de afinidad. Los concentrados de glóbulos rojos (RBCC) se enriquecieron con homogeneizado cerebral de hámsteres infectados con tembladera y se pasaron en serie a través de columnas de resinas con distintos ligandos de afinidad. Las proteínas unidas a resina se analizaron por electroforesis en gel. El patrón de carga de gel se muestra en la tabla 11.

Descripción detallada

En el presente documento se describen ligandos que se unen a proteínas priones y sus aplicaciones. Los ligandos son proteínas, péptidos o polipéptidos que se unen con especificidad y afinidad a proteínas priones. Preferentemente, los ligandos tienen un peso molecular de 6 kDa o menos.

Los ligandos son útiles en procedimientos para la detección de proteína prión en una muestra, tal como un fluido biológico humano o animal o una muestra medioambiental, así como procedimientos para diagnosticar y tratar la enfermedad priónica. Por ejemplo, los ligandos de la invención pueden ser útiles para tratar y diagnosticar patologías tales como ECJ, vECJ, GSS, insomnio letal, tembladera, BSE y CWD y otras EET usando sangre completa, componentes de la sangre, células, suero, plasma, derivados de plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, lágrimas, amígdalas, apéndice y otros. Los ligandos también pueden ser útiles para la retirada de proteína prión de una muestra, tal como una muestra de sangre, componentes de la sangre, células, suero, plasma, derivados de plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, lágrimas, amígdalas, apéndice y otros. Los ligandos se usan para detectar o retirar todas las proteínas priones de la muestra o se pueden escoger selectivamente para detectar o retirar una forma única de proteína prión y por lo tanto, se pueden usar para distinguir entre proteína prión infecciosa y no infecciosa en la muestra.

Los procedimientos descritos se pueden usar para rastrear polímeros, compuestos sintéticos y colecciones de compuestos sintéticos para proporcionar otros ligandos para priones.

En el presente documento también se proporciona un procedimiento para la identificación de ligandos adicionales, en particular de ligandos específicos para las formas conformacionalmente alteradas de proteínas, algunas de las cuales están implicadas en el desarrollo de enfermedades.

También se proporciona una metodología que es apropiada para el descubrimiento, la evaluación o el rastreo de un gran número de candidatos de fármaco potenciales.

Definiciones

Los términos "un," "una" y "el/la", como se usan como se usa en el presente documento, se definen como "uno/a o más" e incluyen el plural a menos que el contexto sea inapropiado.

El término "3F4" se refiere al anticuerpo monoclonal específico para formas naturales de PrPc, pero no naturales de PrPsc o PrPres. El anticuerpo tiene especificidad para formas desnaturalizadas de PrPc, PrPsc y PrPres de hámster y de ser humano.

Como se usa en el presente documento, los términos "composiciones derivadas de sangre" y composiciones de sangre se usan de forma intercambiable y pretenden incluir sangre completa, concentrado de glóbulos rojos, plasma, suero, fracciones ricas en plaquetas y pobres en plaquetas, concentrados de plaquetas, glóbulos blancos, precipitados de plasma sanguíneo, precipitados de fraccionamiento de plasma sanguíneo y sobrenadantes, preparaciones de inmunoglobulina que incluyen IgA, IgE, IgG e IgM, concentrados de factor de coagulación purificado, concentrado de fibrinógeno, u otras composiciones distintas que proceden de seres humanos o animales. También incluye proteínas derivadas de sangre purificada preparadas por cualquiera de los distintos procedimientos comunes en la técnica, incluyendo intercambio de iones, afinidad, permeación en gel, y/o cromatografía hidrófoba o por precipitación diferencial.

El término "colección combinatoria" se refiere a una colección de productos químicos que se han sintetizado por técnicas de química combinatoria en fase sólida. Esta definición abarca el uso de un procedimiento de dividir-acoplar-recombinar que genera millones de péptidos aleatorios de una longitud definida o que se puede diseñar para incluir estructuras definidas. Los bloques de construcción pueden ser aminoácidos naturales, moléculas sintéticas, análogos de aminoácidos, análogos ramificados, colorantes de triazina y similares.

El término "variaciones conservadoras" o "variaciones modificadas conservadoras" de una secuencia particular se refiere a aminoácidos u otras estructuras estrechamente relacionadas que tienen una similitud química sustancial.

Además, las sustituciones, delecciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada son variaciones conservadoramente modificadas en las que las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos naturales que son sustituciones conservadoras entre sí:

1) Serina (S), treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), lisina (K);

5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V), alanina (A);

6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W).

Numerosos aminoácidos no naturales también se consideran sustituciones conservadoras de aminoácidos que se producen de manera natural. Se dice que dos polipéptidos son "idénticos" si la secuencia de residuos de aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para su correspondencia máxima tal como se describe a continuación. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede llevar a cabo por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático para Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

El término "ligando" se refiere a una molécula a la que se une una proteína, péptido o polipéptido. Los ligandos de la presente invención pueden ser preparaciones de anticuerpos, proteínas, péptidos, polipéptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, azúcares, lípidos, moléculas orgánicas, polímeros, y/o agentes terapéuticos putativos, y similares.

Los términos "proteína" "péptido", "polipéptido" y "oligopéptido" se usan de forma intercambiable y se definen en el presente documento como una cadena de aminoácidos en la que los carbonos están ligados a través de enlaces peptídicos formados por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (es decir, el amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como tal, el término "extremo amino terminal" (abreviado como extremo N-terminal) se refiere al grupo amino libre en el aminoácido en el extremo amino terminal del péptido, o al grupo amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. Asimismo, el término "extremo carboxi terminal" (abreviado como extremo C-terminal) se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido en el extremo carboxi terminal de un péptido, o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del péptido. Cuando se sintetiza en una resina por síntesis de Merrifield, normalmente el grupo carboxilo C-terminal se acopla a la resina a través de un enlace peptídico a un grupo amino inmovilizado.

Normalmente, los aminoácidos que forman un péptido están numerados por orden, comenzando en el extremo amino terminal y aumentando en la dirección del extremo carboxi terminal del péptido. Por tanto, cuando se dice que un aminoácido "sigue" a otro, ese aminoácido está situado más cerca del extremo carboxi terminal del péptido que el aminoácido "precedente".

El término "PrPc" se refiere a la molécula de proteína prión natural que está expresada de forma natural y amplia dentro del cuerpo de los mamíferos. Su estructura está altamente conservada y no está asociada con un estado de enfermedad.

El término "PrPsc" se refiere a la forma conformacionalmente alterada de la molécula de PrPc que es la que se piensa que podría ser infecciosa y está asociada con enfermedades EET/prión, incluyendo vECJ, ECJ, kuru, insomnio letal, GSS, tembladera, BSE, CWD, y otras ETT raras de animales en cautiverio y experimentales. Tiene la misma secuencia de aminoácidos que la PrPc celular normal, pero ha convertido algunas de las hélices α en láminas β y está asociada con un estado de la enfermedad.

El término "PrPres" se refiere a los derivados resistentes a proteinasa de la proteína PrPsc de 27-30 kDa que permanecen tras la digestión parcial de de PrPsc con PK.

El término "PrPr" se refiere a la proteína prión expresada por tecnología recombinante.

El término "PrP" se refiere a la proteína prión en general.

El término "residuo" se usa en el presente documento para referirse a un aminoácido (D o L) o un aminoácido mimético que se incorpora en un oligopéptido por un enlace amida o un mimético de enlace amida. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido que se produce de manera natural o, a menos que se limite de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que operan de forma similar a los aminoácidos que se producen de manera natural (es decir, miméticos de aminoácidos). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones del esqueleto peptídico bien conocidas por los expertos en la técnica.

El término "identidad sustancial" significa que un polipéptido comprende una secuencia que tiene en común al menos un 66% o más de aminoácidos. Otra indicación de que las secuencias de polipéptidos son sustancialmente idénticas es si un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos que surgen frente al péptido dado a conocer. Por tanto, los péptidos de la invención incluyen péptidos y otros productos químicos inmunológicamente reactivos con anticuerpos que surgen frente a los péptidos inmunogénicos dados a conocer.

El término "que puede unirse" como se usa en el presente documento se refiere a la unión de dos o más moléculas para formar un complejo entre sí, por ejemplo, la unión de un ligando con una proteína o un péptido, bajo condiciones, en la que las dos o más moléculas pueden formar un complejo, tal como un complejo proteína-ligando.

Ligandos que se unen a una secuencia de aminoácidos particular de PrP

Los ligandos de unión a prión descritos en el presente documento son todos moléculas pequeñas, preferentemente péptidos. Los ligandos se unen a péptidos, polipéptidos derivados de la proteína prión, o a la molécula de prión completa. Como se usa en el presente documento, no está implicada ninguna longitud concreta por el término "péptido". Preferentemente, los ligandos descritos en el presente documento se unen a una proteína prión que tiene una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

RYPxQ(SEC ID N.º:221)
En la que x es G, P o N

XxYYux (SEC ID N.º: 222)

en la que x es cualquier aminoácido, y u es R o Q.

Más preferentemente, los ligandos se unen a una proteína prión que tiene una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

RYPGQ(SEC ID N.º: 1)
DRYYRD (SEC ID N.º: 2)
QUYYQR(SEC ID N.º: 3)
QUYYRP(SEC ID N.º: 4)

Los péptidos marcados que tienen una o más de las secuencias de aminoácidos proporcionadas anteriormente son útiles cuando se usan para sondear colecciones combinatorias para ligandos que se unen a priones. Preferentemente, los péptidos están radiomarcados y acetilados en el extremo amino terminal y amidados en el extremo carboxi terminal cuando se usan para el rastreo de colecciones para ligandos de priones.

La secuencia de aminoácidos de los ligandos descrita en el presente documento carece de las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en el documento WO 01/77687, que se unen a la secuencia de repetición de octapéptido de la proteína prión.

Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 1 siguiente (SEC ID N.º 5-13) son ejemplos de secuencias de aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 1. Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 1 se identificaron en una colección 6-mera rastreada para 6-meros que se unen a la SEC ID N.º: 1. La colección se construyó con una alanina (A) como espaciador entre la resina y los péptidos combinatorios de la colección y se representa como la A final en las secuencias que está incluida en la tabla 1. Los expertos en la técnica comprenderán que los ligandos proporcionados en la presente no se limitan a aquellos que tienen las secuencias ilustrativas que se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 1

SEC ID N.º	SECUENCIA
5	KIHKFLA

6	GTHDFQA
7	KFGSTHA
8	FVNEIEA
9	GLHFKSA
10	GRVLHHA
11	QKNSEWA
12	HAYFTHA
13	WPKGAVA

Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 2 (SEC ID N.º: 14-22) son ejemplos de secuencias de aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 2. Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 2 se identificaron en una colección 6-mera rastreada para 6-meros que se unen a la SEC ID N.º: 2. La colección se construyó con una alanina (A) como espaciador entre la resina y los péptidos combinatorios de la colección y está representada como la A final en las secuencias. El aminoácido lisina (K) está presente once veces, y el aminoácido histidina (H) está presente siete veces, ambos están por encima de una distribución promedio de tres. Por lo tanto, se prefieren seis-meros que contienen el aminoácido lisina (K) o histidina (H).

Tabla 2
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 2

SEC ID N.º	SECUENCIA
14	RPWKKAA
15	PKHIWPA
16	HKLWGVA
17	GGYKPYA
18	ENVSQNA
19	HTYYNGA
20	KKKSDHA
21	HHLKGTA
22	KKHGVWA

Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 3 siguiente (SEC ID N.º: 23-31) son ejemplos de secuencias de aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 3. Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 3 se identificaron en una colección 6-mera rastreada para 6-meros que se unen a la SEC ID N.º: 3. La colección se construyó con una alanina (A) como espaciador entre la resina y los péptidos combinatorios de la colección y está representada como la A final en las secuencias. En los casos de ambigüedad en la identificación de la secuencia, se dan uno o más aminoácidos en una única posición en la tabla, por ejemplo, (A/G) como se muestra en la SEC ID N.º: 29. El aminoácido histidina (H) aparece 10 veces en estas secuencias, se encuentra en seis de los ocho péptidos, y está muy por encima de una distribución promedio de tres. Todos los péptidos excepto el SEC ID N.º: 23 tienen una carga neta positiva a pH 7. Por lo tanto, son preferentes seis-meros que contienen el aminoácido histidina (H) y péptidos que tienen una carga neta positiva a pH 7.

Tabla 3
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 3

SEC ID N.º	SECUENCIA
23	DGTQAHA
24	APHRNNA
25	HHGHNIA
26	HTWHGQA
27	HVFVTWA
28	THHFYIA

29	KLGWG(A/G)A
30	GSKKKEA

Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 4 siguiente (SEC ID N.º: 31-47) son ejemplos de secuencias de aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 4. Las secuencias de aminoácidos expuestas en la tabla 4 se identificaron en una colección 6-mera rastreada para 6-meros que se unen a la SEC ID N.º: 4. La colección se construyó con una alanina (A) como espaciador entre la resina y los péptidos combinatorios de la colección y está representada como la A final en las secuencias. Los expertos en la técnica entenderán que los ligandos proporcionados en el presente documento no se limitan a aquellos que tienen las secuencias ejemplares expuestas en esta tabla 4. En los casos de ambigüedad en la identificación de la secuencia, se dan uno o más aminoácidos en una única posición, por ejemplo, (W/G) como se demuestra en la SEC ID N.º: 33. El aminoácido en la segunda posición de la SEC ID N.º: 37 no se pudo identificar positivamente. La secuencia "LL" (dos leucinas) aparece en las SEC ID N.º: 31, 32, 41, 43 y 45 y sus análogos cercanos LI, VL, II (isoleucina o valina) aparecen en las SEC ID N.º: 33, 36, 38, 40 y 44. LL no aparece en ningún otro rastreo para péptidos derivados de priones o proteínas. Además, 15 de 17 péptidos contienen un aminoácido aromático, tal como fenilalanina, triptófano o tirosina (F, W o Y). Siete secuencias peptídicas tienen carga neutra, pero tienen un grupo amino terminal positivo.

Tabla 4
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a la SEC ID N.º: 4

SEC ID N.º	SECUENCIA
31	PLLVVWA
32	WLLVGGA
33	(W/G)QVLVYA
34	RRHQRQA
35	LPWTFGA
36	IFIIITA
37	P(X)IEPHA
38	EWGIIWA
39	GWYIYFA
40	TLILFHA
41	FLLSNHA
42	WQIRFFA
43	VLLVFEA
44	GWVLEIA
45	FLLIDTA
46	GFLFKFA
47	PWTIYIA

Ligandos que se unen a PrPc de hámster

El ligando es un péptido que se une con especificidad y selectividad a una o más formas de proteínas priones encontradas en una especie particular, tales como un ser humano u otro mamífero, tal como un hámster. A continuación se proporcionan ligandos ejemplares que se unen a proteína prión (PrPc), que tienen diferentes longitudes de secuencia de aminoácidos, dos-mera, tres-mera, cuatro-mera, cinco-mera y seis-mera, tienen preferentemente un peso molecular de 6 kDa o menos.

Ligandos dos-meros ejemplares que se unen a prion natural en hámsteres (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 48-50, que se enumeran en la tabla 5A. El ligando contiene el aminoácido triptófano (W). El ligando está cargado neutralmente, pero tiene un grupo amino terminal con carga positiva a pH 7. El ligando es un dos-mero que contiene el triptófano (W). La sustitución de naftil-alanina (na) por triptófano también da como resultado la unión de PrP en estas secuencias. La colección se sintetizó directamente sobre la resina (una resina amino Toyopearl™ de Tosoh Bioscience LLC, Monctgomerville, PA) sin un espaciador. La SEC ID N.º: 50 se encontró dos veces (2x) en los rastreos.

Tabla 5A
Secuencias de dos aminoácidos que se unen a haPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
48	WH
49	WW
50	LW (2x)

2x indica secuencias encontradas dos veces en el rastreo

Ligandos tres-meros ejemplares que se unen a prion en hámsteres (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 51-61, que se enumeran en la tabla 5B. Un aminoácido aromático, F, W o Y aparece en todos los péptidos seleccionados excepto en la SEC ID N.º: 60. El aminoácido A aparece tres veces en la posición más cercana a la resina y se usó como espaciador entre la resina y el péptido de la colección en algunas de las colecciones. No están presentes ni R ni K, pero E aparece tres veces proporcionando una carga negativa a tres de las ocho secuencias.

Tabla 5B
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a haPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
51	WNA
52	EFW
53	LPW
54	YEY
55	WPA
56	FNQ
57	YHE
58	LFA
59	NHY
60	TLG
61	WVD

Ligandos cuatro-meros ejemplares que se unen a prion en hámsteres (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 62-64, que se enumeran en la tabla 5C. La colección se construyó con un espaciador de alanina entre la resina y el péptido combinatorio y está presente en las secuencias siguientes en la última posición. Un aminoácido aromático aparece en la primera posición de todos los péptidos seleccionados. Además, todos los péptidos seleccionados contienen un aminoácido ácido (D o E) en la tercera o cuarta posición. WXD aparece una vez, en la que X es cualquier aminoácido.

Tabla 5C
Secuencias de cuatro aminoácidos que se unen a haPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
62	YWDQA
63	YVHEA
64	WFDEA

Ligandos cinco-meros ejemplares que se unen a prion en hámsteres (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 65-68, que se enumeran en la tabla 5D. Un aminoácido aromático y un aminoácido ácido aparecen en todos los péptidos seleccionados. D o E están presentes en la posición 4 ó 5 de todos los ligandos. La secuencia WXD aparece en las SEC ID N.º: 65, 67 y 68.

Tabla 5D
Secuencias de cinco aminoácidos que se unen a haPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
65	LQWYDA
66	YTHSEA

67	WIDYEA
68	VWIDAA

Ligandos seis-meros ejemplares que se unen a prion natural en hámsteres (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 69-100, que se enumeran en la tabla 5E. La colección se construyó con un espaciador de alanina entre la resina y el péptido combinatorio y está presente en las secuencias siguientes en la última posición. Un aminoácido aromático, F, W o Y aparece en la mayoría (29 de 32) de los péptidos seleccionados como ocurre con D o E (29 de 32). Además, 20 péptidos tienen dos aminoácidos aromáticos en su secuencia. El secuencia consenso "WXD" aparece en las SEC ID N.º: 75, 79, 83, 86 y 89. Una secuencia que contiene una (F/W/Y)X(D/E)(F/W/Y) SEC ID N.º:)) aparece en las SEC ID N.º: 71, 73, 77, 78, 91 y 95 y (F/W/Y)(D/E)X(F/W/Y) SEC ID N.º:)) aparece en las SEC ID N.º: 70, 72, 82, 91 y 95. Veinticuatro de los 32 péptidos tienen un aminoácido aromático más un grupo ácido en las posiciones 1-3; 23 tienen una carga negativa neta en las posiciones 4-6. Veinte péptidos tienen tanto un aminoácido aromático más como un aminoácido ácido en las posiciones 1-3 y también son de carga negativa neta en las posiciones 4-6.

Tabla 5E
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a haPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
69	WDEAEEA
70	YDSYDDA
71	NDFIDFA
72	YEPWGSA
73	EYGDWWA
74	WDYDQEA
75	DWGDPFA
76	DWPEVWA
77	FHDFSEA
78	DTFWDYA
79	WNDLDNA
80	ASALVYA
81	LINAGGA
82	WESYVTA
83	WSDEGYA
84	YRWTGPA
85	YEDQWQA
86	EWADDNA
87	YEIDYGA
88	EFGYFDA
89	WGDEQDA
90	HEEDWAA
91	FEDFELA
92	TWGIDEA
93	WDPTDYA
94	NDKIHTA
95	FEDFFSA
96	YEWAEQA
97	THVYFLA

98	(S/T/W)XDFSDA
99	YRTPNEA
100	(G/L)RSETA

Ligandos que se unen a PrPc de hámster y PrPsc de hámster

A continuación se proporcionan ligandos que se unen tanto a la proteína prión (PrPc) como a la (PrPsc) cambiada conformacionalmente. Ligandos tres-meros ejemplares que se unen a prion en hámsteres (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 101-115, que se enumeran en la tabla 6. Un aminoácido aromático aparece en la mayoría (15 de 18) de los péptidos seleccionados como ocurre con D o E (15 de 18). Además, siete péptidos tienen dos estructuras aromáticas y un aminoácido ácido. La secuencia WXD aparece en las SEC ID N.º: 105 y 115. Las estructuras seleccionadas para unirse de forma preferente a PrPsc sobre PrPc son las SEC ID N.º: 111 y SEC ID N.º: 114, teniendo ambas R en la posición 3. SEC ID N.º: 101-115 se identificaron en una colección 3-mera porque se unen a haPrPc y/o PrPsc a partir de homogeneizado cerebral infectado de tembladera solos (*), o bien mezclados con cerebro de hámster normal.

Tabla 6
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a haPrPc y a haPrPsc

SEC ID N.º	Secuencia	Color de la perla (rojo muestra unión a PrPc fuerte)	Señal lumínica tras desnaturalización (fuerte muestra fuerte unión a PrPc y/o PrPsc)
52	EFW*	Rosa brillante	Fuerte
54	YEY	Rosa	
101	IHN	Rosa claro	
102	WEY	Rosa brillante	
103	DYW	Rosa	
104	WDW	Rosa	
105	WQD	Rosa	
106	YFE	Rosa	
106	YFE*	Rojo	Fuerte
107	NYE	Rosa	
108	SYA	Rosa claro	Ninguno
109	WDL	Rosa brillante	Fuerte
110	WLE	Rosa brillante	Débil
111	VQR	Rosa brillante	Muy fuerte
112	YID*	Rosa brillante	Fuerte
113	RWD*	Rosa brillante	Fuerte
114	DVR*	Blanco	Fuerte
115	WSD*	Rojo	Fuerte

Ligandos que se unen a PrPc humana

A continuación se proporcionan ligandos que se unen a proteína prión (huPrPc). Ligandos tres-meros ejemplares que se unen a prión en humanos (haPrPc) se exponen en las SEC ID N.º: 116-139, que se enumeran en las tablas 7 A y B. De las secuencias trímeras (tabla 7A) W/YXD aparece en cuatro de las seis secuencias trímeras y cinco de las seis tienen un residuo hidrófobo y un aminoácido ácido.

Tabla 7A
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a huPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
116	HWD
117	WQD

118	WDD
119	WED
120	ITN
121	YED

La colección seis-mera se construyó con un espaciador de alanina entre la resina y el péptido combinatorio y está presente en las secuencias siguientes en la última posición (tabla 7B). Los aminoácidos F, W o Y aparecen en 13 de los 18 péptidos 6-meros, y D o E en 17 de los 18 péptidos. Seis péptidos tienen un aminoácido aromático y uno ácido en las posiciones 1-3 y también son de carga negativa neta en las posiciones 4-6. Además, cinco péptidos tienen dos estructuras aromáticas y un aminoácido ácido. WxD está presente en la SEQ ID N.º: 124 y (F/W/Y)x(D/E)(F/W/Y) (SEC ID N.º: 223) está presente en las SEC ID N.º: 124 y 133. Excluyendo la carga de amino N-terminal, la mayoría de las secuencias son de carga negativa neta y sólo la SEQ ID N.º: 139 lleva una carga positiva neta parcial a pH neutro. SEC ID N.º: 116-121 se identificaron en una colección 3-mera que se une a huPrPc a partir de homogeneizado cerebral humano normal. SEC ID N.º: 122-139 se identificaron en una colección 6-mera que se une a huPrPc derivado de plasma pobre en plaquetas humanas o bien de plasma rico en plaquetas (*).

Tabla 7B
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a huPrPc

SEC ID N.º	SECUENCIA
122	RVADEEA
123	EYYVDAA
124	WQDFNLA
125	YDNPIDA
126	YFNEHEA
127	EWGADGA
128	DVIYSHA
129	WHILEEA*
130	NPHENFA*
131	HEDNGGA
132	SDSEGPA
133	EFQEFTA
134	QEGDEIA
135	DIYAETA
136	DRVRETA
137	FEEPQWA*
138	FEGEEFA*
139	(T/L)FNIHA*

* huPrPc derivado de plasma rico en plaquetas unido

Ligandos que se unen a PrP recombinante humana

A continuación se proporcionan ligandos que se unen a proteína prión (PrPr). Ligandos tres-meros ejemplares que se unen a prión recombinante en seres humanos (huPrPr) se exponen en las SEC ID N.º: 54, 105,140-153, que se enumeran en la tabla 8. Los aminoácidos W, F o Y aparecen en todos los 16 péptidos seleccionados y D o E en 13 de los 16 péptidos. La secuencia consenso WXD aparece en las SEC ID N.º: 105, 143 y 145. Algunos péptidos se han identificado previamente porque se unen a PrPc y las SEC ID N.º: 149 y 153 se identificaron dos veces en este rastreo. SEC ID N.º: 54 105, 140-153 se identificaron en una colección 3-mera porque se unen a huPrPr (Prionics AG, Suiza, N.º de cat. 03-040) diluido en (*) sarcosilo al 0,5% o (**) PBS. En la tabla 8, se expusieron 2,5 mg de peso seco de resina de una colección combinatoria por columna a 0,5 µg/ml de PrPr diluido en sarcosilo al 0,5% (*) o en solución salina tamponada con fosfato (**) que contiene BSA al 1%. Las secuencias que se encontraron dos veces en el rastreo se indican como 2x.

Tabla 8
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a huPrPr

SEC ID N.º	SECUENCIA
54	YEY**
105	WQD* y **(2x)
140	YDW*
141	NYT*
142	SYT*
143	WAD*
144	QWG*
145	WGD*
146	EYF*
147	WEH*
148	LYD*
149	DYY**(2x)
150	FYE**
151	EYY**
152	YDY**
153	WDH** (2x)

(*)PrPr humana diluida en sarcosilo al 0,5%
(**)PrPr humana diluida en PBS
2x indica secuencias encontradas dos veces en el rastreo

Ligandos seis-meros que se unen a PrPc humana, PrPsc humana o a ambas

En la tabla 9A se proporcionan ligandos seis-meros que se unen a proteína prión (PrPc), proteína prión cambiada conformacionalmente (PrPsc), o a ambas. La colección seis-mera se construyó con un espaciador de alanina entre la resina y el péptido combinatorio y está presente en las secuencias siguientes en la última posición. Los ligandos se pueden unir preferentemente a huPrPsc. Los ligandos ejemplares se exponen en las SEC ID N.º: 154-173, que se enumeran en la tabla 9A. Todos los ligandos excepto la SEC ID N.º: 156 contenían un aminoácido aromático y 15 de 20 contenían un aminoácido ácido. Aquellos con mayor especificidad por huPrPsc sobre PrPc son las SEC ID N.º: 154, 155 y 156. La detección de ligandos con un incremento en la especificidad para PrPsc en un homogeneizado cerebral procedente de un paciente de ECJ esporádica se obtuvo a través de proteolisis selectiva de PrPc antes de la transferencia de proteína desde las perlas hasta la membrana. Esta colección incluía el aminoácido aromático no natural 2-naftil-alanina (na).

Tabla 9A
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a huPrPc, huPrPsc o a ambas

SEC ID N.º:	Secuencia
154*	RES(na)NVA
155*	ES(na)PRQA
156*	VARENIA
157*	RWEREDA
158**	EWWETV
159**	SVYQLDA
160**	(na)HEFYGA
161**	HE(na)(na)LVA
162**	A(na)VPV(na)A
163**	YFDYWLA

164**	FE(na)HRQA
165**	WRHEPAA
166***	SS(na)KKDA
167***	R(na)DKEAA
168****	(na)HEIFPA
169****	KWYHHRA
170****	HWWPHNA
171****	HWQVFYA
172****	FHE(na)EIA
173****	HADF(na)QA

* homogeneizado cerebral (huPrPsc) de ECJ esporádica al 0,5% sin tratamiento con PK
** homogeneizado cerebral de huPrPsc al 5% sin tratamiento con PK
*** homogeneizado cerebral de huPrPsc al 0,5% con tratamiento con PK, pero sin desarrollo de color
**** homogeneizado cerebral de huPrPsc al 5% con tratamiento con PK, pero sin desarrollo de color
na indica 2-naftil-alanina

Ligandos que se unen a PrPsc humana

A continuación se proporcionan ligandos que se unen a proteína prión cambiada conformacionalmente (PrPsc). Las colecciones seis-meras se construyeron con un espaciador de alanina entre la resina y el péptido combinatorio y se incluyen en las secuencias siguientes en la última posición. Ligandos ejemplares se exponen en las SEC ID N.º: 174-194, que se enumeran en la tabla 9B. SEC ID N.º: 188, 189, 190 y 191 mostraron todas la mayor diferenciación de señal (señal de color blanco y luz fuerte). SEC ID N.º: 174-194 se identificaron en una colección 6-mera que se une a huPrPsc a partir de homogeneizado cerebral de ECJ esporádica enriquecido en plasma humano. Las perlas con ligandos con la mayor especificidad para PrPsc fueron blancas en la tinción para PrPc, pero produjeron una fuerte señal quimioluminiscente tras la desnaturalización.

Tabla 9B
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a huPrPsc

SEC ID N.º	Secuencia
174*	ALHFETA
175*	DDPTGFA
176*	VAPGLGA
177*	IFRLIEA
178*	GLERPEA
179*	IVVRLWA
180*	WHNPHYA
181*	LIYKSDA
182**	EKPIFNA
183**	HWSEPAA
184**	GHNWKEA
185**	YWHHDDA
186**	GYPKENA
187**	PVYWLYA
188***	FGEHTPA
139***	FQGTREA
190***	TGTNRYA
191***	KWATRYA

192***	NSTKFDA
193***	LIYKEEA
194***	EHATYRA

* perlas de 100-300 µm rastreadas con homogeneizado cerebral derivado de cerebro con ECJ esporádica (huPrPsc) con tratamiento con PK
** perlas de 100-300 µm rastreadas con huPrPsc sin tratamiento con PK
*** perlas de 65 µm rastreadas con huPrPsc sin tratamiento con PK

Ligandos tres-meros que se unen a PrPc humana, PrPsc humana o a ambas

A continuación se proporcionan ligandos tres-meros que se unen a proteína prión (huPrPc), proteína prión cambiada conformacionalmente (PrPsc), o a ambas. Los ligandos se pueden unir de forma preferente a huPrPsc. Los ligandos ejemplares se exponen en las SEC ID N.º: 195-212, que se enumeran en la tabla 9C. En este rastreo, el homogeneizado cerebral de ECJ esporádica se diluyó en CPD y se usó como fuente de huPrPsc. HYD se descubrió 3 veces en este rastreo. Las perlas rojas significaron la unión de PrPc; 8 de 13 secuencias contenían H. Los aminoácidos F, W o Y se encontraron en las 13, y R o K aparecieron sólo una vez. Tres de cinco perlas que unieron de forma preferente PrPsc (señal fuerte) con relación a PrPc (perla blanca) contenían K o R. WXD apareció las en SEC ID N.º: 200 y 208. Las SEC ID N.º: 195-212 se identificaron en una colección 3-mera que se une a huPrPc y/o huPrPsc tratado con PK.

Tabla 9C
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a huPrPc, huPrPsc o a ambas (resistente a PK)

SEC ID N.º	Secuencia
195*	HND
196*	HER
197*	HGD
198*	HSD
199*	HFD
200****	WND
201****	YEH
202****	HWD
203****	YHD
204****	YDW
205****	WDY
206**	HYD (3x)
207**	HWD
208**	WTD
209***	FPK
210***	HWK
211***	WEE
212***	LLR

* huPrPsc al 0,5% en sarcosilo al 0,05% más tratamiento PK
** huPrPsc al 1,0% en sarcosilo al 0,1% sin tratamiento con PK
*** huPrPsc al 1,0% en sarcosilo al 0,1% con tratamiento con PK
**** se seleccionaron perlas del gel antes de la transferencia; para las SEC ID N.º: 204 y 205, las perlas incubadas en huPrPsc al 0,1% en sarcosilo al 0,01% con tratamiento con PK se seleccionaron después del lavado y se tomaron directamente del gel

Ligandos tres-meros que se unen a PrPc humana, PrPsc humana o a ambas

A continuación se proporcionan ligandos tres-meros que se unen a proteína prión (PrPc), proteína prión cambiada conformacionalmente (PrPsc), o a ambas. Los ligandos se pueden unir de forma preferente a huPrPsc. Los ligandos

ejemplares se exponen en las SEC ID N.º: 147, 152, 206 213y 214, que se enumeran en la tabla 9D. Estas secuencias se identifican en una colección 3-mera que se une a huPrPsc y/o huPrPc a partir de homogeneizado cerebral de ECJ esporádica en (*) tampón CPD o (**) PBS.

Tabla 9D
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a huPrPc, huPrPsc o a ambas

SEC ID N.º	Secuencia
147*	WEH
152*	YDY
206*	HYD
213**	SYF
214**	EYY

(*) homogeneizado cerebral de ECJ esporádica diluido en tampón CPD
(**) homogeneizado cerebral de ECJ esporádica diluido en PBS

Síntesis de Ligandos

Los ligandos descritos en el presente documento se pueden producir por síntesis química. En la técnica son comunes una variedad de procedimientos de síntesis proteica, incluyendo la síntesis que usa un sintetizador de péptidos. Véase, por ejemplo, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Bodasnsky, Ed. Springer-Verlag, 1988; Merrifield, Science 232: 241-247 (1986). Preferentemente, los péptidos se sintetizan, se purifican y después se acoplan a una resina o una membrana usada para el rastreo. De forma alternativa, los péptidos se sintetizan directamente sobre una resina, y los péptidos unidos a la resina entonces se purifican.

Los péptidos se purifican de modo que estén sustancialmente libres de precursores químicos o de otros productos químicos usados en técnicas de purificación de péptido convencionales. El lenguaje "sustancialmente libre de precursores químicos o de otros productos químicos" incluye preparaciones de un péptido en las que el péptido se separa de precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis del péptido.

La síntesis química de péptidos facilita la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales, incluyendo aminoácidos D y otras moléculas orgánicas pequeñas. La sustitución de uno o más aminoácidos L en un péptido por la correspondiente isoforma de aminoácido D se puede usar para incrementar la resistencia de los péptidos a la hidrólisis enzimática, y para potenciar una o más propiedades de los péptidos activos, tales como la unión a prion o ligando. El péptido prión y los ligandos péptidos descritos en el presente documento pueden ser polímeros de aminoácidos L- o D, o una combinación de ambos. También se incluyen ligandos en los que análogos de los ligandos péptidos descritos en el presente documento están presentes en uniones no peptidilo.

Por ejemplo, en distintas realizaciones, los ligandos péptidos son péptidos de isómeros D-retro-inversos. El término "isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en el que la dirección de la secuencia se revierte y la quiralidad de cada residuo aminoácido se invierte.

Véase, por ejemplo, Jameson y cols., Nature, 368: 744-746 (1994). El resultado neto de combinar D-enantiómeros y de revertir la síntesis es que las posiciones de los grupos carbonilo y amino en cada enlace amida se intercambian, mientras que la posición de los grupos de cadena lateral en cada carbono α se mantiene. A menos que se establezca de otro modo, se supone que cualquier secuencia de aminoácidos L dada de la invención se puede elaborar en un péptido de isómero D-retro-inverso.

En la secuencia peptídica se pueden introducir otras uniones cruzadas covalentes para constreñir la estructura del esqueleto peptídico. Esta estrategia se puede usar para desarrollar análogos de péptidos con un incremento de la potencia, selectividad y estabilidad. A menudo la macrociclización se lleva a cabo formando un un enlace amida entre los extremos N- y C-terminales peptídicos, entre una cadena lateral y el extremo N- o C-terminal, por ejemplo, con K3Fe(CN)6 a pH 8,5 (Samson y cols., Endocrinology, 137: 5182-5185 (1996)) o entre dos cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, DeGrado, Adv. Protein Chem., 39: 51-124 (1988).

Otros procedimientos también pueden introducir constreñimientos conformacionales en secuencias peptídicas para mejorar su potencia, estabilidad y selectividad. Estos incluyen el uso de C metilaminoácidos α (véase, por ejemplo, Rose y cols., Adv. Proteína Chem., 37: 1-109 (1985)) o N metilaminoácidos α (véase, por ejemplo, Aubry y cols., Int. J. Pept. Proteins Res., 18: 195-202 (1981)).

Si se desea, dos o más ligandos péptidos pueden estar presentes en múltiples copias. Pueden estar presentes copias idénticas de uno o más péptidos (por ejemplo, homodímeros, homotrímeros, etc.), o pueden estar presentes múltiples copias de péptidos que varían en la secuencia (por ejemplo, heterodímeros, heterotrímeros, etc.).

Como alternativa, los ligandos se sintetizan usando metodología de ácidos nucleicos recombinante. Generalmente, esto implica crear una secuencia de ácidos nucleicos que codifique los ligandos, colocando el ácido nucleico en un casete de expresión bajo el control de un promotor concreto, expresando la proteína en un huésped, aislando la proteína expresada y, si es necesario, renaturalizando la proteína. Los expertos en la técnica conocen técnicas suficientes para guiar a un experto a través de tales procedimientos.

Una vez expresados, los ligandos recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar, incluyendo precipitación de sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Se prefieren composiciones sustancialmente puras con una homogeneidad de aproximadamente el 50 al 95%, y lo más preferido es una homogeneidad de aproximadamente el 80 al 95% o mayor para su uso como agentes terapéuticos.

Opcionalmente, los ligandos se combinan en proteínas de mosaico. Normalmente, 2 a 20 de los ligandos se fusionan en un único polipéptido por técnicas recombinantes o sintéticas.

En procedimientos recombinantes, las proteínas de mosaico se elaboran uniendo ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes que codifican péptidos inmunogénicos. Estos ácidos nucleicos se pueden ligar enzimáticamente (por ejemplo, usando una enzima ADN ligasa) o sintéticamente. Alternativamente, se puede sintetizar un único ácido nucleico que codifica múltiples péptidos ligandos. En cada caso, el ácido nucleico resultante codifica múltiples ligandos, todos en el mismo marco de lectura. Por tanto, el polipéptido traducido comprende ligandos de unión a priones.

Cuando los ligandos se elaboran por procedimientos sintéticos químicos automáticos, los concatémeros de péptidos se pueden acoplar directamente. Esto se realiza químicamente uniendo péptidos usando procedimientos químicos estándar. De forma alternativa, un polipéptido se puede producir sintéticamente, lo que codifica múltiples péptidos ligandos.

Identificación de ligandos

Además de los ligandos expuestos anteriormente en las tablas, se pueden identificar otros ligandos como sigue. Las colecciones de péptidos se sintetizan y se rastrean para determinar la capacidad de unión a analitos de priones. Los ligandos pueden ser de cualquier longitud. Sin embargo, se prefieren longitudes de dos a seis aminoácidos. Los péptidos sintéticos se inmovilizan sobre perlas, y las perlas se empaquetan en una columna de cromatografía. Después, el analito de prión se pasa a través de la columna y el analito unido se detecta usando procedimientos convencionales, tales como por un anticuerpo marcado específico para proteína prión. Las perlas a las que se ha unido el analito se identifican como ligandos adecuados.

Uso de ligandos para retirar priones

Los ligandos que se unen a priones o a fragmentos de priones son útiles para una variedad de aplicaciones analíticas, preparativas y diagnósticas. Los ligandos de unión a priones se pueden inmovilizar sobre un soporte tal como una perla o membrana, y se pueden usar para unir y retirar un prión de una muestra. La fase sólida a la que se unen los ligandos se deja en contacto con la muestra, tal como un fluido biológico, bajo condiciones suficiente para provocar la formación de un compuesto prión-ligando, y la proteína prión en la muestra se une al ligando. Después, la fase sólida se separa de la muestra, retirando de este modo la proteína prión unida al ligando, que está unido a la fase sólida, de la muestra. Por ejemplo, en la técnica se conocen bien resinas y membranas para la retirada de contaminantes, tales como las descritas en la patente de los Estados Unidos N.º 5.834.318 de Baumbach y cols. y en el documento WO 01/77687.

Ejemplos de muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, composiciones derivadas de sangre o suero. Otras muestras biológicas incluyen líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, leche, fluido ductal, lágrimas o semen. Otras muestras pueden contener colágeno, extractos cerebrales y glandulares.

En la técnica se conocen muchos procedimientos para inmovilizar moléculas a una variedad de superficies sólidas. Por ejemplo, la superficie sólida puede ser una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa), una placa de microvaloración (por ejemplo, PVC, polipropileno o poliestireno), un tubo de ensayo (vidrio o plástico), una tira reactiva (por ejemplo, vidrio, PVC, polipropileno, poliestireno, látex y similares), un tubo de microcentrífuga, o una perla de vidrio, de sílice, de plástico, metálica o de polímero. El componente deseado se puede unir covalentemente, o se puede unir de forma no covalente a través de unión no específica.

Una amplia variedad de polímeros orgánicos e inorgánicos, tanto naturales como sintéticos, se pueden emplear como el material para la superficie sólida. Polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poliacrilato, poli(tereftalato de etileno), rayón, nailon, poli(butirato de vinilo), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, y similares. Otros materiales que se pueden emplear incluyen papel, vidrios, cerámicos, metales, metaloides, materiales

semiconductores, cementos o similares. Además, se pueden usar sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ejemplo, gelatinas), lipopolisacáaridos, silicatos, agarosa y poliacrilamidas. También son adecuados polímeros que forman varias fases acuosas, tales como dextranos, polialquilenglicoles o tensioactivos, tales como fosfolípidos, sales de alquilamonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares. Donde la superficie sólida es porosa, se pueden emplear distintos tamaños de poro dependiendo de la naturaleza del sistema. Además, el péptido se puede incorporar durante la polimerización de la superficie sólida.

En la preparación de la superficie, se pueden emplear una pluralidad de diferentes materiales, por ejemplo, láminas, para obtener diversas propiedades. Por ejemplo, se pueden usar recubrimientos de proteínas, tales como gelatina, para evitar la unión no específica, simplificar la conjugación covalente y potenciar la detección de señal o similares.

Si se desea una unión covalente entre un compuesto y la superficie, normalmente la superficie será polifuncional o se podrá polifuncionalizar. Los grupos funcionales que pueden estar presentes sobre la superficie y usado para la unión pueden incluir ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. Se conoce bien la forma de unir una amplia variedad de compuestos a diversas superficies y está ilustrada ampliamente en la literatura.

También se pueden separar las proteínas priones de otras proteínas en una muestra usando cromatografía por afinidad. Los ligandos de acuerdo con la invención se pueden unir a un soporte sólido, tal como una resina o una membrana, y se pueden usar para unir y retirar el prión de la solución. En este ejemplo, el ligando se puede acoplar a un soporte sólido, por ejemplo, un soporte inerte tal como una membrana o una resina, y la proteína prión se une al agente inmovilizado. Se puede detectar el agente inmovilizado/prión por medio de anticuerpos. Si se desea, se puede inmovilizar una o más de la secuencias obtenidas del rastreo inicial sobre una resina, tal como polimetacrilato o agarosa. Otros tipos de resina que se pueden usar incluyen, por ejemplo, sefarosa, agarosa reticulada, polisacáridos reticulados compuestos, celite, PVDF, acrilato, poliestireno y celulosa. También se pueden usar membranas, tales como, nailon y celulosa. La resina puede ser una resina de polimetacrilato.

Uso de ligandos para detectar priones

Los ligandos descritos en el presente documento, también son útiles en un procedimiento de detección de la presencia de o la cuantificación de una proteína prión en una muestra biológica. Una muestra biológica tal como, pero sin limitarse a, las mencionadas anteriormente, se pone en contacto con un ligando bajo condiciones suficientes para provocar la formación de un complejo entre la proteína prión y el ligando. Entonces, el complejo se detecta por procedimientos convencionales, detectando de este modo la presencia del prión en la muestra biológica.

El complejo se detecta marcando el ligando, combinando el ligando marcado con la muestra, y detectando el complejo ligando-prión marcado. El ligando se marca durante la producción del ligandos, tal como durante la síntesis peptídica, o se conjuga un marcador al ligando uniéndola al ligando, covalentemente o no covalentemente. De forma alternativa, se marca una molécula de unión específica para el ligando, tal como un anticuerpo, y el complejo se detecta indirectamente. Se conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y están notificados extensamente en la literatura, tanto en la científica como en la de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares.

Se puede llevar a cabo la detección por cualquier procedimiento conocido, tal como inmunotransferencia, análisis de Western, ensayos de cambio de movilidad en gel, análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), seguimiento de marcadores radioactivos o bioluminescentes, resonancia magnética nuclear, resonancia paramagnética electrónica, espectroscopia de flujo detenido, cromatografía en columna, electroforesis capilar u otros procedimientos que siguen una molécula basándose en una alteración en el tamaño o la carga o en ambos. o El marcador o grupo detectable concreto usado en el ensayo no es un aspecto esencial de la invención. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Se han desarrollado bien tales marcadores detectables y, en general, se puede aplicar cualquier marcador útil en tales procedimientos al presente procedimiento. Así, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Marcadores útiles en la presente invención incluyen colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, LacZ, CAT, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros, usados comúnmente como enzimas detectables, tanto en EIA como en ELISA), y marcadores colorimétricos tales como perlas de oro coloidal o de vidrio coloreado o de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). El marcador se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se indica anteriormente, se puede usar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección de un marcador de la sensibilidad necesaria, la facilidad de conjugación del compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las previsiones de eliminación.

Los marcadores no radioactivos a menudo se unen por medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. Después, el ligando se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina), que se puede detectar de forma inherente o bien que se une covalentemente a un sistema de

señales, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Se pueden usar varios ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, se puede usar junto con los anti-ligandos que se producen de forma natural, marcados. De forma alternativa, se puede usar cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo.

Las moléculas también se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, en particular fosfatasas, esterasas y glucosidasas, u oxidoreductasas, en particular peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas, por ejemplo, luminol.

Los expertos en la técnica conocen bien los medios de detección de marcadores. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radioactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante, por ejemplo, por microscopia, inspección visual, por medio de una película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplados a carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, los marcadores enzimáticos se detectan proporcionando sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores colorimétricos simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Así, en diversos ensayos de tira reactiva, el oro conjugado aparece a menudo como rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

También se pueden usar los ligandos de la invención para detectar dianas extraídas en la solución de un material sólido. Por ejemplo, se puede extraer una muestra sólida con un disolvente orgánico, acuoso o un fluido crítico y se puede poner en contacto el sobrenadante resultante con el ligando. Ejemplos de muestras sólidas incluyen productos derivados de animales, en particular aquellos que han sido expuestos a agentes que transmiten priones, por ejemplo, harina de huesos procedente de fuentes bovinas. En algunas realizaciones, se pueden usar ligandos para detectar la presencia de proteína prión en el suelo. Otras muestras sólidas incluyen tejido cerebral, tejido de la córnea, heces, harina de huesos, subproductos de vacuno, ovino, subproductos ovinos, ciervo y alce, subproductos de ciervo y alce, y otros animales y productos derivados de animales.

De forma alternativa, los complejos prión-ligando se pueden tratar con PK. PrPc es altamente sensible a PK, mientras que PrPsc se digiere parcialmente para formar PrPres. Por sí misma, la molécula PrPres es altamente resistente a proteolisis. Por tanto, el tratamiento con PK digerirá PrPc, y convertirá PrPsc sensible a PK en PrPres. Después de la retirada de PK, la PrPres se puede desnaturalizar y detectar por anticuerpos, tales como 3F4.

En otra realización, los ligandos según la invención se pueden usar para la concentración selectiva de PrPsc sobre PrPc.

Uso de ligandos para cuantificar priones

Un complejo ligando-prión o, de forma alternativa, un anticuerpo para el ligando o complejo ligando-prión, se puede detectar y cuantificar por cualquiera de un número de medios bien conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen procedimientos bioquímicos analíticos tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y similares, y distintos procedimientos inmunológicos tales como reacciones de precipitación de fluido o de gel, inmunodifusión (individual o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes y similares.

Reducción de unión no específica

Un experto en la técnica apreciará que a menudo es deseable reducir la unión no específica en los ensayos y durante la retirada de analito de una muestra. Cuando el ensayo implica un ligando u otro agente de captura inmovilizado sobre un sustrato sólido, es deseable minimizar la cantidad de unión no específica para el sustrato sólido. Los expertos en la técnica conocen bien los medios de reducción de esta unión no específica. Normalmente, esto implica recubrir el sustrato con una composición proteínica. En particular, se usan ampliamente las composiciones de proteínas tales como seroalbúmina humana y bovina (BSA), leche en polvo no grasa y gelatina.

Otros formatos de ensayo

También se puede usar el análisis de bandas de Western para detectar y cuantificar la presencia de proteína prión en una muestra. Esta técnica generalmente implica separar productos de muestra por electroforesis en gel sobre la base de peso molecular en presencia de SDS, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro de nailon derivatizado), e incubar la muestra unida con los ligandos descritos en el presente documento. Los ligandos se unen específicamente a un péptido prión fijado sobre un soporte sólido. Estos ligandos se marcan directamente o, de forma alternativa, se pueden detectar posteriormente usando

anticuerpos marcados que se unen específicamente al ligando.

Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, ligandos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Después, los productos químicos liberados se detectan de acuerdo con técnicas de estándar.

Composiciones farmacéuticas

Los ligandos descritos en el presente documento son útiles en aplicaciones terapéuticas y profilácticas para el tratamiento de EET provocadas por infección de un mamífero con organismos priones. Por ejemplo, en una realización, se proporciona un procedimiento de tratamiento de EET en un mamífero administrando al mamífero una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contenga un vehículo farmacéutico aceptable y un ligando sintético o aislado, como se describe en el presente documento. El ligando puede prevenir la polimerización de PrPsc a través de la inhibición de la unión de PrPsc a PrPsc. Además, puede prevenir la inhibición de la unión de PrPsc a PrPc disminuyendo así la conversión mediada por PrPsc de PrPc a PrPsc retrasando de este modo la aparición de síntomas clínicos. Además, los ligandos por sí mismos se pueden modificar por la adición de un agente reactivo para dirigir esa molécula al lugar de acumulación de PrPsc. Tales composiciones son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de suministro de fármaco.

Las enfermedades que se van a tratar de acuerdo con el procedimiento incluyen, pero no se limitan a, BSE, encefalopatía transmisible del visón, encefalopatía espongiforme felina, CWD, ECJ, GSS, insomnio letal y vECJ.

Las composiciones farmacéuticas están destinadas para la administración parenteral, tópica, oral o local. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, intranasal o intramuscular. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración que comprenden una solución de los agentes descritos anteriormente disuelta o suspendida en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se pueden usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico, adhesivo de fibrina y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosa resultantes se pueden envasar para su uso como tal, o se pueden liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables requeridas para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como ajuste del pH y agentes de tamponación, agentes de ajustes de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para composiciones sólidas, se pueden usar vehículos sólidos no tóxicos que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Para la administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como los vehículos mencionados anteriormente, y, en general, aproximadamente del 1% al 95% del principio activo y más preferentemente a una concentración de aproximadamente del 25% al 75%.

Para la administración en aerosol, los polipéptidos se administran preferentemente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. Por supuesto, el tensioactivo ha de ser no tóxico, y preferentemente soluble en el propelente. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mezclados, tales como glicéridos mezclados o naturales. También se puede incluir un vehículo, si se desea, como con, por ejemplo, lecitina para la administración intranasal.

La cantidad administrada variará dependiendo de lo que se está administrando, el estado del mamífero que recibe el tratamiento y el modo de administración. En las aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones a un mamífero que ya padece de infección de priones en una cantidad suficiente para inhibir la propagación de los priones, o al menos para detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para llevar a cabo esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad, la composición concreta y el peso y el estado general del receptor. En general, la dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 5 mg por día, preferentemente de aproximadamente 100 mg por día, para un paciente de aproximadamente 70 kg.

Además, se puede introducir ADN o ARN que codifica los ligandos en mamíferos para obtener la respuesta terapéutica deseada al ligando que codifica el ácido nucleico.

La invención se describirá con mayor detalle a modo de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, y no están destinados ni para limitar ni para definir la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Identificación de ligandos de unión a priones

Los ligandos de unión a priones descritos en las tablas expuestas en el presente documento se identificaron como sigue.

Síntesis de colección de péptidos

Se sintetizaron los péptidos y las colecciones de péptidos útiles para la identificación de los ligandos de unión a priones descritos en el presente documento por Peptides International (Louisville, KY) o bien por Commonwealth Biotechnologies (Richmond, VA) directamente sobre resina amino Toyopearl™ (TosoBioSep, Montgomeryville, PA) usando química de Fmoc estándar basada en los procedimientos descritos por Buettner, y cols. 1996. Las densidades de péptidos logradas con el esquema anterior estuvieron normalmente en el intervalos de 0,1-0,5 mmoles/gramo de resina. Se sintetizaron colecciones que comprendían 1, 2, 3, 4, 5 y 6 aminoácidos. Se sintetizaron las colecciones de aminoácidos 4, 5 y 6 sobre Toyopearl™ de amino y contenían una mezcla de tBoc y Fmoc alanina como espaciador entre el aminoácido y el grupo amino sobre la resina. Se sintetizaron los péptidos a partir de de la Fmoc alanina y se acetiló el tBoc. La presencia de "A" se encontró a menudo en la primera posición de esta colección, junto con el aminoácido amino terminal del ligando. Probablemente esto fue debido a la desacilación parcial durante la síntesis peptídica, la desprotección y/o la degradación de Edman durante la secuenciación.

En algunas realizaciones, se inmovilizan perlas individuales, llevando cada una múltiples copias de un único ligando, en agarosa después del contacto previo con una solución que contenía PrP. Puesto que se puede sintetizar un gran número de ligandos sobre la superficie de las perlas, es posible producir un número enorme de perlas, cada una de las cuales lleva teóricamente un único ligando. Se rastrean estos ligandos usando los procedimientos descritos para modelos iniciales. Una vez se ha identificado un modelo, se sintetizan ligandos adicionales (sub-colecciones) basándose en el ligando modelo. El rastreo de estas sub-colecciones puede conducir a ligandos adicionales con características mejoradas. A través de un procedimiento de iteración de síntesis y rastreo es posible identificar ligandos preferidos.

Rastreo de la unión de colecciones de péptidos

Se colocaron diversas cantidades de perlas (5-500 mg de perlas secas) de una colección en una columna de cromatografía desechable Bio-Spin® (Bio-Rad Laboratories, N.º de cat. 732-6008), y se lavaron con 20 volúmenes de columna (VC) de MeOH al 20% en H_2O para retirar posibles impurezas y disolventes orgánicos usados en síntesis peptídica. Después, se lavaron las perlas y se equilibraron usando 20 CV de 1xTBS, pH 7,6 (1x TBS se preparó por dilución 10-veces de 10x TBS, BioSource International, Camarillo, CA N.º de cat. 616US-000). Después se detuvo el flujo y se suspendieron las perlas en 1 ml de 1xTBS recién preparado y se dejaron hinchar durante 15 minutos adicionales. Se extrajo el TBS por gravedad y se cerró la columna. Para prevenir la unión no específica del material de prueba a la resina, se aplicó una solución de 1 ml de caseína Blocker™ en TBS (Pierce, Rockford, Il. N.º de cat. 37532) con BSA al 0,5% añadido (Sigma, N.º de cat. A-7030) a las perlas. Después de cubrir ambos extremos de la columna, se realizó el bloqueo durante la noche a 4ºC, bajo agitación suave. Se extrajo la solución de bloqueo, y se añadió 1 ml de material de prueba que contenía PrPr, PrPc y/o PrPsc a la resina. Se cerró la columna herméticamente en ambos extremos, se colocó en posición horizontal, y se agitó suavemente a temperatura ambiente, durante tres horas. Se extrajo el material que contenía PrP y se lavaron las perlas bajo gravedad, se condujo con 10 ml de TBS que contenía Tween 20 al 0,05% seguido de 10 ml de TBS.

Detección de PrPc unida

Se realizó la detección de PrPc normal usando anticuerpos monoclonal de ratón 3F4 (Signet, Dedham, MA) diluido 1:8.000 en TBS que contenía caseína al 1%. El anticuerpo monoclonal se une a haPrPc, huPrPc y huPrPr, pero no tiene ninguna, o tiene extremadamente poca, afinidad para haPrPsc o huPrPsc; sin embargo, sí se une a haPrPsc y huPrPsc desnaturalizada. Se añadió un mililitro de anticuerpo 3F4 diluido a las perlas a partir de una colección combinatoria expuesta previamente a material que contenía PrPc. Se agitaron suavemente las perlas con 3F4 a temperatura ambiente, durante una hora. Se extrajo la solución conteniendo que contenía anticuerpo no unido y se lavaron las perlas con 10 ml de TBS y 10 ml de TBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Después, se incubaron las perlas en 1 ml de IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina (γ) (KPL, Gaithersburg, MD N.º de cat. 741806.) diluida 1:2.000 en caseína al 0,5%/BSA al 0,5% en TBS. Se llevó a cabo la incubación con agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. Se extrajo la solución que contenía anticuerpo secundario no unido y se lavaron las perlas con 10 ml de TBS y 10 ml de T-TBS. A continuación, se preparó 1 ml de solución de ImmunoPure™ Fast, un sustrato para fosfatasa alcalina (Pierce, Rockford, IL, N.º de cat. 34034) como se describe por el fabricante y se aplicó a las perlas. Se procedió a la incubación a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos o hasta que las perlas comenzaron a volverse de color rosa claro, y aparecieron unas pocas perlas de color rojo oscuro. Se extrajo la solución de sustrato y se lavaron las perlas con 10 ml de TBS.

Detección de perlas con unión a PrP y embebidas en agarosa

Se realizó la identificación de perlas con unión a PrP embebidas en agarosa como sigue. En primer lugar, se preparó la capa base de agarosa cubriendo la superficie de una bandeja de 49 cm con 9 ml del agarosa al 1% (Life Tecnologies, Grand Island, DRINE, N.º de cat. 15510-027) disuelta en agua, que previamente se fundió y se enfrió hasta aproximadamente 60ºC. Se dejó solidificar la agarosa. Se pusieron en contacto las perlas con material de prueba que contenía proteína prión y se lavó en TBS, como se describe anteriormente. A continuación, se ajustó la concentración de las perlas de acuerdo con la concentración deseada de las perlas en el gel. Se encontró una buena propagación de las perlas a 1,9 mg de equivalentes de peso seco/ml. Se añadieron 90 µl de suspensión de perlas a 800 µl de agarosa de bajo punto de ebullición al 0.5% (BioWhittaker, Rockland, ME N.º de cat. 50111) que se había disuelto en agua, se fundió y se enfrió hasta aproximadamente 40ºC. Se agitó la mezcla suavemente en vórtex muy brevemente y se vertió sobre la superficie de la capa base. Se colocó una alícuota de material que contenía PrP directamente en el gel en su esquina y sirvió como control positivo para los siguientes procedimientos. Se dejó solidificar el gel a 4ºC.

Detección quimioluminiscente de perlas con unión a PrP embebidas en agarosa

Después de embeber las perlas en el gel, se añadió una solución de CDP-Star™ (Appied Biosystems, Bedford, MA N.º de cat. MS100R) para cubrir la superficie de los geles que después se incubaron durante 5 minutos, como se describe en el protocolo de instrucciones del fabricante. Se extrajeron los geles del exceso de solución de sustrato, después se colocó sobre un transparencia, sellada en una bolsa de plástico y se expuso a la película de autorradiografía durante 30 minutos. Las películas identificaron la ubicación de PrPc o PrPr por alineación de puntos con perlas rojas en el gel. Posteriormente, se usaron estas películas para alinear películas, películas adicionales obtenidas después de la transferencia de desnaturalización de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

Protocolo para la transferencia de proteínas a partir de perlas embebidas a membrana de nitrocelulosa.

Esta metodología de transferencia eluye proteínas de las perlas y las transfiere a través de acción capilar sobre nitrocelulosa o membrana de PVDF. Una porción de papel de filtro de 3MM actúa para absorber por capilaridad el tampón de transferencia (que puede ser cualquier tampón que sea adecuado para las necesidades concretas del experimento) desde un depósito a través del gel. Se humedeció previamente la mecha de 3MM con tampón de transferencia y se colocó sobre una superficie con los extremos del papel inmersos en el depósito de tampón. Se coloca el gel, con el lado de agar blando hacia arriba, sobre la mecha de 3MM, asegurándose que no quedan burbujas entre el papel y el gel. Se humedece una porción de membrana (nitrocelulosa estándar de ECL, Hybond Amersham, Alemania, N.º de cat. RPN303D) cortada a la medida del gel en el tampón de transferencia y se coloca en la parte superior del gel. Se pasó sobre la membrana una pipeta para eliminar las burbujas. Después, se colocaron dos piezas de papel de 3MM humedecido previamente sobre la membrana y se les pasó una pipeta para retirar las burbujas de aire. Se colocan un montón de toallitas de papel secas u otro papel absorbente sobre la parte superior, y se pesa con un peso de 300 g. Se puede proceder a la transferencia el tiempo que sea necesario.

Protocolo para la detección de quimioluminiscencia (ECL)

Se retiran las membranas de la parte superior de los geles, se aclaran y se colocan en recipientes de plástico con 10 ml de leche libre de grasa, seca al 5% (p/v) de Giant Fod Inc., Landover, MD en TBS más Tween (T-TBS). Se incuban las membranas con la leche con agitación suave durante hasta 16 horas a 4ºC, o dos horas a temperatura ambiente, para prevenir la unión no específica de los anticuerpos a las membranas. Después del bloqueo con leche, se incuban las membranas con 10 ml de una dilución 1:8.000 de anticuerpo primario, 3F4, en leche al 5% en TBS más Tween (T-TBS). Se deja que la incubación continúe con agitación suave durante 1,5 horas a temperatura ambiente (20-25ºC). Después, se desecha la solución de anticuerpo primario y se lavan las membranas dos veces con T-TBS, después se lavan durante 15 minutos en T-TBS, después dos veces durante cinco minutos en T-TBS recién preparado. Se realizan todos los lavados con agitación suave. Después se incuba cada membrana durante 1,5 horas a temperatura ambiente con agitación suave con 10 ml de una dilución 1:10.000 de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (KPL, Gaithersburg, MD) en leche al 5% en T-TBS. Después, se desecha la solución de anticuerpo secundario y se aclaran las membranas y se lavan como antes. Algunos experimentos usaron anticuerpo secundario marcado con fosfatasa alcalina para la detección de anticuerpo primario.

La detección quimioluminiscente se lleva a cabo preparando "sustrato quimioluminiscente" (Supersignal, Pierce Rockford II N.º de cat. 34080) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añaden diez mililitros de la mezcla a cada membrana, proteína hacia arriba. Se removió suavemente a mano el sustrato durante cinco minutos, y se retiraron las membranas saturadas con sustrato y se colocan sobre papel de filtro de 3MM para extraer rápidamente, después se envuelven en protector de hojas (Boise Cascade Office Products, N.º L2A9113-NG). Se expone el lado de proteínas de la membrana a la película de autorradiografía durante distintos periodos de tiempo y se desarrollan las películas.

Detección de aglutinantes trímeros específicos para PrPsc a partir de cerebro de Hámster con tembladera

Se pueden aprovechar diferentes propiedades bioquímicas entre PrPc y PrPsc y la unión de anticuerpos, esto es, 3F4, para rastrear para proporcionar ligandos que se unan selectivamente a PrPsc. El anticuerpo monoclonal 3F4 se une a

PrPsc desnaturalizada con una afinidad considerablemente mayor que para PrPsc no desnaturalizada. (Safir, J. y cols. Eight Prion Strains Have PrPsc Molecules With Different Conformations. 1998. Nature Medicine 4: 1157-1165)

Se prepararon homogeneizados al diez por ciento (p/v) de cerebros de hámsteres infectados con tembladera en PBS y se almacenaron congelados a -80ºC (cortesía del Dr. Robert Rohwer, VA Medical Center, Baltimore). Antes de usarlos, se descongelaron sobre hielo húmedo, y se solubilizaron 1,2 ml (no infectados) y 0,5 ml (infectados) de homogeneizados en presencia de sarcosilo a una concentración final de sarcosilo al 0,5% (p/v) con agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante cinco minutos, y se recogieron los sobrenadantes que contenían PrPc (no infectada) y una mezcla de PrPc y PrPsc (infectadas). Se sobrerrepresentó PrPsc en el tejido cerebral de hámster infectado con tembladera con relación a PrPc. Se prepararon cinco mililitros de material cerebral para análisis combinando 1 ml de homogeneizado cerebral al 10% de hámster normal en sarcosilo al 0,5% con 0,33 ml de material cerebral infectado con tembladera y 3,67 ml de tampón TBS (Pierce, Rockford, IL) que contenía un 1% de caseína y un 1% de BSA (Sigma, St. Louis, MO). La proporción final homogeneizado cerebral normal con respecto al infectado con tembladera fue de 3:1, lo que dio cantidades de PrPc y PrPsc aproximadamente muy equivalentes.

Se puso en contacto este material con la colección de perlas de trímeros y se procesó de acuerdo con los procedimientos. Después del lavado, se trataron diversamente las perlas. En un procedimiento, éstas se incubaron con PK para digerir la PrPc unida a las perlas, en otro, éstas se tiñeron para determinar la presencia de PrPc. Esto se llevó a cabo por incubación de las perlas con anticuerpo 3F4, lavando, añadiendo después anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa específico para 3F4, lavando y añadiendo un sustrato de fosfatasa, para visualizar las perlas que se unen a PrPc, a 3F4, a anticuerpo secundario o a fosfatasa. Así, las perlas que se unieron a PrPc eran rojas. Una vez embebidas en el gel, se añadió un segundo sustrato quimioluminiscente específico para fosfatasa, en algunos experimentos, para producir una señal lumínica a partir de las perlas rojas. PrPc, PrPsc y PrPres se transfirieron desde la agarosa, como se describe anteriormente en presencia de guanidinio 6 M/HCl, lo que también provocó la desnaturalización de la proteína prión. La desnaturalización e inmovilización de PrPsc sobre la membrana de captura facilitó la inmunodetección de PrPsc, así como de PrPc. Después de la alineación de estos puntos con las perlas previamente teñidas, son posibles diferentes poblaciones de perlas. Las perlas que se unieron directamente a reactivos de detección tales como 3F4 y las que se unieron a PrPc más PrPsc, o PrPc sola, se teñirían de color rojo. Las perlas que se unieron sólo o de forma preferente a PrPsc producirían una señal sobre la membrana, pero no deberían teñirse de color rojo. Éstas se seleccionaron como perlas específicas para PrPsc aunque se sometieron a prueba adicionalmente como perlas que podrían unirse teóricamente tanto a PrPc como/o a PrPsc en un sitio sobre la proteína prión que prevenía la unión de 3F4. En la figura 1, las perlas de la colección de trímeros que no produjeron la señal en la primera detección quimioluminiscente (antes de la etapa de desnaturalización), pero que produjeron la señal en la segunda detección quimioluminiscente (después de la etapa de desnaturalización), y por lo tanto, eran candidatas para la secuenciación, se asignaron con números.

Se dan distintas versiones de la metodología descrita en este ejemplo en las tablas expuestas en el presente documento.

Por ejemplo, en las tablas 10 A y B, a continuación, se realizó el rastreo de colecciones 6-meras (100-300 µm y 65 µm) en presencia de material cerebral con ECJ esporádica enriquecido en plasma humano normal. Se expusieron las perlas a homogeneizado cerebral al 0,5% enriquecido en plasma humano normal recogido en CPD, y después se trataron con 100 µg/ml de PK. Para confirmar que PK no digiere totalmente los péptidos de las perlas, se trataron las resinas con caseína al 1% (p/v) y seroalbúmina humana al 5% (p/v) y 100 µg/ml de PK antes de la secuenciación.

Tabal 10A
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a huPrPc, huPrPsc o a ambas

SEC ID N.º:	Material rastreado	Secuencia	Color de la perla	Producción de luz tras desnaturalización
154	huPrPsc sin PK*	RES(na)NVA	Blanco	Fuerte
155	*	ES(na)PRQA	Blanco	Fuerte
156	*	VARENIA	Blanco	Fuerte
157	*	RWEREDA	Rosa	Fuerte
158	HuPrPsc sin PK**	EWWETV	Blanco	Medio
159	**	SVYQLDA	Blanco	Medio
160	**	(na)HEFYGA	Blanco	Medio
161	**	HE(na)(na)LVA	Blanco	Medio
162	**	A(na)VPV(na)A	Rosa	Medio

163	**	YFDYWLA	Rosa	Medio
164	**	FE(na)HRQA	Rosa	Medio
165	**	WRHEPAA	Rojo	Medio
166	huPrPsc +PK***	SS(na)KKDA	Blanco	Medio
167	***	R(na)DKEAA	Blanco	Medio
168	huPrPsc +PK****	(na)HEIFPA	NA	Medio
169	****	KWYHHRA	NA	Medio
170	****	HWWPHNA	NA	Medio
171	****	HWQVFYA	NA	Medio
172	****	FHE(na)EIA	NA	Medio
173	****	HADF(na)QA	NA	Medio

* homogeneizado cerebral de ECJ esporádica al 0,5% (huPrPsc) sin tratamiento con PK
** huPrPsc al 5% sin tratamiento con PK
*** huPrPsc al 0,5% con tratamiento con PK, pero sin desarrollo de color
**** huPrPsc al 5% con tratamiento con PK, pero sin desarrollo de color
"NA" indica que no se hizo, na indica naftil-alanina

Tabla 10B
Secuencias de seis aminoácidos que se unen a huPrPsc

SEC ID N.º	Material rastreado	Secuencia	Color de la perla	Señal lumínica tras desnaturalización
174	HuPrPsc +PK*	ALHFETA	Blanco	Débil
175	*	DDPTGFA	Blanco	Débil
176	*	VAPGLGA	Blanco	
177	*	IFRLIEA	Blanco	Débil
178	*	GLERPEA	Blanco	Débil
179	*	IVVRLWA	Rosa	Débil
180	*	WHNPHYA	Rosa	Débil
181	*	LIYKSDA	Rosa	Débil
182	huPrPsc sin PK**	EKPIFNA	Blanco	Débil
183	**	HWSEPAA	Rojo	Débil
184	**	GHNWKEA	Rosa	Fuerte
185	**	YWHHDDA	Rosa	Fuerte
186	**	GYPKENA	Rosa	Fuerte
187	**	PVYWLYA	Blanco	Fuerte
188	huPrPsc sin PK ***	FGEHTPA	Blanco	Débil
189	***	FQGTREA	Blanco	Fuerte
190	***	TGTNRYA	Blanco	Fuerte
191	***	KWATRYA	Blanco	Fuerte
192	***	NSTKFDA	Rosa	Fuerte
193	***	LIYKEEA	Rosa	Fuerte
194	***	EHATYRA	Blanco	Fuerte
215 (Control)	****	DRDLTFA	Blanco	Ninguno
216 (Control)	****	HNWWIIA	Blanco	Ninguno

217 (Control)	****	EVKIGNA	Blanco	Ninguno

* perlas de 100-300 µm rastreadas con homogeneizado cerebral con ECJ esporádica (huPrPsc) con tratamiento con PK
** perlas de 100-300 µm rastreadas con huPrPsc sin tratamiento con PK
*** perlas de 65 µm rastreadas con huPrPsc sin tratamiento con PK
**** perlas de control demuestran falta de digestión significativa del ligando tras incubación con PK en ausencia de PrP

En la tabla 10C, a continuación, se realizó el rastreo de la colección 3-mera en presencia de homogeneizado cerebral preparado a partir de un paciente con ECJ esporádica (huPrPsc) y se trataron las perlas con PK antes de la inmunodetección de aglutinantes específicos para PrP. En este ensayo, se incubaron 10 mg de resina por columna con 1 ml de homogeneizado cerebral al 0,5% (p/v) o al 1% (p/v) diluido en CPD y que contenía sarcosilo al 0,05% o al 0,1% (v/v), respectivamente, y 0,2 mM del inhibidor de proteasa (PMSF). Se realizaron lavados apropiados descritos en el protocolo general, y se trataron las perlas con 1 ml de PK (100 µg/ml) a 37ºC durante una hora. Después, se siguieron los procedimientos generales descritos anteriormente. Las secuencias obtenidas en dos experimentos se enumeran en la tabla 10C. La concentración apropiada de material de homogeneizado cerebral presente durante la incubación está indicada para cada grupo de secuencias.

En la tabla 10D, se incubó resina de una colección combinatoria en la cantidad de 5 mg de peso seco por columna con 1 ml de homogeneizado cerebral al 0,1% (p/v) diluido en PBS o CPD y que contenía sarcosilo al 0,01% (v/v) y 0,2 mM de PMSF. Se realizaron todos los procedimientos de acuerdo con los protocolos mencionados anteriormente.

Tabla 10C
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a huPrPc, huPrPsc o a ambas

SEC ID N.º	Material rastreado	Secuencia	Color de la perla	Señal lumínica tras desnaturalización
195	huPrPsc +PK*	HND	Blanco	Medio
196	*	HER	Rojo	Medio
197	*	HGD	Rojo	Fuerte
198	*	HSD	Rojo	Fuerte
199	*	HFD	Rojo	Fuerte
200	****	WND	Rojo	Ninguno
201	****	YEH	Rojo	Ninguno
202	****	HWD	Rojo	Ninguno
203	****	YHD	Rojo	Ninguno
204	****	YDW	Rojo	Ninguno
205	****	WDY	Rojo	Ninguno
218 (Control)	*****	SIV	Blanco	Ninguno
219 (Control)	*****	AYP	Blanco	Ninguno
206	huPrPsc sin PK**	HYD (3x)	Rojo	Fuerte
207	**	HWD	Rojo	Fuerte
208	**	WTD	Rojo	Fuerte
209	huPrPsc +PK***	FPK	Blanco	Medio
210	***	HWK	Blanco	Medio
211	***	WEE	Blanco	Medio
212	***	LLR	Blanco	Medio

* huPrPsc al 0,5% en sarcosilo al 0,05% más tratamiento PK
** huPrPsc al 1,0% en sarcosilo al 0,1% sin tratamiento con PK
*** huPrPsc al 1,0% en sarcosilo al 0,1% con tratamiento con PK
**** se seleccionaron perlas del gel antes de la transferencia
***** se tomaron perlas después del lavado
3x indica secuencias detectadas tres veces

Tabla 10D
Secuencias de tres aminoácidos que se unen a huPrPc, huPrPsc o a ambas

SEC ID N.º	Material rastreado	Secuencia	Color de la perla	Señal lumínica tras desnaturalización
147	huPrPsc en CPD*	WEH	Rojo	Fuerte
152	*	YDY	Rojo	Fuerte
206	*	HYD	Rojo	Fuerte
213	huPrPsc en PBS**	SYF	Blanco	Débil
214	**	EYY	Rojo	Fuerte

Ejemplo 2

Rastreo secundario de ligandos

Los siguientes ejemplos proporcionan información sobre el rastreo secundario de ligandos seleccionados a partir de diversas colecciones durante el rastreo primario para confirmar además que los ligandos se unen a PrP.

La unión de PrPc de cerebro humano normal a resinas de trímeros se muestra en la figura 2. Se usaron diez mg de cada resina (amino, HYD (SEC ID N.º: 206)), RWD (SEC ID N.º: 113), SYA (SEC ID N.º: 108), SYF (SEC ID N.º: 213), y YEY (SEC ID N.º: 154)), por columna. La resina de amino es el polímero base a partir del que se sintetizan los péptidos y tiene alguna afinidad por la proteína prión. Se equilibraron las resinas con PBS o bien CPD a pH 7,4. Se usó tejido cerebral humano normal congelado como fuente de huPrPc. En primer lugar, se descongeló sobre hielo húmedo. Se solubilizó una muestra de homogeneizado cerebral al 10% preparada en PBS o en CPD con sarcosilo al 1% y aclarada por centrifugación a 14.000 rpm durante cinco minutos. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó 100 veces hasta una concentración final de homogeneizado cerebral y sarcosilo del 0,1% y 0,01%, respectivamente. Se aplicó un mililitro de este material a la columna y se recogió el flujo continuo. Se lavaron las perlas con 20 ml de PBS o CPD, y se usó 1 mg de perlas (peso seco) para la evaluación de la unión a PrPc por bandas de Western, como se describe a continuación.

Después del lavado, se suspendió aproximadamente 1 mg de equivalente en peso seco de perlas en 100 ul de tampón, y se calienta al 100ºC para 10 minutos en 30 µl de tampón Laemmli que contenía β-mercaptoetanol al 2%. Se centrifugaron las perlas a 14.000 rpm durante un minuto, y se evaluó el sobrenadante por transferencia de bandas de Western y sondeo para PrP. Se redisolvieron las muestras sobre gel Bis-Tris al 12% de NuPAGE (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) bajo condiciones de desnaturalización reducida, y se sometieron a electrotransferencia a una membrana nitrocelulosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se visualizaron bandas de PrP específicas usando anticuerpo monoclonal 3F4 diluido 1:10.000. Se desarrollaron las bandas usando el sistema de detección SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) que contenía un reactivo quimioluminiscente para la detección de peroxidasa de rábano picante. Se registraron las señales sobre una película X-Omat™ Blue XB-1 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, (SEC ID N.º: 113), SYA (SEC ID N.º: 108), WEY (SEC ID N.º: 102), WSD (SEC ID N.º: 115), YID (SEC ID N.º: 112), YFE (SEC ID N.º: 106), YEY (SEC ID N.º: 154), y WQD) por columna que se usó y se procesó de acuerdo con el protocolo general descrito anteriormente. se equilibraron las columnas con PBS, pH 7,4. Se usó tejido cerebral congelado de un paciente con ECJ espontánea para la preparación de PrPsc. También contenía PrPc. Se preparó una muestra de homogeneizado cerebral al 10% en PBS tratada con sarcosilo al 1% y aclarada por centrifugación a 14.000 rpm durante cinco minutos. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó 100 veces hasta una concentración final de homogeneizado cerebral y sarcosilo del 0,1% y 0,01 %, respectivamente. Se aplicó un mililitro de este material a las perlas y se incubó a temperatura ambiente en un formato en lotes durante tres horas. Después se lavaron las perlas con 20 ml de PBS, y se incubó 1 mg de perlas (peso seco) con PBS o con PK (100 (µg/ml) en PBS a 37ºC durante una hora. Estas condiciones digieren totalmente la PrPc. Por tanto, esto ayudó a discriminar entre los ligandos específicos para PrPsc y PrPc. El procesamiento habitual de las perlas para bandas de Western se siguió como se describe en el ejemplo 1.

La unión de PrPsc en un homogeneizado cerebral tomado de un paciente con ECJ esporádica para resinas en un formato de flujo continuo se muestra en la figura 4. Se usaron cincuenta miligramos de cada resina (amino, RWERED (SEC ID N.º: 157), LW (SEC ID N.º: 50), EYY (SEC ID N.º: 214), HYD (SEC ID N.º: 206)), RWD (SEC ID N.º: 113), SYA (SEC ID N.º: 108), SYF (SEC ID N.º: 213) y YEY (SEC ID N.º: 154)) en el experimento. Se usó la placa de filtro de 96 pocillos Captiva (CaptiVac Vacuum System, ANSYS Technologies, Inc, N.º de cat. 796) en lugar de columnas individuales. Se prepararon resinas de acuerdo con el protocolo general descrito anteriormente. Se equilibraron las resinas con CPD a pH 7,4. Se usó tejido cerebral congelado de un paciente con ECJ esporádica como fuente de huPrPc y huPrPsc. Se preparó una muestra de homogeneizado cerebral al 10% en CPD tratada con sarcosilo al 1% y aclarada por centrifugación a 14.000 rpm durante cinco minutos. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó diez veces para dar una concentración final de homogeneizado cerebral y sarcosilo del 1% y 0,1 %, respectivamente. A cada pocillo, se aplicaron 250 µl de este material. Se dejó pasar el material a través de la resina bajo gravedad con un

tiempo de contacto de aproximadamente cuatro minutos y se recogió el flujo continuo. Se lavaron las resinas con 2,5 ml de CPD. Se incubó un miligramo de perlas (peso seco) con PK (100 µg/ml) a 37ºC durante una hora. El procesamiento habitual de las perlas para bandas de Western se siguió como se describe anteriormente.

Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o realización de pruebas de la presente invención, anteriormente se describen procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Se proporciona la descripción anterior para describir distintas realizaciones con relación a la invención.

Ejemplo 3

Visualización de PrPc unida a resinas

Para visualizar la unión de PrPc a resinas de afinidad, se unió homogeneizado cerebral normal a resina DVR de amino (SEC ID N.º: 114) en formato de columna, y se visualizó la localización de la proteína en el interior y en el exterior de las perlas por un sustrato cromogénico. Se empaquetó una columna de 0,5 ml de DVR de ligando de afinidad (SEC ID N.º: 114), que se sintetizó sobre resina de amino Toyopearl™ 650-M, en una columna PIKSI (ProMetic Biosciences Ltd, Montreal, Quebec, Canadá). A la columna se aplicaron 1,5 ml del homogeneizado cerebral de hámster normal (HaBH) al 1% diluido en un tampón de trabajo (TT) (citrato 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,0) a un caudal de 0,5 ml/min, que se controló con una bomba peristáltica. Después de cargar HaBH, se lavaron las columnas con 5 ml de TT. Se retiraron las perlas de la columna, se cortaron con una cuchilla para dejar expuesto el interior de las perlas, y se incubaron con anticuerpo primario 3F4 diluido 1:4000 en tampón de caseína al 1% (Pierce, Rockford, IL) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación a través de rotación. Se lavaron las perlas con TBS, pH 7,4 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con rotación con un anticuerpo anti-ratón de cabra secundario marcado con fosfatasa alcalina (KPL, Gaithersburg, MD) diluido 1:1000 en caseína al 1%. Se lavaron las perlas con 10 ml de TBS a pH 7,4, seguido de 5 ml de TBS a pH 9,5. Se incubaron las perlas con sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante varias horas y se observó bajo un estereomicroscopio. La superficie exterior de las perlas se tiñó de color marrón/azul, pero la superficie interior permaneció de color blanco, lo que indica que la proteína se unió al exterior de las perlas.

Ejemplo 4

Retirada de PrPsc de concentrados de glóbulos rojos

Se enriquecieron concentrados de glóbulos rojos (RBCC) con homogeneizado cerebral de hámsteres infectados con tembladera en órdenes de magnitud de concentraciones más altas que las que es probable encontrar de forma endógena en la sangre de animales infectados. Se hicieron pasar los RBCC enriquecidos en sucesión a través de columnas de resinas con distintos ligandos de afinidad para evaluar la capacidad de los ligandos de afinidad para unirse y retirar PrP, cuando están presentes a alta concentración, de RBCC.

Se leucorredujeron diez unidades de concentrados de glóbulos rojos de tipo O negativo (RBCC) sobre filtros Pall Leukotrap (Pall, East Hills, NY), se almacenaron y se enriquecieron con homogeneizado cerebral de hámster con tembladera al 0,1% en sarcosilo al 0,1%. Se añadió el enriquecido a 2 ml/min, con agitación. Se subdividieron los RBCC enriquecidos en 10 partes iguales de 300 ml cada una en bolsas de transferencia (Fenwal Products, Baxter Healthcare Corporation, Deerfild, IL).

Se ajustaron en serie cinco columnas, conteniendo cada una 10 ml de una resina específica, de modo que el flujo a través de la columna uno, que contenía material no unido se aplicó a la columna dos. Esto continuó hasta que las 5 columnas estuvieron expuestas a los RBCC. A través de la columna uno, se hicieron pasar 300 ml de RBCC enriquecido, se recogió el flujo continuo, y se pasó por la columna dos y, así consecutivamente, hasta que todas las columnas estuvieron expuestas a los RBCC. Se recogieron las perlas en la columna, y se lavó una muestra de 100 µl de perlas, y se dividió en dos porciones. Se incubó una porción con proteinasa K (en la tabla 11, la muestra incubada con proteinasa K está indicada como +PK, la muestra no incubada con proteinasa K está indicada como -PK) a 1 mg/ml durante 1 h a 37ºC. Se eluyeron las proteínas que se unieron tanto a las perlas +PK como a las -PK de las perlas hirviendo en tampón de muestra 2X (NuPAGE, Helixx Tecnologies Inc., Toronto, Ontario, Canadá). Se cargó cada muestra en la cantidad de 10 µl sobre un gel Bis-Tris SDS-PAGE al 12% (Invitrogen) y se sometió a electroforesis durante 45 min. Se transfirieron las proteínas del gel a una membrana y se detectó la proteína PrP en una banda de Western usando anticuerpo PrP anti-humano de ratón 3F4 como anticuerpo primario, anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-ratón de cabra como como anticuerpo secundario, y se detectó con detección quimioluminiscente Western Breeze (Invitrogen). Las bandas sobre el gel, obtenidas eluyendo la proteína unida a resina, indican la presencia de PrPres sobre las perlas que derivaban del flujo continuo de la columna previa (o material de partida en el caso de la columna 1).

PrPres se encontró sobre perlas a partir de las columnas 1-5 para el control negativo, resina SYA acetilada (Ac-SYA)

(SEC ID N.º: 108), indicando que esta resina no se unió a PrPsc. PrPres se encontró en altas cantidades en la columna 1, y en menores cantidades en la columna 2 para DVR (SEC ID N.º: 114) y SYA (SEC ID N.º: 108), con sólo con una pequeña cantidad de PrPres presente sobre las perlas a partir de la columna 3. Este indicó que estas resinas retiran toda la PrPres hasta el límite de detección de la banda de Western en 3 columnas, o 30 ml de resina. Las resinas YVHEA (SEC ID N.º: 63) y (D)ES(na)PRQ-EACA (SEC ID N.º: 226-EACA) también muestran menores cantidades de PrPres en las columnas de 1 a 3; sin embargo, hay más PrPres unido a la columna 3 que en las dos columnas previas. Se encuentra una cantidad equivalente de PrPres en cada columna de WFVEA (SEC ID N.º: 225), indicando que esta resina se une a una pequeña cantidad de PrPres en cada columna, pero no se une y retira toda la proteína prión hasta el límite de detección. Como el enriquecimiento fue varias veces mayor que la cantidad de PrP que se ha observado de forma endógena en la sangre de los animales, estos resultados indicaron que algunas de estas resinas tenían la capacidad para retirar la mayoría, si no todo, de la PrPres endógena presente en la sangre.

Tabla 11
Patrón de carga de gel para electroforesis de muestras en el ejemplo 4

Resinas SYA & Ac-SYA (SEC ID N.º: 108)	Resinas DVR (SEC ID N.º: 114), YVHEA (SEC ID N.º: 63), (D)ES(na)PRQ (SEC ID N.º: 226), WFDEA (SEC ID N.º: 225)
1.MWM	l.MWM
2. Columna n.º 1 - PK	2. Columna n.º 1 - PK
3. Columna n.º 1 + PK	3. Columna n.º 1 + PK
4. Columna n.º 2 - PK	4. Columna n.º 2 - PK
5. Columna n.º 2 + PK	5. Columna n.º 2 + PK
6. Columna n.º 3 - PK	6. Columna n.º 3 - PK
7. Columna n.º 3 + PK	7. Columna n.º 3 + PK
8. Columna n.º 4 - PK	8. Columna n.º 4 - PK
9. Columna n.º 4 + PK	9. Columna n.º 4 + PK
10. Homogeneizado cerebral con tembladera - PK (1:100)	10. Columna n.º 5 - PK
11. Homogeneizado cerebral con tembladera - PK (1:10)	11. Columna n.º 5 + PK
12. Homogeneizado cerebral con tembladera - PK (1:2)	12. Homogeneizado cerebral con tembladera - PK (1:100)
13. Material de prueba cerebral con tembladera - PK	13. Homogeneizado cerebral con tembladera - PK (1:10)
14. Material de prueba cerebral con tembladera + PK	14. Homogeneizado cerebral con tembladera - PK (1:2)
15.MWM	15. Material de prueba cerebral con tembladera - PK
	16. Material de prueba cerebral con tembladera + PK
	17. MWM

MWM indica los marcadores de peso molecular

Listado de secuencias

<110> Cruz Roja Americana
Universidad Estatal de Carolina del Norte

<120> Ligandos de proteínas priones y procedimientos de uso

<130> 300/1344/P/EP/Div3

<150> US 60/430.423

<151> 2002-12-03

<160> 226

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ligando de unión a priones
<400> 63

Tyr	Val	His	Glu	Ala
1				5

REIVINDICACIONES

1. Un ligando de unión a priones, donde el ligando es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

2. El ligando de la reivindicación 1, en el que el ligando se puede unir a una forma natural de la proteína prión (PrPc) y/o a una forma conformacionalmente alterada de la proteína prión (PrPsc).

3. El ligando de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el ligando tiene un peso molecular inferior a 6 kDA.

4. Un procedimiento *ex vivo* de detección de una proteína prión en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con un ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se puede unir a una o más proteínas priones, un fragmento de las mismas, o un péptido derivado de las mismas, en condiciones suficientes para provocar la formación de un complejo entre la proteína prión, el fragmento de la misma, o el péptido derivado de la misma y el ligando; y

detectar el complejo en la muestra.

5. Un procedimiento *ex vivo* de retirada de una proteína prión de una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con un ligando según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se puede unir a uno o más péptidos o polipéptidos derivados de una proteína prión seleccionada del grupo que consiste en PrPc, PrPsc y PrPr, en condiciones suficientes para provocar la formación de un complejo entre la proteína prión y el ligando; y

retirar el complejo de la muestra.

6. El procedimiento de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5, en el que la muestra es una muestra biológica.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, glóbulos blancos, células mononucleares, concentrado de plaquetas, sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, leche, fluido ductal, lágrimas, semen, heces, amígdalas, ganglios linfáticos, colágeno, extracto cerebral y extractos glandulares.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que el ligando se une a un soporte sólido antes de ponerse en contacto la muestra.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en membranas y resinas.

10. El procedimiento de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, en el que el soporte sólido es una resina seleccionada del grupo que consiste en polimetacrilato, agarosa, sefarosa, agarosa reticulada, polisacáridos reticulados compuestos, celite, polivinilo D, acrilato fluoruro, poliestireno y celulosa.

11. El procedimiento de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, en el que el soporte sólido es una resina de polimetacrilato.

12. El procedimiento de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, en el que el soporte sólido es una membrana de material seleccionado del grupo que consiste en nailon y celulosa.

13. Una composición para la unión a proteínas priones, que comprende:
un ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se puede unir a uno o más péptidos priones; y
un soporte sólido, en la que el ligando está unido al soporte sólido.

14. La composición de la reivindicación 13, en la que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en membranas y resinas.

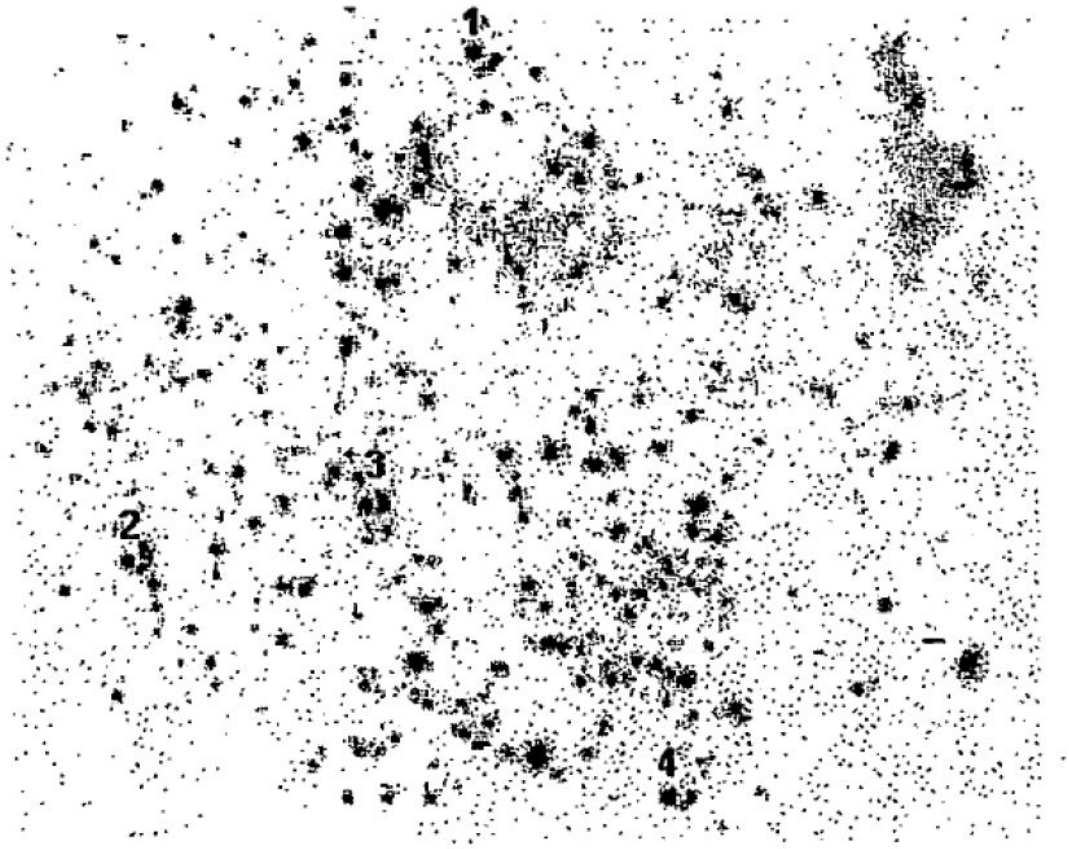


FIGURA 1

PrP unida a perla

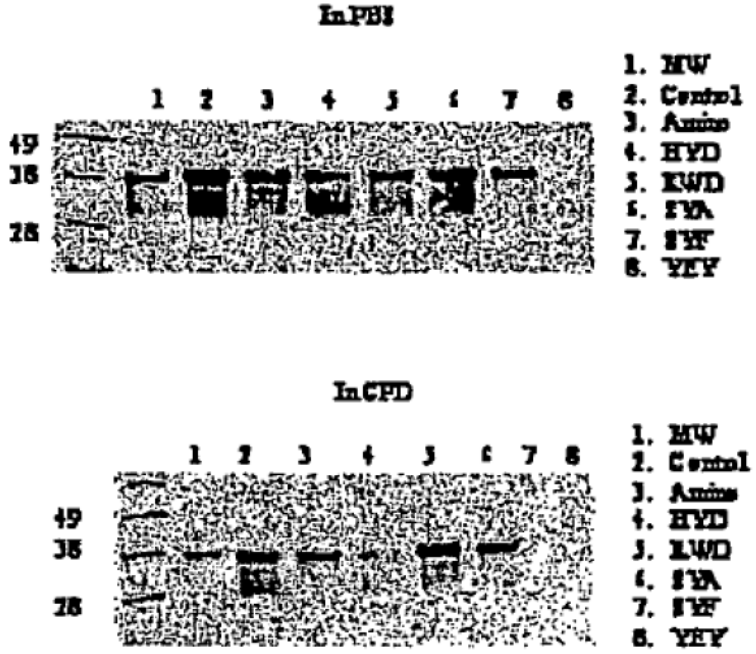


FIGURA 2

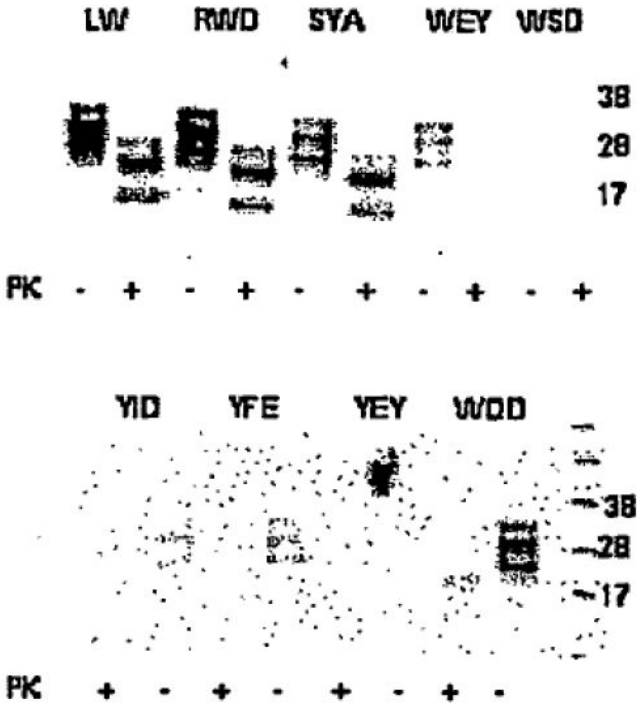


FIGURA 3

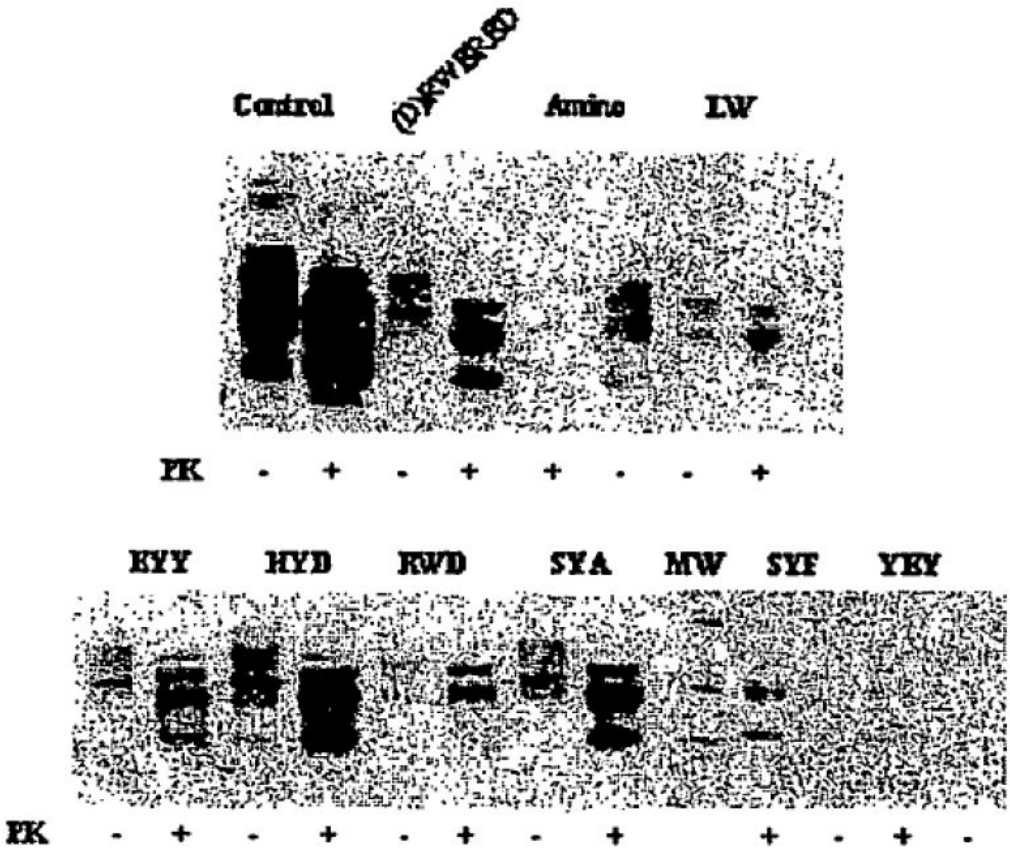


FIGURA 4

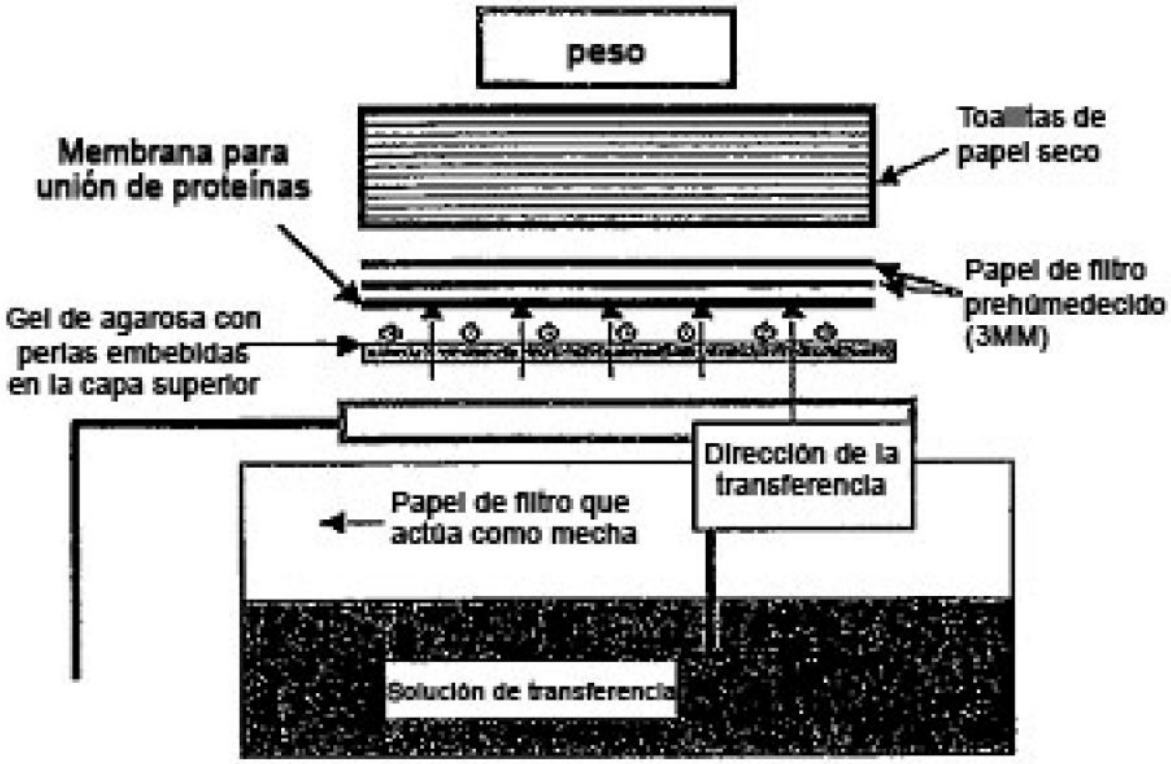

peso
Toallitas de papel seco
Membrana para unión de proteínas
Papel de filtro prehúmedecido (3MM)
Gel de agarosa con perlas embebidas en la capa superior
Dirección de la transferencia
Papel de filtro que actúa como mecha
Solución de transferencia

FIGURA 5

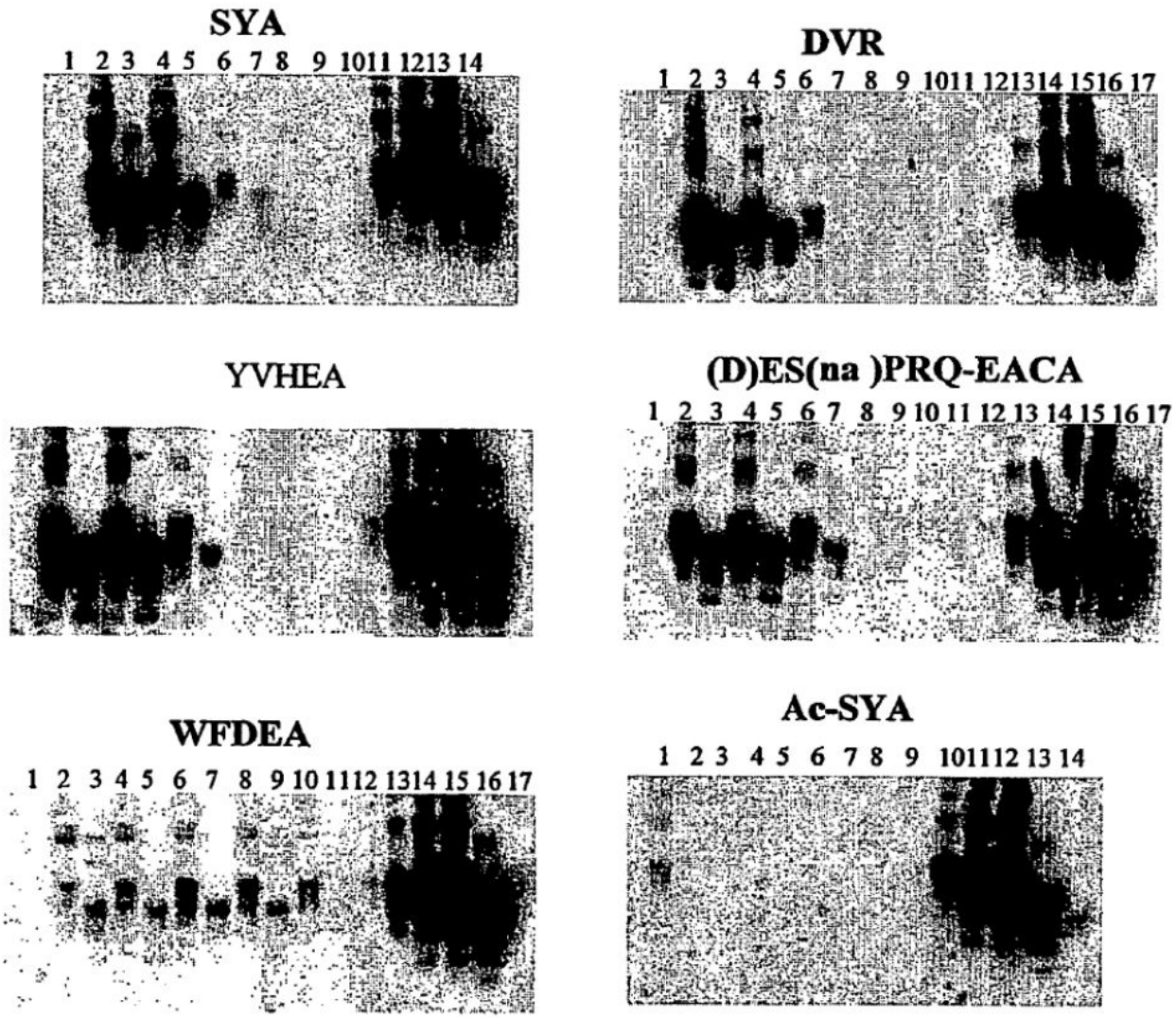

SYA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 1011 1213 14
DVR
1 2 3 4 5 6 7 8 9 1011 121314 1516 17
YVHEA
(D)ES(na)PRQ-EACA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
WFDEA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1112 1314 15 16 17
Ac-SYA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 101112 13 14

FIGURA 6