



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 617**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00941708 .0**

86 Fecha de presentación : **23.06.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1194164**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.04.2002**

54 Título: **Péptidos de proteínas de prión y sus usos.**

30 Prioridad: **23.06.1999 US 140634 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

73 Titular/es: **IDEXX Laboratories Inc.**
One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092, US

72 Inventor/es: **Cashman, Neil, R.;**
Paramithiotis, Eustache;
Slon-Usakiewicz, Jacek;
Haghighat, Ashkan;
Pinard, Marc y
Lawton, Trebor

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Péptidos de proteínas de príon y sus usos.

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a anticuerpos específicos de PrP^{Sc} y a péptidos utilizados para su generación. Estos anticuerpos son adecuados para detectar PrP^{Sc} en una muestra y para purificar PrP^{Sc}. Además, la invención se refiere a medios diagnósticos para la detección de PrP^{Sc}, a fármacos que contienen o mimetizan epítopos conformacionales específicos de PrP^{Sc} y a métodos para la descontaminación de priones.

Los priones son agentes infecciosos que están asociados con síndromes neurodegenerativos caracterizados por cambio esponjiforme (por ejemplo, microcavitación del cerebro, habitualmente predominante en la materia gris), pérdida de células neuronales, proliferación astrocítica desproporcionada respecto a la pérdida neuronal, y acumulación de una proteína amiloidogénica anormal, algunas veces en placas discretas en el cerebro. Es posible que la neurodegeneración en las enfermedades causadas por priones comparta determinados mecanismos subyacentes con otros síndromes neurodegenerativos más comunes tales como la Enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson.

Los agentes que transmiten estas enfermedades difieren en gran medida de los virus y viroides en que en los materiales infecciosos no se ha detectado de manera reproducible una evidencia química o física de la presencia de un componente ácido nucleico (Prusiner, *Science*, 216:136-144, 1982). Una etapa fundamental en el estudio de los priones y de las enfermedades que provocan fue el descubrimiento y la purificación de una proteína denominada proteína príon (PrP) (Bolton, *et al. Science*, 218:1309-11, 1982; Prusiner *et al., Biochemistry*, 21:6942-50, 1982; McKinley *et al., Cell*, 35:57-62, 1983). Cuando se purificó utilizando digestión con proteinasa K, se descubrió una proteína de 27-30 kD resistente a proteasas en cerebros de hámster afectados por scrapie y se denominó PrP 27-30, que posteriormente se descubrió que era un fragmento de PrP^{Sc} (Bolton, *Science*, 218:1309-1311, 1982).

Según la hipótesis del príon, la infectividad del príon reside en PrP^{Sc}. PrP^{Sc} está al menos asociada de manera sólida con la infectividad y es un sustituto serio para la infección por priones. PrP^{Sc} es una variante conformacional de una proteína celular codificada por el anfitrión denominada PrP^C (Oesch *et al., Cell*, 40:735-746, 1985) que es una proteína de la superficie celular unida por glicosilfosfatidilinositol (GPI) con una masa molecular de 33-35 kD.

PrP^C se ha aislado a partir de cerebro normal y se ha visto que es sensible a proteasas y que no está asociada con la actividad productora de la enfermedad de scrapie (Bendheim, *et al., Ciba Found. Symp.* 164-177, 1988). Según la teoría del príon, PrP^C se convierte en PrP^{Sc} de manera autocatalítica (Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95:13363-83, 1998). Más recientemente, se ha publicado que PrP^C puede convertirse *in vitro* en una forma resistente a proteasas mediante PrP^{Sc} (Kocisko *et al., Nature*, 370:471-473, 1994). PrP^C es una proteína de membrana conservada evolutivamente cuya función biológica o fisiológica real se desconoce. Los ratones desprovistos de PrP^C son viables y no muestran signos obvios de deterioro neurológico ni físico (Bueler *et al., Nature*, 356:577-582, 1992). Además, estos ratones no son susceptibles a infecciones por priones, lo que recalca la gran importancia de PrP en la replicación de la infectividad (Bueler *et al., Cell*, 73:1339-1347, 1993; Prusiner *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10608-10612, 1993). Las investigaciones dirigidas a ratones que carecen del gen de PrP ("knockout" para PrP) mostraron una función sináptica defectuosa (Collinge *et al., Nature*, 370:295-297, 1994) y una regulación del sueño alterada (Tobler *et al., J Neurosci.*, 17:1869-79). Más aún, se ha mostrado que PrP^C modifica la activación de las células T inducida mediante estimulación con concavalina A (Cashman *et al., Cell* 61:185-192, 1990), lo que indica un papel funcional de la proteína.

Las enfermedades causadas por priones son un grupo de síndromes neurodegenerativos que progresan rápidamente, mortales y sin tratamiento. Las enfermedades causadas por priones en los seres humanos incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD), que tiene formas esporádicas, iatrogénicas y familiares; y la variante de CJD ("CJDv") que se produce probablemente por el consumo de tejidos de ganado vacuno contaminados con el agente de la encefalopatía esponjiforme bovina (revisado en Cashman, *Can. Med. Assoc. J.* 157:1381-5, 1997). La CJD se ha transmitido accidentalmente entre seres humanos mediante hormonas pituitarias cadavéricas contaminadas, trasplante de dura mater, instrumentación neuroquirúrgica y trasplante de córnea (Brown *et al., Lancet* 340:24-7, 1992). El riesgo potencial de transmitir CJD a través de la sangre y de los productos sanguíneos es una preocupación mundial. Más aún, el scrapie en ovejas y cabras es una enfermedad relacionada con priones común e importante económicamente en América del Norte al igual que la encefalopatía esponjiforme bovina (BSE) lo es en el Reino Unido. Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Reino Unido se han destruido más de 4.347.380 unidades de ganado vacuno por considerarse lo suficientemente viejos como para presentar posiblemente el agente causante de la enfermedad. El Ministerio de Agricultura ha estimado que el coste total de la epidemia alcanzará \$7,13 billones en 2002. Se ha confirmado que más de 173.000 bovinos en todo el Reino Unido están infectados y cientos de miles más pueden haber entrado en la cadena alimenticia sin haber sido detectados.

Además, los Estados Unidos y Canadá han implementado un aplazamiento en la donación de sangre para individuos que residieron en el Reino Unido durante los años anteriores y los que constituyen el pico de la epidemia de BSE. Dicha restricción se ha adoptado como precaución frente al riesgo de transmitir una CJDv, que hasta la fecha ha afectado a 60 Ingleses desde 1996. Los Canadian Blood Services estiman que 120.000 de sus 600.000 donantes activos, o

el 22%, han visitado el Reino Unido desde 1980 (Montreal Gazette, 6 de mayo, 1999). Se han reclutado muchos donantes nuevos para reemplazar a éstos lo que ha provocado numerosas preocupaciones. Una de dichas preocupaciones es que la sangre de los donantes nuevos no es tan segura ya que sólo se ha cribado una vez para enfermedades tales como hepatitis y virus de la inmunodeficiencia humana.

De acuerdo con esto, existe una necesidad de métodos de diagnóstico adecuados para el cribado de gran cantidad de sangre o tejidos infectados con priones. La disponibilidad de anticuerpos que distingan PrP^C de PrP^{Sc} sería, por lo tanto, muy valiosa para el desarrollo de un ensayo para la infección por priones. Además, existe una necesidad de agentes terapéuticos que prevengan y/o traten las enfermedades causadas por priones.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de éste que se une con una afinidad de unión alta a un epítipo YYX de una PrP^{Sc} de mamíferos.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une con una afinidad de unión alta a un epítipo YYX de una PrP^{Sc} de mamíferos.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo del primer aspecto.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un kit de ensayo inmunológico que comprende el anticuerpo del primer aspecto y un medio para detectar el anticuerpo.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para detectar PrP^{Sc} en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) poner en contacto dicha muestra biológica con un anticuerpo del primer aspecto en condiciones que permitan la formación de complejos entre dicho anticuerpo y PrP^{Sc}; y

(b) detectar dichos complejos como una indicación de que PrP^{Sc} está presente en dicha muestra biológica.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para generar un anticuerpo que se une con una afinidad de unión alta a una PrP^{Sc} de mamíferos, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar un péptido de una proteína prión que comprende un epítipo accesible que tiene dos o más cadenas laterales de aminoácidos;

(b) inmunizar un mamífero no humano con dicho péptido de una proteína prión de la etapa (a); y

(c) purificar un anticuerpo que se une con una afinidad de unión alta a un epítipo YYX de una PrP^{Sc} de mamíferos a partir de un tejido de dicho mamífero o de un hibridoma obtenido utilizando dicho tejido.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método para descontaminar PrP^{Sc} de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) tratar la muestra biológica con un anticuerpo del primer aspecto durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la formación de un complejo anticuerpo anti-PrP^{Sc}:PrP^{Sc}; y

(b) recuperar dicho complejo anticuerpo anti-PrP^{Sc}:PrP^{Sc} de dicha muestra biológica.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un método para inhibir PrP^{Sc} en una muestra biológica aislada a partir del cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho método:

tratar la muestra biológica con un anticuerpo del primer aspecto durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la formación de un complejo anticuerpo anti-PrP^{Sc}:PrP^{Sc}.

En un noveno aspecto, la invención proporciona la utilización de un anticuerpo del primer aspecto en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades causadas por priones.

Las realizaciones particulares de cada uno de los aspectos de la invención se muestran en las reivindicaciones adjuntas.

Como se discute en la presente memoria, se proporcionan evidencias que demuestran que un epítipo YYX continuo de PrP es útil para generar anticuerpos específicos de PrP^{Sc}. En particular, hemos demostrado que los protocolos de inmunización que utilizan un péptido sintético corto continuo de la secuencia de PrP resultaba en la generación de anticuerpos policlonales y monoclonales con una afinidad alta específicos de PrP^{Sc}. Más aún, también se observó que dichos anticuerpos no presentaban una reactividad detectable con PrP^C. En un ejemplo, se eligió un péptido que incluye una secuencia YYR tomando como base el análisis de modelos moleculares del cambio conformacional de

PrP^C a PrP^{Sc}, que predice una secuencia que es accesible para los disolventes en la superficie molecular de la isoforma PrP^{Sc} de la proteína.

De acuerdo con esto, la invención presenta anticuerpos anti-PrP específicos de epítipo o fragmentos de éstos que se unen con una afinidad de unión alta a un epítipo YYX continuo de una PrP^{Sc} de mamíferos. Preferiblemente, el anticuerpo se une a un epítipo YYR; un epítipo YYQ; o un epítipo YYD de una PrP^{Sc} de mamíferos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal. Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos IgG, IgM, IgE, IgD o IgA así como fragmentos tales como fragmentos Fab o Fv. Dichos anticuerpos anti-PrP están dirigidos ventajosamente frente a un epítipo particular de PrP^{Sc}. Además, los anticuerpos que se unen a PrP pueden utilizarse para cuantificar PrP^{Sc} en cualquier ensayo de diagnóstico estándar.

En el quinto aspecto, la invención presenta la utilización de anticuerpos anti-PrP específicos de epítipo en un procedimiento de detección inmunológico para el diagnóstico de priones específicos de enfermedades infecciosas. Los anticuerpos anti-PrP que reaccionan específicamente con PrP^{Sc} pueden prepararse utilizando un péptido PrP adaptado apropiadamente como se ha ilustrado en la presente memoria. La invención se refiere particularmente a medios de diagnóstico que contienen el péptido PrP y/o anticuerpos anti-PrP específicos de epítipo. Además, la invención se refiere a anticuerpos que se unen selectivamente a la proteína prión específica de la enfermedad y no a la proteína prión normal.

La invención presenta un péptido de una proteína prión con la secuencia tirosina-tirosina-arginina (YYR). Preferiblemente, el péptido es un tripéptido que está unido a un vehículo, lo que hace al péptido más inmunogénico, lo que permite la preparación de anticuerpos anti-PrP con una afinidad alta. La síntesis de dicho tripéptido se describe en la presente memoria. Según la invención, dichos péptidos cortos (por ejemplo, los tripéptidos YYR, YYQ o YYD) representan determinantes que son accesibles en la isoforma PrP^{Sc} de la proteína prión pero no en la isoforma PrP^C normal y/o están agrupados en PrP^{Sc} de una manera que permite la detección por anticuerpos. Por ejemplo, el tripéptido YYR está contenido en dos de los tres epítopos de la proteína prión; sin embargo, este tripéptido no se ha identificado anteriormente como la base específica de la inmunoreactividad de PrP^{Sc}. Más aún, dichas secuencias están muy conservadas en varias especies incluyendo, pero sin limitarse a, bovinos, ser humano, oveja, ratón y hámster (Figura 2).

La invención presenta además un péptido sintético que tiene la fórmula:



en la que A es cualquier aminoácido o está ausente; B es cualquier aminoácido o está ausente; y n es de 0 a 10, inclusive. En realizaciones preferidas, al menos uno de A y B no es Tyr. En otras realizaciones preferidas, A o B se eligen de Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp. En otras realizaciones preferidas, el péptido está unido a un vehículo inmunológico. Dichos péptidos incluyen, sin limitación, A-Tyr-Tyr-Arg (SEQ ID NO: 12); A-Tyr-Tyr-Gln (SEQ ID NO: 13); A-Tyr-Tyr-Asp (SEQ ID NO: 14); o cualquier sal de éstos aceptable desde un punto de vista farmacéutico.

La invención presenta un péptido sintético que tiene la fórmula:



en la que A es cualquier aminoácido o está ausente; B es cualquier aminoácido o está ausente; C es cualquier aminoácido o está ausente; D es cualquier aminoácido o está ausente; y n es de 0 a 10, inclusive. En realizaciones preferidas, al menos uno de A, B, C y D no es Tyr. En otras realizaciones preferidas, A, B, C o D se eligen de Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp. En otras realizaciones preferidas adicionales, A se elige de Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Trp y B, C y D se eligen de Arg, Gln, Asp, Glu, Phe o Trp. Un péptido ejemplar incluye, sin limitación, A-Tyr-Tyr-Arg-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Tyr (SEQ ID NO: 25); o una sal de éste aceptable desde un punto de vista farmacéutico. En otras realizaciones, el péptido está unido a un vehículo inmunológico.

La invención se refiere a péptidos prión sintéticos cortos (por ejemplo, de tres a diez aminoácidos o de cuatro a doce aminoácidos, inclusive) que tienen antigenicidad como una PrP^{Sc}, incluyendo uno o más de los siguientes: una tetrarepetición de treonina encontrada en T189-193 de PrP de ratón o los restos de aminoácidos correspondientes de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; los restos de aminoácidos M128, M133 o M153 de PrP de ratón o los restos de aminoácidos correspondientes de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; el resto de aminoácido H186 de PrP de ratón o el resto de aminoácido correspondiente de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; los restos de aminoácidos Q159, Q167, Q185 o Q216 de PrP de ratón o los restos de aminoácidos correspondientes de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; el resto de aminoácido N158 de PrP de ratón o el resto de aminoácido correspondiente de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; los restos de aminoácidos M128, M133 o M153 de PrP de ratón o los restos de aminoácidos correspondientes de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; los restos de aminoácidos L124 o L129 de PrP de ratón o los restos de aminoácidos correspondientes de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina; o los restos de aminoácidos I181 o I183 de PrP de ratón o los restos de aminoácidos correspondientes de PrP humana, de oveja, de cabra o bovina.

Los péptidos descritos en la presente memoria pueden prepararse mediante síntesis química según métodos conocidos en la técnica.

Además, un péptido PrP puede utilizarse para preparar anticuerpos anti-PrP^{Sc} específicos de epítipo. En particular, el péptido proporciona las ventajas de una sustancia muy pura, y es adecuado para preparar anticuerpos anti-PrP que pueden utilizarse para detectar PrP^{Sc} en una muestra, por ejemplo, en ensayos inmunológicos estándar tales como inmunoprecipitaciones, ELISA, y citometría de flujo. El péptido PrP (por ejemplo, YYR) puede utilizarse para preparar tanto anticuerpos policlonales anti-PrP^{Sc} específicos de epítipo (antisueros) como anticuerpos monoclonales anti-PrP específicos de epítipo. Estos anticuerpos se preparan según métodos estándar conocidos en la técnica, y se unen preferiblemente a un material que actúa como vehículo para la generación de anticuerpos.

Más aún, los compuestos que explotan la exposición de YYX específica de PrP^{Sc} pueden diseñarse u obtenerse de manera racional a partir de bibliotecas combinatorias que mimetizan la interacción de YYX con anticuerpos anti-YYX. Estos compuestos son útiles en diagnósticos de priones o como terapias para las enfermedades causadas por priones.

En el tercer aspecto, la invención presenta una preparación farmacéutica para la terapia y prevención de enfermedades causadas por priones que comprende un anticuerpo policlonal o monoclonal en un vehículo farmacéutico. Dichos fármacos contienen anticuerpos anti-PrP específicos de epítipo según la invención.

Si se desea, los péptidos y anticuerpos de la invención pueden proporcionarse en la forma de sales aceptables desde un punto de vista farmacéutico. Los ejemplos de sales preferidas son aquellos con ácidos orgánicos aceptables desde un punto de vista terapéutico, por ejemplo, ácido acético, láctico, maleico, cítrico, málico, ascórbico, succínico, benzoico, salicílico, metanosulfónico, toluensulfónico o pamoico, así como ácidos poliméricos tales como ácido tánico o carboximetil celulosa y sales con ácidos inorgánicos tales como ácidos hidrohálicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, o ácido fosfórico. Además, cualquiera de los péptidos o anticuerpos de la invención puede administrarse a un mamífero, particularmente a un ser humano, según una de las vías tradicionales (por ejemplo, por vía oral, parenteral, transdérmica o transmucosal) en una formulación de liberación prolongada utilizando un polímero biocompatible biodegradable o mediante la utilización de micelas, geles y liposomas.

Se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad causada por priones en un animal (por ejemplo, un ser humano, un bovino, oveja, cerdo, cabra, perro o gato). El método puede implicar administrar al animal una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico del anticuerpo anti-PrP específico de epítipo o del péptido PrP que bloquea la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}, inhibe la formación del agregado PrP^{Sc}:PrP^{Sc}, o bloquea el reclutamiento de PrP^C a PrP^{Sc}. El péptido PrP también puede utilizarse para inmunizar al anfitrión frente a enfermedades causadas por priones estimulando la producción de anticuerpos específicos de PrP^{Sc} en el anfitrión.

En los aspectos cuarto y quinto, la invención presenta métodos y kits para detectar PrP^{Sc} en una muestra biológica.

En el séptimo aspecto, la invención presenta métodos para descontaminar PrP^{Sc} de una muestra biológica. El método implica las etapas de: (a) tratar la muestra biológica con el anticuerpo policlonal o monoclonal (o un fragmento o análogo de éste), permitiendo el tratamiento la formación del complejo anticuerpo:PrP^{Sc}; y (b) recuperar el complejo anticuerpo:PrP^{Sc} de la muestra biológica. Dicho procedimiento de descontaminación también puede implicar la perfusión de una muestra biológica con anticuerpo (o un fragmento o análogo de éste) para eliminar o inactivar PrP^{Sc}.

Se describe un método para identificar un compuesto para el tratamiento de una enfermedad causada por priones. El método incluye las etapas de (a) determinar la unión de un anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en presencia de un compuesto de ensayo; y (b) determinar la unión del anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en ausencia del compuesto de ensayo; en el que un nivel de unión del anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en presencia del compuesto de ensayo que es menor que el nivel de unión del anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en ausencia del compuesto de ensayo es una indicación de que el compuesto de ensayo es un compuesto terapéutico potencial para el tratamiento de una enfermedad causada por priones. Preferiblemente, el anticuerpo anti-YYX es un anticuerpo anti-YYR, anticuerpo anti-YYD o anticuerpo anti-YYQ.

Se describe un método para identificar un compuesto para diagnosticar una enfermedad causada por priones. El método incluye las etapas de (a) determinar la unión de un anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en presencia de un compuesto de ensayo; y (b) determinar la unión del anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en ausencia del compuesto de ensayo; en el que un nivel de unión del anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en presencia del compuesto de ensayo que es menor que el nivel de unión del anticuerpo anti-YYX a PrP^{Sc} en ausencia del compuesto de ensayo es una indicación de que el compuesto de ensayo es un compuesto útil potencial para diagnosticar una enfermedad causada por priones.

Se consideran los compuestos terapéuticos y de diagnóstico identificados según cualquiera de los métodos mencionados anteriormente.

Por "unión de alta afinidad" se quiere decir una unión con una constante de afinidad menor de 10 μ M, preferiblemente menor de 1 μ M, más preferiblemente menor de 100 nM y lo más preferiblemente menor de 10 nM.

Por “enfermedades causadas por priones” se quiere decir un grupo de trastornos degenerativos cerebrales mediados por priones que progresan rápidamente, mortales y sin tratamiento que incluye, sin limitación, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), CJD variante, CJD iatrogénica, CJD familiar, Kuru, síndrome de Gerstmann-Straussler e insomnio familiar mortal en los seres humanos (Prusiner, Science 252:1515-1522, 1991), scrapie en ovejas y cabras, y encefalopatía espongiforme en ganado vacuno, así como las enfermedades causadas por priones descritas recientemente en otros rumiantes y en gatos.

Por “tratamiento de las enfermedades causadas por priones” se quiere decir la capacidad de reducir, prevenir, estabilizar o retardar la aparición de cualquier síntoma asociado con las enfermedades causadas por priones, particularmente los que resultan en cambio espongiforme, pérdida de células neuronales, proliferación astrocítica, acumulación de la proteína PrP^{Sc}, demencia o muerte.

Por “anticuerpo purificado” se quiere decir un anticuerpo que en al menos el 60% en peso no contiene proteínas ni moléculas orgánicas naturales con las que está asociado de forma natural. Preferiblemente, la preparación es al menos 75%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 99% en peso, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo específico de YYX (por ejemplo, un anticuerpo específico de YYR, YYQ o YYD). Un anticuerpo purificado puede obtenerse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad utilizando YYX unido a sustrato y técnicas estándar.

Por “YYX” se quiere decir un péptido que tiene la secuencia Tirosina-Tirosina-X, en la que X es cualquier aminoácido. Por “YYR” se quiere decir un péptido que tiene la secuencia Tirosina-Tirosina-Arginina. Por “YYQ” se quiere decir un péptido que tiene la secuencia “Tirosina-Tirosina-Glutamina”. Por “YYD” se quiere decir un péptido que tiene la secuencia “Tirosina-Tirosina-Ácido aspártico”.

Por una “composición terapéutica” se quiere decir una composición apropiada para administrarse a un animal, por ejemplo, a un mamífero tal como un ser humano, una especie de ganado (por ejemplo, un bovino, cabra, cerdo u oveja) o una especie de animal doméstico.

Por una “molécula pequeña” se quiere decir un compuesto con un peso molecular menor de o igual a 10.000 Dalton, preferiblemente menor de o igual a 1.000 Dalton y lo más preferiblemente menor de o igual a 500 Dalton.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción siguiente de las realizaciones preferidas de ésta y a partir de las reivindicaciones.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1A es un gráfico que muestra dicroísmo circular de cambios conformacionales relacionados con el pH en PrP^C recombinante de ratón. La espectroscopía de dicroísmo circular en el UV lejano de PrP^C a pH 7,0 y 3,0 muestra un desplazamiento en la elipticidad molecular consistente con un cambio en la conformación de hélice alfa predominante a pH fisiológico a lámina beta predominante a pH bajo.

La Figura 1B es una representación gráfica que muestra la espectroscopía de fluorescencia de cambios relacionados con el pH en la orientación de los anillos aromáticos en PrP^C recombinante de ratón. Los cambios en la fluorescencia específica de las cadenas laterales de tirosina y triptófano son consistentes con tendencias opuestas respecto a la accesibilidad del disolvente cuando se reduce el pH.

La Figura 2 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de PrP de bovino (SEQ ID NO: 26), ser humano (SEQ ID NO: 27), oveja (SEQ ID NO: 28), ratón (SEQ ID NO: 29) y hámster (SEQ ID NO: 30). Los recuadros resaltan las dos secuencias YYR altamente conservadas en los aminoácidos 160-162 y 173-175, así como la secuencia YYQ/D en los aminoácidos 235-237 (según la secuencia de bovino).

La Figura 3 muestra una solución estructural por RMN de PrP^C de ratón, que resalta la localización y orientación de las secuencias YYR e YYD. Ninguno de los restos YY muestran la denominada orientación ortogonal en tándem de anillos aromáticos hacia la superficie molecular.

La Figura 4 es un esquema que muestra la generación de epítomos basada en un cambio en la orientación del anillo de tirosina que se produce con el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc}. Como se muestra en la Figura 3, dos restos YYR en PrP^C están orientados de manera que un anillo de tirosina es accesible para el disolvente, mientras que el otro es inaccesible para el disolvente en el interior molecular. (El tercer resto YY, que no se muestra en este esquema, está orientado de manera que los anillos de tirosina no son capaces de interactuar). Después de la conversión conformacional de PrP, los anillos de tirosina en uno o más restos YYX resultan accesibles en la superficie molecular en una orientación ortogonal en tándem que se estabiliza mediante interacciones de apilamientos pi. La arginina terminal planar (o aspartato/glutamina en el tercer resto) puede estabilizar adicionalmente la interacción tirosina-tirosina.

La Figura 5 muestra la inmunoprecipitación (IP) de PrP^{Sc} de ratón utilizando lechos magnéticos conjugados con proteínas control. El anticuerpo monoclonal 6H4 que no distingue PrP acoplado a lechos magnéticos (carriles 9-12) o lechos acoplados a BSA (lechos, carriles 5-8) se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de ratón normales (N) o infectados con scrapie ME7 (Sc). Los homogenados de cerebro se trataron con proteinasa K (+) o no (-) antes de

la inmunoprecipitación. En los carriles 1-4 (Carga) se muestran transferencia western directas de la misma cantidad de homogenados de cerebro que se utilizaron en las inmunoprecipitaciones. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 6 muestra la inmunoprecipitación (IP) de PrP^{Sc} de ratón utilizando lechos magnéticos conjugados con el anticuerpo policlonal anti-YYR, pAbC2. Los lechos magnéticos acoplados con pAbC2 (carriles 9-12) o lechos acoplados con BSA (lechos, carriles 5-8) se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de ratón normales (N) o infectados con scrapie ME7 (Sc). Los homogenados de cerebro se trataron con proteinasa K (+) o no (-) antes de la inmunoprecipitación. En los carriles 1-4 (Carga) se muestran transferencia western directas de la misma cantidad de homogenados de cerebro que se utilizaron en las inmunoprecipitaciones. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 7 muestra la inmunoprecipitación de PrP^{Sc} bovina utilizando lechos magnéticos conjugados con el anticuerpo policlonal de conejo, pAbC2. Se utilizaron lechos magnéticos acoplados con 6H4 (carriles 1 y 2) o con pAbC2 (carriles 3 y 4) para inmunoprecipitar homogenados de cerebro normales o BSE. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 8 muestra la inmunoprecipitación de PrP^{Sc} de ratón utilizando lechos magnéticos conjugados con el anticuerpo policlonal anti-YYR de cabra, p165. Los lechos magnéticos acoplados con el anticuerpo se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de ratón normales (N) o infectados con scrapie ME7 (Sc). Las muestras de scrapie se trataron con proteinasa K (+) o no (-) antes de la inmunoprecipitación. Carriles 1-3 (p165) pAb de cabra purificado por afinidad; Carriles 4-6 (IgG) IgG total de cabra; Carriles 7-9 (BSA) lechos conjugados con BSA; Carriles 10-12 (6H4) anticuerpo monoclonal anti-PrP que no discrimina, 6H4. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 9 muestra la inmunoprecipitación de PrP^{Sc} de ratón utilizando lechos magnéticos conjugados con anticuerpos monoclonales anti-YYR de ratón. Los lechos magnéticos acoplados con anticuerpo monoclonal se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de ratón normales (N) o infectados con scrapie ME7 (Sc). Las muestras de scrapie se trataron con proteinasa K (+) o no (-) antes de la inmunoprecipitación. 1A4 (carriles 1-3), 2C (carriles 4-6) y 6B1 (carriles 7-9) son anticuerpos monoclonales reactivos con scrapie. 19E (carriles 10-12) es un anticuerpo monoclonal que no reacciona con PrP. 6H4 (carriles 13-15) es un anticuerpo monoclonal anti-PrP que no discrimina entre PrP^C y PrP^{Sc}. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra. En los carriles 10-12, correspondientes a 19E, la cadena de inmunoglobulina pesada (45 kDa) y ligera (30 kDa) de los conjugados anticuerpo-lecho co-migran con los dímeros PrP y una de las variantes de glicosilación de PrP, respectivamente.

La Figura 10 muestra la liberación de la cadena ligera y la cadena pesada de la inmunoglobulina de los conjugados anticuerpo-lecho. Los conjugados de los lechos magnéticos con el anticuerpo monoclonal 1A4 y 6B1 se procesaron para SDS PAGE y análisis por transferencia western en ausencia de homogenados de cerebro. Los geles de SDS PAGE se corrieron en condiciones no reductoras para estos dos conjugados anticuerpo-lecho y en condiciones reductoras para el anticuerpo monoclonal 6H4 no conjugado. Las transferencias se revelaron con conjugados Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 11 muestra la inmunoprecipitación de múltiples muestras de PrP^{Sc} de ratón utilizando lechos magnéticos acoplados con el anticuerpo monoclonal anti-YYR, 1A4. Los conjugados de lechos magnéticos con 1A4 se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de ratón normales (N, carril 19), cuatro infectados con scrapie ME7 (carriles 1-8) o cinco con scrapie 139A (carriles 9-18). Las muestras de scrapie se trataron con proteinasa K (+) o no (-) antes de la inmunoprecipitación. Los conjugados de lecho magnético con 6H4 se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de ratón normales (N, carril 20) como control. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 12 muestra la dependencia conformacional de la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-YYR frente a PrP^{Sc}. Homogenados de cerebro de ratón normales (N), e infectados con scrapie ME7 y 139A se resolvieron en geles de SDS PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con 1A4 (carriles 1-3) ó 6B1 (carriles 4-6) seguido de conjugados Ig-HRP anti-ratón de cabra. Las transferencias se volvieron a ensayar, sin modificación, utilizando 6H4 (carriles 7-9) y conjugados Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 13 muestra un análisis de esplenocitos de ratón normales disociados que se han hecho reaccionar con anticuerpos monoclonales anti-PrP^{Sc} tratados con fluoresceína 1A4, 2B5, 6B1, 17B y 18B utilizando citometría de flujo. Como control se utilizó Ig anti-ratón de cabra (GAMiG) tratada con fluoresceína. Las células se seleccionaron en la adquisición mediante parámetros de dispersión frontales y laterales característicos y por exclusión de yoduro de propidio. Las líneas punteadas representan la fluorescencia de fondo; las líneas sólidas representan la tinción del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se consiguieron marcar con fluoresceína lo que se determinó mediante

la emisión de fluoresceína en un lector de placas de 96 pocillos y mantuvieron su reactividad frente al antígeno inmunizante mediante ELISA.

La Figura 14 muestra la inmunoprecipitación de PrP^{Sc} de hámster utilizando anticuerpo monoclonal de ratón y anticuerpo policlonal de cabra anti-YYR. Los conjugados de lechos magnéticos con anticuerpo monoclonal 1A4 y anticuerpo policlonal p165 se hicieron reaccionar con homogenados de cerebro de hámster normales (N) o infectados con scrapie (Sc). Las muestras de scrapie se trataron con proteinasa K (+) o no (-) antes de la inmunoprecipitación. Los inmunoprecipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las transferencias se ensayaron con anticuerpo monoclonal 6H4 seguido de conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra.

La Figura 15 muestra una detección por inmunotransferencia de PrP^C sensible a proteasas en cerebro bovino normal (carriles 1 y 4) y PrP^C y PrP^{Sc} resistente a proteasas en cerebro BSE (carriles 2 y 3). Los homogenados de cerebro tratados o no tratados con proteinasa K (+ o -) se resolvieron en electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a membrana PVDF para inmunotransferencia. La membrana se ensayó con mAb 6H4, se lavó y se reveló con ECL y se expuso a película de rayos X según procedimientos estándar.

La Figura 16 muestra sistemas de ELISA que demuestran el reconocimiento específico de PrP^{Sc} bovina por el anticuerpo policlonal anti-YYR de conejo, pAbC2. La reacción del extracto de cerebro BSE con el ectodominio del receptor de prión soluble adsorbido en ELISA (PC2) o con la proteína control (Mek) mostró una detección estadísticamente significativa por pAbC2 de PrP^{Sc} unido al receptor en comparación con los pocillos control (Panel A; valor p=0,008). También se muestra el reconocimiento de PrP^C recombinante bovina (bPrP) mediante ELISA directo con pAbC2 o mAb6H4 (Panel B).

Descripción detallada de la invención

Hemos determinado que la orientación de cadenas laterales aromáticas seleccionadas de tirosinas de un epítipo YYX (por ejemplo, YYR) en uno o más sitios de PrP define un epítipo inmunológico continuo específico para la superficie molecular de PrP^{Sc}, mientras que se sabe que las mismas cadenas laterales de tirosina son inaccesibles en la conformación PrP^C, según soluciones estructurales por RMN publicadas de PrP^C (Riek *et al.*, *Nature* 382:180, 1996, Donne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13452-7, 1997; Zahn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:145-50, 2000). Este descubrimiento facilita la generación de anticuerpos específicos de PrP^{Sc} que pueden utilizarse para fines diagnósticos y terapéuticos, así como el desarrollo de cribados para compuestos nuevos útiles para detectar o combatir priones y sus enfermedades y trastornos relacionados.

Generación de Anticuerpos Específicos de Epítipo frente a PrP^{Sc}

Los anticuerpos reconocen específicamente proteínas a través de determinantes o epítopos únicos de aminoácidos. Estos determinantes o epítopos pueden tener una secuencia de aminoácidos lineal o distintas conformaciones formadas por aminoácidos en un espacio tridimensional. Considerando que la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} implica un cambio importante en la conformación de la proteína, es probable que se formarán o aparecerán epítopos únicos después de la conversión. Por lo tanto, como se discute en la presente memoria, hemos desarrollado una hipótesis denominada de cadena lateral relacionada con la conversión de proteínas prión. Según este esquema, las cadenas laterales que están normalmente secuestradas en el interior de PrP^C y que son inaccesibles para los disolventes pueden ser accesibles para los disolventes en PrP^{Sc}. Por lo tanto, es de esperar que la mayoría de las cadenas laterales ahora expuestas sean hidrofóbicas, como resulta evidente por el incremento de la exposición al disolvente de restos hidrofóbicos en un intermedio estable semejante a PrP^{Sc} (Swietnicki *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:27517-20, 1997). La extrusión de estas cadenas laterales hidrofóbicas, solas o en combinación con cadenas laterales que están presentes normalmente en la superficie molecular de PrP^C, forma la base de epítopos únicos para el reconocimiento de PrP^{Sc} por los anticuerpos. Más aún, es de esperar que estas cadenas laterales hidrofóbicas accesibles de la superficie cambien la solubilidad y las características de agregación de PrP^{Sc}, lo que se corresponde con las propiedades conocidas de esta isoforma estructural. Las cadenas laterales ahora accesibles también pueden participar en el proceso de reclutamiento de PrP^C a PrP^{Sc}.

El ensayo de esta hipótesis empezó *in vitro* examinando la orientación de los anillos de triptófano y tirosina, dos cadenas laterales hidrofóbicas de aminoácido de las que se obtuvo información mediante estudios espectroscópicos de fluorescencia. En primer lugar, se indujo una transición de lámina beta de PrP^C recombinante de ratón mediante pH bajo con el fin de modelizar los cambios estructurales que caracterizan la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} (Hornemann y Glockshuber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6010, 1998). La Figura 1A demuestra un desplazamiento de la elipticidad molecular mediante dicroísmo circular de un pH de 7,0 a 3,0 consistente con un cambio de PrP^C con hélice alfa predominante a lámina beta predominante (desplazamiento de los espectros de mínima doble a única a las frecuencias respectivas apropiadas).

En segundo lugar, se examinó la accesibilidad a los disolventes de las cadenas laterales de tirosina y triptófano en PrP^C recombinante mediante titulación del pH utilizando espectroscopía de fluorescencia estándar (Figura 1B). Este estudio se basa en el principio de que las cadenas laterales aromáticas que están cerca de otras cadenas laterales de aminoácidos (es decir, en el interior de la proteína) presentarán una fluorescencia específica diferente de las cadenas laterales aromáticas expuestas al agua (por ejemplo, Chin *et al.*, *Biochemistry* 31:1945-51, 1992). Cuando se sometió

PrP^C recombinante de ratón a un pH bajo, los grupos aromáticos del triptófano y la tirosina mostraron comportamientos opuestos consistentes con la diferente exposición al disolvente.

El examen de la secuencia de aminoácidos de PrP^C humana, bovina y murina reveló trece restos de tirosina (Figura 2). Once tirosinas en PrP humana y bovina y 10 en PrP murina están contenidos en los 2/3 C terminales de la proteína, que comprende el dominio estructurado resistente a proteasas necesario y suficiente para la infectividad del prión. Es importante resaltar, que seis tirosinas en este dominio están presentes en el resto emparejado no habitual “YY” (Figura 2). Dos de los tres pares están junto a una arginina C terminal (R), mientras que el tercer resto YY está junto a una aspartato C terminal (D) en ratones y hámsters o una glutamina (Q) en ganado bovino, ovejas y seres humanos. R contiene un grupo guanido terminal, mientras que Q y D contienen enlaces carboxamida y carbonilo que son planares. Dicho aminoácido terminal planar en el resto YY puede interactuar con los anillos de tirosina expuestos para estabilizarlos o guiarlos para el reconocimiento inmune.

Además, el examen de las estructuras resueltas por RMN de PrP^C murina, de hámster y humana revelaron que ninguno de los pares de tirosina identificados están orientados con ambos de sus anillos en una configuración ortogonal en tándem accesible en la superficie molecular (Rick *et al.*, *Nature*, 382:180, 1996; Donne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:13452, 1997; Zahn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:145-50, 2000) (Figura 3). Es razonable suponer que la exposición incrementada de tirosina en la superficie de PrP^C o PrP^{Sc} tratadas con ácido está asociada con algunos de los pares de tirosina. Una conformación estable de los anillos de tirosina se refiere como apilamiento pi, en la que los dos anillos están apilados de una manera paralela ligeramente desplazada (ilustrado esquemáticamente en la Figura 4). Aunque es estable, una búsqueda preliminar en bases de datos estructurales de anillos de tirosina de superficie accesibles con apilamiento pi identificó sólo 4 proteínas adicionales con una orientación similar, ninguna de las cuales está en el ectodominio de proteínas de membrana. Por lo tanto, se piensa que un epítipo específico de PrP^{Sc} nuevo es pares de tirosina en una orientación de apilamiento pi con o sin la contribución de cadenas laterales de arginina, glutamina y aspartato (que, al ser planares, también pueden participar en una interacción de apilamiento pi con su tirosina precedente).

Además de los cambios en la orientación de las cadenas laterales de tirosina en PrP^{Sc}, también es posible que los tres restos YYR se vuelvan más accesibles desde un punto de vista inmunológico en PrP^{Sc} gracias a desplazamientos en el espacio que existe entre ellos. Un anticuerpo IgG típico está comprendido de dos regiones de unión al antígeno idénticas que están conectadas a una región constante mediante una región bisagra flexible. Durante el cambio conformacional de PrP^C a PrP^{Sc}, los restos YYR se mueven probablemente los unos respecto a los otros (Korth *et al.*, *Nature*, 390:74-77, 1997), pasando de estar relativamente separados a relativamente cercanos. Además, el reconocimiento de IgG de restos YYR en PrP^C puede no ser favorable porque dos restos críticos están en diferentes lados de la molécula, lo que da lugar a que el reconocimiento sea de naturaleza univalente de baja avididad en lugar de la interacción de alta avididad con la que participan en el reconocimiento del antígeno las dos regiones de unión de IgG.

Nuestros datos con PrP^C y PrP^{Sc} bovinas muestran que los anticuerpos anti-YYR reconocen específicamente PrP^{Sc} mediante ensayos de inmunoprecipitación y ELISA (véase más adelante) lo que es consistente con cambios en la accesibilidad de las cadenas laterales de tirosina en PrP^{Sc} y/o la proximidad de los epítopos YYR. El resto de aminoácido, arginina, también se piensa que es importante en la generación y en la especificidad del reconocimiento del anticuerpo YYR. Se cree que la interacción electrostática entre las cadenas laterales polares de tirosina y la cadena lateral muy básica de arginina contribuye a la naturaleza del epítipo YYR tanto en la inmunización con el tripéptido YYR como en el reconocimiento de PrP^{Sc} por el anticuerpo obtenido. Es notable que el tercer resto dimérico YY en el bucle terminal de PrP esté asociado con una glutamina en algunas especies (incluyendo los seres humanos y el ganado vacuno) que es una sustitución parcialmente conservativa con arginina y con aspartato en otras especies (incluyendo ratones y hámsters) que es una sustitución no conservativa. Los aminoácidos ejemplares que tienen cadenas laterales planares incluyen arginina, aspartato y glutamina.

El fenómeno de la exposición de la cadena lateral de aminoácidos en la conversión conformacional de PrP^C a PrP^{Sc} puede no ser únicamente aplicable a los pares de tirosina. Es posible que en otros aminoácidos con cadenas laterales voluminosas se produzca una baja tolerancia de estas cadenas laterales en el núcleo de PrP^{Sc} y que estas cadenas laterales solas o en combinación con otros restos locales formen la base de la inmunorreactividad única de PrP^{Sc}. Los epítopos inmunológicos distintos entre PrP^C y PrP^{Sc} forman la base de un ensayo diagnóstico para PrP^{Sc} y también son útiles en el tratamiento e inmunización de seres humanos y animales frente a las enfermedades causadas por priones. Se piensa que la exposición de cadenas laterales hidrofóbicas es la responsable de la hidrofobicidad incrementada y la agregación aumentada de PrP^{Sc} comparada con PrP^C.

Los ejemplos de cadenas laterales voluminosas que no son completamente accesibles para el disolvente en PrP^C incluyen los siguientes (los restos de aminoácidos están numerados según la secuencia de PrP de ratón):

1. Tirosinas que no están contenidas en el resto YYX, incluyendo Y127, Y156, Y217.
2. Una tetrarepetición de treonina, T189-193, no expuesta parcialmente al disolvente.
3. Histidina H186.
4. Glutamina Q159, Q167, Q185, Q216.

5. Asparagina N158.

6. Metionina M128, M133, M153.

7. Leucina L124, L129.

8. Isoleucina I181, I183.

Como se describe más adelante, se sintetizaron péptidos que contienen el epítipo YYR. Estos péptidos se conjugaron con un vehículo y se utilizaron para inmunizar conejos o ratones para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales y monoclonales se ensayaron entonces para estudiar su especificidad frente a PrP^{Sc}. Los resultados indicaron que dichos anticuerpos se unen específicamente con una afinidad de unión alta a PrP^{Sc}.

Los ejemplos siguientes descritos a continuación se proporcionan con el fin de ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitativos.

Anticuerpos Específicos de PrP^{Sc}

Se obtuvieron antisueros policlonales, pAbC2, en conejos frente a un péptido YYR unido a KLH. El suero se recogió de cada conejo después del régimen de inmunización y se purificó la IgG total utilizando una columna con Proteína A. La actividad anti-PrP^{Sc} de estas muestras se ensayó en reacciones de inmunoprecipitación utilizando homogenados de cerebro de ratones normales o infectados con scrapie. Los análisis iniciales de los homogenados de cerebro utilizados en estos estudios revelaron cantidades detectables de PrP^C en los extractos de cerebros normales (Figura 5, carril 1) y de PrP en las muestras infectadas (Figura 5, carril 3). Como se esperaba, PrP^C fue sensible a la digestión con proteinasa K (PK) (Figura 5, carril 2), mientras que el desplazamiento característico de la migración del núcleo de PrP^{Sc} resistente a proteasas (denominado PrP 27-30) fue evidente después de la digestión con PK (Figura 5, carril 4). La incubación de estos homogenados de cerebro con lechos magnéticos acoplados a BSA no precipitó PrP de manera detectable (Figura 5, carriles 5-8) mientras que la incubación de las muestras con lechos acoplados con 6H4 (un anticuerpo monoclonal específico de PrP) inmunoprecipitó PrP^C de cerebros normales (Figura 5, carril 9) y PrP^{Sc} (Figura 5, carril 11) y PrP 27-30 (Figura 5, carril 12) de cerebros infectados. Cuando se acopló IgG pAbC2 a los lechos y se incubó con homogenados de cerebros normales no inmunoprecipitó PrP de manera detectable (Figura 6, carriles 9 y 10). Sorprendentemente, la incubación de los lechos acoplados con IgG pAbC2 con muestras infectadas inmunoprecipitó PrP^{Sc} (Figura 6, carril 11) y PrP 27-30 (Figura 6, carril 12). Una vez más, estos tejidos presentaban cantidades detectables de PrP^C y PrP^{Sc} (Figura 6, carriles 1-4) y los lechos acoplados con BSA no inmunoprecipitaron ninguna PrP (Figura 6, carriles 5-8).

Además, experimentos similares mostraron que IgG pAbC2 inmunoprecipita específicamente PrP^{Sc} bovina a partir de cerebros infectados con BSE comparado con 6H4 (Figura 7). Más aún, los anticuerpos pAbC2 pueden reconocer PrP^{Sc} bovina en un sistema ELISA utilizando PC2 soluble (receptor de prión) como reactivo de captura pero no generan ninguna señal en estudios de ELISA en los que se adsorbe directamente en las placas PrP^C bovina recombinante, a pesar de ser detectable cuando se utiliza el anticuerpo monoclonal 6H4 (Figura 16). IgG anti-YYR no reconoce PrP^C bovina recombinante desnaturalizada en transferencia western (datos no mostrados) de manera similar a los estudios detallados más adelante con anticuerpos monoclonales anti-YYR de ratón.

También se obtuvo un antisuero policlonal de cabra frente a YYR unido a KLH. El suero se recogió y se aisló IgG total mediante precipitación con sulfato de amonio. También se purificó IgG reactiva con YYR de los mismos sueros mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna con YYR conjugado. Estos antisueros se sometieron a un conjunto similar de reacciones de cribado y de inmunoprecipitación como se ha detallado más arriba. Una de las tres cabras inmunizadas desarrolló antisuero (p165) que fue específico para PrP^{Sc} (Figura 8) y se caracterizó adicionalmente. Como en los experimentos previos, los lechos acoplados con 6H4 precipitaron sin discriminar tanto PrP^C como PrP^{Sc} de cerebros de ratón infectados (Figura 8, carriles 10 y 11). En este experimento no se observó inmunoprecipitación de PrP 27-30 con 6H4 (Figura 8, carril 12) como se observa ocasionalmente por razones desconocidas. Cuando se acopló IgG total de cabras inmunizadas a los lechos, precipitó una pequeña cantidad de material o ninguna de homogenados de cerebros de ratón normales e infectados (Figura 8, carriles 4, 5 y 6). Por el contrario, cuando se acopló IgG purificada por afinidad con YYR (p165) a los lechos magnéticos, sólo precipitó PrP^{Sc} de cerebros de ratón infectados (Figura 8, carril 2). A diferencia del pAbC2 policlonal de conejos, el anti-YYR policlonal de cabras no precipitó PrP 27-30 (Figura 8, carril 3). Estos extractos contenían PrP 27-30 detectable después de la digestión con PK ya que en experimentos simultáneos para evaluar anticuerpos monoclonales (véase más adelante) se utilizaron los mismos homogenados y PrP 27-30 se detectó después de la digestión con PK (Figura 9, carriles 3, 6 y 9). Más aún, el análisis de los homogenados de cerebro mediante transferencia western reveló PrP^{Sc} y PrP 27-30 detectables en los homogenados de cerebros de ratones infectados (datos no mostrados).

Además de la generación de anticuerpos policlonales en cabras, también se generaron anticuerpos monoclonales frente al mismo epítipo específico de PrP^{Sc} pero con un derivado del antígeno original en el que se unieron entre sí múltiplos del péptido original YYR en una secuencia contigua. YYRRYYRYY (SEQ ID NO: 31) se sintetizó en un intento de incrementar el número de epítopos YYR en la secuencia del péptido, y para incrementar la posibilidad de apilamiento de tirosinas y/o la frecuencia de apilamiento pi. Más aún, una de las secuencias YYR en la proteína

prión está precedida de una arginina en las cinco especies de interés (Figura 2). El péptido YYRRYYRYY se unió a KLH y posteriormente se inmunizaron ratones con el antígeno. Se aislaron esplenocitos a partir de estos ratones y se fusionaron con la línea de células B murina FO (ATCC CRL-1646) para generar clones de hibridoma específicos. Se produjeron ascites a partir de clones que reaccionaron con YYR conjugado con un vehículo alternativo, 8map, en un ELISA. Se purificaron IgG a partir de estos ascites utilizando una columna de Proteína A y se cribaron y validaron utilizando métodos estándar. Se identificaron cinco anticuerpos monoclonales que reconocían específicamente PrP^{Sc} en reacciones de inmunoprecipitación utilizando homogenados de cerebros de ratones infectados (1A4, 6B1, 2B5, 2C y 18B). La Figura 9 ilustra la precipitación específica de PrP^{Sc} para tres de estos anticuerpos monoclonales, 1A4, 2C y 6B1. Como se observó para p165, 1A4, 2C y 6B1 precipitaron específicamente PrP^{Sc} (Figura 9, comparar los carriles 1, 3 y 5 con los carriles 2, 4 y 6, respectivamente) comparado con un anticuerpo utilizado como control negativo, 19E (Figura 9, carriles 10 y 11) y el anticuerpo que no distingue 6H4 (Figura 9, carriles 14 y 15). Al contrario que p165, estos tres anticuerpos específicos de PrP^{Sc} precipitaron PrP 27-30 (Figura 9, carriles 3, 6 y 9). Las bandas débiles presentes en las precipitaciones con 1A4, 2C y 6B1 utilizando los homogenados de cerebros de ratón normales (Figura 9, carriles 1, 3 y 5) y en las precipitaciones con 19E representan probablemente una combinación de la precipitación de PrP^C de fondo no específica y las cadenas ligera y pesada de IgG murina eluidas de los lechos magnéticos que se detectaron posteriormente mediante el conjugado Ig-HRP anti-ratón de cabra (Figura 10).

La evaluación continua de los anticuerpos monoclonales específicos de PrP^{Sc} reveló que eran capaces de reconocer diferentes cepas murinas de PrP^{Sc} mediante un epítipo dependiente de la conformación. Como se muestra en la Figura 11, se utilizó 1A4 en inmunoprecipitaciones de numerosos extractos preparados a partir de diferentes ratones infectados con la cepa ME7 ó 139A de scrapie murino. En estos experimentos, se vio que 1A4 precipita específicamente PrP^{Sc} y PrP 27-30 independientemente de la cepa. Esto también se vio para los demás anticuerpos monoclonales específicos de PrP^{Sc} (datos no mostrados). Cuando los homogenados de cerebro (normales, infectados con ME7 y 139A) se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se ensayaron para PrP con uno de los anticuerpos monoclonales específicos de PrP^{Sc} (1A4 ó 6B1) resultó evidente que sólo 6H4 fue capaz de detectar PrP^C y PrP^{Sc} desnaturalizados (Figura 12, carriles 7, 8 y 9). En el caso de 1A4 y 6B1, los determinantes específicos de PrP^{Sc} se habían perdido después de la desnaturalización de la muestra, lo que establece la sensibilidad conformacional del epítipo.

Además, se determinó que los anticuerpos monoclonales reactivos con YYR no reconocen ninguna proteína de la superficie celular en la superficie de esplenocitos o células de cerebro disociadas inmediatamente *ex vivo* de ratones normales y PrP^{-/-} knockout. Se aislaron esplenocitos y células cerebrales viables de ratón mediante centrifugación de suspensiones de esplenocitos y células cerebrales en un gradiente de ficol. Como se muestra en la Figura 13, los esplenocitos se tiñeron con los anticuerpos conjugados con FITC listados (líneas sólidas) o con anticuerpos control del mismo isotipo marcados con FITC (líneas punteadas). Las células no viables se excluyeron del análisis mediante yoduro de propidio. La ausencia de inmunorreactividad en la superficie de esplenocitos (Figura 13) o células de cerebro (no mostrado) indica que el epítipo conformacional YYR es raro, como sugirieron las búsquedas estructurales indicadas anteriormente. Más aún, la ausencia de una señal apreciable proporciona un fondo aceptable para estudios de la inmunorreactividad de PrP^{Sc} en la superficie celular de esplenocitos y de otras células de ensayo. La detección de PrP^{Sc} en la superficie celular es útil como un ensayo diagnóstico para la infección de enfermedades causadas por priones en seres humanos y animales. Finalmente, la ausencia de inmunorreactividad en la superficie celular proporciona una verificación independiente del hecho de que los anticuerpos anti-YYR no reconozcan PrP^C ya que los esplenocitos y las células del cerebro poseen PrP^C en la superficie detectable mediante inmunohistoquímica con 6H4 (no mostrado).

También se examinó la especificidad de especies del epítipo YYR. En estudios utilizando homogenados de cerebro de hámsters infectados con scrapie se vio que los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de PrP^{Sc} descritos anteriormente inmunoprecipitaban PrP^{Sc} de hámster (Figura 14). Además, también se observaron especificidades similares para PrP^{Sc} y PrP 27-30 que fueron evidentes en los estudios con tejidos murinos infectados. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1A4 inmunoprecipita específicamente PrP^{Sc} y PrP 27-30 (Figura 14, carriles 3 y 4) mientras que el anticuerpo policlonal de cabra p165 inmunoprecipita específicamente sólo PrP^{Sc} de cerebros de hámster infectados (Figura 14, carriles 7, 8, 9 y 10). Además de la de hámster, puede precipitarse específicamente PrP^{Sc} de tejidos infectados de oveja, bovinos y seres humanos, si se desea, utilizando cualquiera de las técnicas descritas en la presente memoria.

Materiales y Métodos

Estos anticuerpos específicos de PrP^{Sc} descritos anteriormente se obtuvieron y ensayaron utilizando los materiales y métodos siguientes.

Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular se realizó según los métodos descritos por Hornemann y Glockshuber (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6010, 1998). Los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano se registraron en un Espectrómetro de Dicroísmo Circular Aviv modelo 62DS (Lakewood, NJ) a 25°C utilizando celdas de cuarzo con una longitud de paso óptico de 0,1 cm. Los espectros se obtuvieron de 195 nm a 260 nm, con un paso de 1,0 nm, ancho de banda 1,0 nm y un tiempo de recogida de 4 segundos por paso. Los datos experimentales se expresaron como elipticidad media por resto ($\text{grad } \theta \text{ cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

Espectroscopía de Fluorescencia

Las espectroscopía de fluorescencia se realizó según los métodos descritos en Chin *et al.* (*Biochemistry* 31:1945-51, 1992).

Preparación de los péptidos YYR inmunizantes

Con el fin de desarrollar un anticuerpo frente a PrP^{Sc}, se sintetizó un péptido con la secuencia de aminoácidos Acetil-Cys-Tyr-Tyr-Arg-NH₂ (YYR) (SEQ ID NO: 32) conjugado con KLH y se inyectó intramuscularmente a conejos utilizando técnicas muy conocidas.

En el extremo amino terminal del péptido, se añadió un resto de cisteína para permitir la conjugación del péptido con la proteína transportadora. El grupo amino del péptido se bloqueó mediante acetilación y el grupo carboxílico del péptido se bloqueó mediante amidación.

Síntesis Peptídica

Los péptidos se sintetizaron utilizando métodos de síntesis de péptidos en fase sólida manuales o automatizados (sintetizador de péptidos MPS396, Advanced ChemTech). El acoplamiento de los restos de aminoácidos se consiguió utilizando química Fmoc de síntesis de péptidos (Fields, *et al.*, 1990, *IJPPR* 35, 161). Las síntesis se realizaron en resinas Wang o Rink amida con protección total de la cadena lateral de los aminoácidos. Debido a que los grupos alfa-NH₂ de los aminoácidos estaban protegidos con el grupo Fmoc, se eligieron los grupos protectores siguientes para los grupos laterales de los aminoácidos trifuncionales:

Cisteína: 5-trifenilmetilo (Trt)

Arginina: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf)

Tirosina: éter tercbutílico (tBu)

Se utilizaron BOP, PyBOP o TBTU como agentes activadores dependiendo de la química y de la dificultad de la reacción de acoplamiento. Todos los productos químicos se obtuvieron de Advanced ChemTech, Bachem y Calbiochem/NovaBiochem. La formación de cada enlace peptídico entre los restos de la secuencia se aseguró utilizando un exceso de 3 a 6 veces de los reactivos de acoplamiento y mediante el denominado acoplamiento doble; lo que significa que la reacción de acoplamiento se repitió para cada aminoácido añadido a la cadena peptídica en crecimiento.

Escisión de los fluo-péptidos de la resina

Después de la síntesis, los péptidos se liberaron de la resina utilizando el Reactivo K como una mezcla de escisión: agua (2,5%), TIS (2,5%), EDT (2,5%), TFA (92,5%). Los péptidos se precipitaron con éter dietílico frío. Los precipitados se centrifugaron, se lavaron tres veces con éter dietílico y se disolvieron en una mezcla de AcCN/agua al 20%-50% y se liofilizaron. El análisis de los productos crudos se realizó utilizando RP-HPLC analítica y MS con electropulverización.

Purificación por HPLC

El péptido crudo se purificó mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución con fase reversa) en una columna Vydac C18, 2,5 x 25 cm, utilizando un gradiente lineal de 10-50% de acetonitrilo en agua, con 0,06% de TFA (gradiente de 1%/min, caudal de 10 ml/min), con seguimiento con UV a 215 nm y 254 nm. El HPLC analítico se utilizó para estimar la pureza de las fracciones. El producto final se obtuvo como un péptido liofilizado con una pureza de al menos 95% estimada mediante HPLC analítico (Vydac C18, 0,46 x 25 cm, gradiente lineal de 10-60% de acetonitrilo en agua, 0,1% de TFA, 1%/min, caudal de 1 ml/min, detección por absorción UV a 215 nm y 254 nm). El péptido puro se identificó mediante análisis de masa molecular utilizando un espectrómetro de masa SCIEX API III según procedimientos estándar.

Datos Analíticos

El tiempo de retención del péptido en RP-HPLC fue 21,215 minutos. Se calculó que el peso molecular teórico del péptido era 644,74; se vio que el peso molecular real, mediante análisis de masa molecular, era 646,5 (MW+H⁺).

Acoplamiento del péptido a un vehículo

Los péptidos se acoplaron a un vehículo, en este caso hemocianina de lapa (KLH). Otros vehículos útiles para dicho acoplamiento incluyen, sin limitación, albúmina u ovoalbúmina, 8map o lisozima. El acoplamiento se realizó mediante una unión tioéter al grupo mercapto de la cisteína. Este tipo de unión tiene la ventaja de que el péptido se acopla de una manera definida a un vehículo proteico.

El acoplamiento a KLH se realizó como sigue. Se disolvieron 10 mg del péptido en 2 ml de disolución tamponada con fosfato (PBS 1x). Se añadió 1 ml de KLH (productos Pierce #77100) a la disolución del péptido y se agitó (1 mol de péptido/50 aminoácidos). La concentración de KLH fue 10 mg/ml. Se añadieron 20 μ l de gutaraldehído (disolución acuosa al 25%) a la disolución del péptido/vehículo con agitación constante, se incubó durante 1 hora después de la cual se añadió una disolución de parada de glicina. El conjugado péptido/vehículo se separó del péptido mediante diálisis frente a PBS.

Se sintetizaron péptidos YYR adicionales (por ejemplo, CYYRRYYRYY (SEQ ID NO: 33) y CKYEDRYYRE (SEQ ID NO: 34)) según métodos estándar, por ejemplo, los descritos en la presente memoria. Pueden prepararse otros péptidos sintéticos haciendo las modificaciones apropiadas a los métodos sintéticos descritos anteriormente. Dichos péptidos también se caracterizan utilizando cualquiera de los métodos estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, los descritos en la presente memoria).

Inmunización de conejos

Se prepararon anticuerpos policlonales según métodos estándar y se incrementó una respuesta inmune con inyecciones de refuerzo repetidas a intervalos de 3 a 8 semanas. El éxito de la inmunización se verificó determinando la concentración de anticuerpos en una transferencia western o ELISA o ambos. Más específicamente, para generar anticuerpos policlonales frente a PrP^{Sc}, se inyectó a conejos el tripéptido YYR conjugado con KLH según un régimen de inmunización de 164 días, después del cual se sangraron los animales que habían producido anticuerpos específicos.

Con el fin de muestrear el suero antes de la inmunización, se tomaron 10 ml de sangre por conejo como un control preinmune. Las inmunizaciones primarias se realizaron con adyuvante completo de Freund y los refuerzos posteriores con adyuvante incompleto de Freund (IFA) (1 ml por conejo, 0,5 ml por músculo del muslo). Cada inyección consistió en aproximadamente 200 μ g del péptido purificado. En los días 21, 42 y 70, se administró una inyección de refuerzo con IFA. En los días 31, 42 y 80, se recogieron 10 ml de sangre de la arteria central de la oreja para determinar la titulación (6 ml/kg/conejo). En el día 80, se comprobó la titulación de los sueros y se administraron 3 inyecciones más (IFA) a intervalos de 4 semanas seguido de toma de sangre 10 días después. 10 días después del último refuerzo, se exsangüinaron los conejos anestesiados mediante una punción cardíaca y se recogieron los antisueros.

Inmunización de cabras

Los anticuerpos policlonales de cabra se generaron según métodos estándar. Tres cabras se inmunizaron como sigue. En el día 1, todas las cabras recibieron una inmunización primaria de 1 mg de conjugados YYR-KLH en adyuvante completo de Freund. Los refuerzos se realizaron mediante inyección de 1 mg de YYR-KLH en adyuvante incompleto de Freund en dos de las tres cabras, mientras que la tercera cabra recibió 1 mg de conjugados YYR-8map en adyuvante incompleto de Freund. Las muestras de suero de cada uno de los tres sangrados se ensayaron para reactividad mediante ELISA frente a conjugados YYR-BSA. A partir del tercer conjunto de sangrados, se purificó IgG total mediante precipitación con sulfato de amonio y se purificó IgG reactiva para YYR utilizando una columna de afinidad con YYR. Las fracciones de IgG se ensayaron para reactividad frente a PrP^{Sc} como se ha descrito en la presente memoria. El esquema exacto de la inmunización fue como sigue: Día 1, inmunización primaria; Día 21, primera inmunización de refuerzo; Día 30, primer sangrado; Día 46, segunda inmunización de refuerzo; Día 53, segunda inmunización de refuerzo; Día 60, segundo sangrado; Día 76, tercera inmunización de refuerzo; Día 83, tercera inmunización de refuerzo; y Día 90, tercer sangrado.

Alternativamente, pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando los péptidos sintéticos descritos en la presente memoria y la tecnología estándar de hibridoma (véanse, por ejemplo, Kohler *et al.*, *Nature* 256:1975; Kohler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:511, 1976; Kohler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:292, 1976; Hammerling *et al.*, *In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981; Ausubel *et al.*, 1999, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York). Una vez producidos, los anticuerpos monoclonales también se ensayan para el reconocimiento específico de PrP mediante inmunoprecipitación y análisis por transferencia western (por ejemplo, utilizando los métodos descritos en Ausubel *et al.*, *supra*).

Inmunización de ratones

La generación de anticuerpos monoclonales se realizó como sigue. Se inmunizaron ratones con sobrenadante de baculovirus que contiene la proteína de fusión de ratón PrP-AP en adyuvante completo de Freund, y se reforzaron 2 semanas después con el mismo antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después de esta inmunización los ratones se reforzaron con una mezcla de sobrenadante PrP-AP más 100 μ g de conjugado KLH-CYYRRYYRYY y 100 μ g de conjugado KLH-CKYEDRYYRE. Los esplenocitos de estos ratones se fusionaron con la línea de células B murina FO (ATCC CRL-1646) para generar clones de hibridoma específicos. Los sobrenadantes de los hibridomas se cribaron mediante ELISA. No se observaron sobrenadantes reactivos frente a PrP-AP o frente a la secuencia CKYEDRYYRE, aunque sí había clones reactivos frente a los conjugados YYR-8map.

Purificación de anticuerpo

Se purificó IgG total de conejo a partir del suero utilizando la columna de proteína A HiTrap de Pharmacia según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se equilibró una columna HiTrap con 3 volúmenes de la columna de

ES 2 278 617 T3

tampón de partida (tampón de fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,0). Se aplicó el suero en la columna utilizando una jeringa a través de un adaptador luer. La columna se lavó posteriormente con 5 ml de tampón de partida. La proteína unida se eluyó con glicina 0,1 M, pH 3,0, y se recogió en tubos eppendorf que contienen Tris 1 M pH 8,0 (50 µl/500 µl de muestra). Las fracciones se analizaron en SDS-PAGE.

Los anticuerpos policlonales de cabra se purificaron a partir de muestras de suero como se ha descrito anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales de ratón se produjeron como ascites, y se purificaron utilizando un kit de columna de proteína A (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, una muestra de ascites se diluyó con tampón de unión en una proporción final 1:1. Después de añadir la muestra en la parte superior de la columna que se había equilibrado previamente con tampón de unión, y se dejó que fluyera a través de la matriz. El material que pasó a través de la columna se recogió y la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón de unión. Se añadió a la columna un tampón de elución suave para liberar el anticuerpo IgG unido de la matriz. Se recogieron otros isotipos de anticuerpo cambiando al tampón de elución de IgG. Todos los anticuerpos se recogieron en fracciones de 1 ml, que se analizaron mediante BCA para determinar el contenido total de proteínas y mediante electroforesis SDS-PAGE para establecer el grado de pureza del anticuerpo. La fracción que contenía la mayor cantidad de IgG se desaló pasándola a través de una columna D-sal (Pierce). La fracción del anticuerpo se asignó y se almacenó a -80°C en PBS.

Los anticuerpos producidos utilizando los procedimientos mencionados anteriormente se ensayaron posteriormente para detectar una unión de alta afinidad como sigue.

Preparación de homogenados de cerebro bovino

Se utilizaron dos métodos para la preparación de homogenados de cerebro bovino. En un método (A) las muestras de cerebro se homogeneizaron en tampón de homogeneización de tejido (sacarosa 10%, HEPES 20 mM pH 7,5, Sarcosyl 2% y EDTA 5 mM) utilizando un Polytron (OMNI GLH). Los homogenados se utilizaron a una concentración final de 1% (p/v).

En un segundo método (B) el homogenado de cerebro se preparó como una disolución al 10% (p/v). El cerebro bovino se rompió en un homogeneizador Dounce (con un émbolo de Teflón) en 2 volúmenes de tampón de lisis frío (NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Nonidet P-40 0,5%, desoxicolato de sodio 0,5% en tris-HCl pH 7,4). La muestra se incubó en hielo durante 20 minutos antes de aplicar 15 golpes adicionales en el homogeneizador. Se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El contenido proteico del sobrenadante se cuantificó posteriormente.

Preparación de homogenados de hámster y ratón

Se añadió tejido cerebral de hámster o ratón a una cantidad suficiente de tampón de homogeneización (0,5% PBS NP40, desoxicolato 0,5%) para conseguir un homogenado al 10% (peso/volumen). El tejido se homogeneizó haciéndolo pasar repetidamente a través de una aguja de 18 gauge y una aguja de 22 gauge. Se eliminaron los restos celulares mediante dos centrifugaciones secuenciales a 500 g durante 20 minutos. La proteína total en el sobrenadante se cuantificó con el kit BCA (Pierce) y la concentración se ajustó utilizando tampón de homogeneización hasta una concentración final de 5 mg/ml. Se prepararon alícuotas que contenían cada una 200 µl y se almacenaron a -80°C.

Conjugación con lechos magnéticos

Se conjugaron sesenta a 150 µg de anticuerpo purificado o BSA con aproximadamente 6×10^8 lechos magnéticos activados con tosilo (Dynal) utilizando un protocolo proporcionado por el fabricante. Brevemente, 1 ml de suspensión de lecho homogéneo no conjugado por anticuerpo se lavó dos veces y se resuspendió en PBS pH 7,4 que contenía los anticuerpos o BSA. La mezcla se incubó a 37°C durante 20-24 horas en un rotor. La mezcla se lavó entonces dos veces durante 5 minutos con rotación en PBS 0,1% BSA y se incubó en tampón de bloqueo (Tris 0,2 M pH 8,5, BSA 0,1%) durante 4 horas a 37°C con rotación. Después de otro lavado de 5 minutos con PBS 0,1% BSA, los conjugados anticuerpo-lechos se lavaron en PBS 0,1% BSA 1% Tween-20 durante 10 minutos, se lavaron de nuevo con PBS 0,1% BSA y se almacenaron a 4°C.

Digestión con proteinasa K

El homogenado de cerebro bovino se incubó con una disolución de proteinasa K (100 µg/ml) a 50°C durante 30 minutos. La digestión se paró con el inhibidor de la proteasa, PMSF (2 mM).

Los homogenados de cerebro de ratón y hámster se digirieron con una concentración final de 45 µg/ml de Proteína K durante 30 minutos a 37°C. La reacción se paró mediante la adición de una concentración final de 19 mM de PMSF.

Inmunoprecipitación

Diez μ l de extracto de cerebro se añadieron a 950 μ l de tampón de inmunoprecipitación (PBS 3% NP-40, 3% Tween-20) y se incubaron a 37°C durante 30 ó 60 minutos. Para los experimentos en los que se evalúa la reactividad de PrP²⁷⁻³⁰ con los conjugados de lechos, la incubación estuvo precedida de la adición de 50 μ l de 1 mg/ml de proteinasa K. Las muestras que no se trataron con proteinasa K se incubaron a 37°C durante el periodo de tiempo apropiado. Después de la incubación, se añadieron 60 μ l de una disolución de PMSF 10 mM a ambos conjuntos de tubos. Después, se añadieron a la mezcla cien μ l de conjugados de lechos resuspendidos y se incubaron con rotación a temperatura ambiente durante 2 horas. Los lechos se lavaron 3 veces con tampón de lavado (PBS 2% NP-40 2% Tween-20) y se resuspendieron con vórtex después de cada lavado. Después del último lavado, los lechos se resuspendieron en 20 μ l de tampón de carga 2X (Tris 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,015%, glicerol 20%) y se calentaron a 95°C durante 3 minutos.

Transferencia Western

El contenido en PrP^{Sc} de los homogenados de cerebro se determinó mediante transferencia western según métodos estándar. Las muestras de proteína se mezclaron con tampón de muestra 2x en una proporción 1:1 y se hirvieron durante 5 minutos a 100°C. El análisis por SDS-PAGE se realizó según métodos estándar. Las muestras se aplicaron en un gel de acrilamida al 15% preparado comercialmente (pre-cast, Biorad) junto a marcadores de peso molecular teñidos con anterioridad (Biorad). Los geles se corrieron a 100V hasta que el frente del azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel. La proteína separada se transfirió a membranas de PVDF a 100V durante 1 hora. La membrana se bloqueó durante 30 minutos en tampón de bloqueo después de lo cual se lavó tres veces con TBST. Las membranas se incubaron con un anticuerpo específico de PrP desnaturalizada durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron como se ha descrito anteriormente antes de incubarlo con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (1:5.000 en TBST) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las señales se revelaron con el sustrato quimioluminiscente CDP-star y se expusieron a películas de rayos X.

Citometría de flujo

Las suspensiones de esplenocitos se prepararon a partir de ratones Balb/c pasando los tejidos a través de una tela metálica. Las células se lavaron una vez con PBS de Dulbecco frío sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} y las células viables se aislaron poniendo una capa de Lympholyte (Cedarlane) por debajo de la suspensión celular y centrifugando a 1.300g durante 20 minutos. Las células se lavaron una vez con PBS de Dulbecco frío sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} suero fetal bovino al 2,5% y se alicuotaron $0,5 \times 10^6$ células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 50 μ l de conjugados anticuerpo-FITC a una concentración final 1/10 en PBS de Dulbecco frío sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} suero fetal bovino al 2,5% durante 15 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con PBS de Dulbecco frío sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} suero fetal bovino al 2,5% y se resuspendieron en el mismo medio con 1 μ g/ml de yoduro de propidio. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics y se seleccionaron por tamaño y granulación (dispersión frontal y lateral) y viabilidad (exclusión de la fluorescencia del yoduro de propidio).

Conjugación FITC-anticuerpo

Los mAb marcados con fluoresceína se prepararon utilizando el kit Fluorotag (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 0,5 mg de cada anticuerpo se llevaron a pH 9 con tampón de bicarbonato concentrado y se añadió disolución madre de FITC para producir una proporción FITC:anticuerpo de 20:1. Los viales se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se separó del FITC libre pasando la mezcla a través de una columna Sefadex G-25M. Los anticuerpos conjugados se ensayaron para comprobar el éxito de la fluoresceinación determinando sus emisiones de FITC a 535 nm utilizando un LJL Biosystems Analyst y los anticuerpos se ensayaron para determinar la retención de su actividad de unión con un ELISA frente a conjugados YYR-8map.

Determinación del contenido de PrP en los homogenados de cerebro

La presencia de PrP^C y de PrP^{Sc} en extractos preparados a partir de muestras de cerebro se confirmó por transferencia Western utilizando mAb6H4 (Figura 3). El patrón de bandas disperso de PrP^C (33-35 kDa) se observó tanto en los extractos preparados a partir de muestras de cerebro normal como en las infectadas con BSE. Después de tratar los extractos con proteinasa K, PrP^C se digirió completamente, mientras que PrP^{Sc} apareció como una banda de 27-30 kDa.

Todos los cerebros se caracterizaron para la presencia de PrP^{Sc} que representó el 15-20% del contenido total de PrP en los extractos agrupados (Figura 15).

Expresión de protocadherina-2 soluble (PC2s)

PC2, una proteína ligante de PrP, se utilizó como un reactivo de captura para PrP^C y PrP^{Sc} para demostrar la especificidad de pAbC2 por PrP^{Sc}. Un plásmido (HU-PC43 3' trunc/PC1nel) que contiene la secuencia de la protocadherina-2 humana que codifica los seis dominios de la cadherina, pero truncado en el comienzo del dominio transmembrana, se transfirió en células COS. El medio de cultivo que contenía la forma soluble de protocadherina-2 se recogió y se determinó la presencia de PC2s mediante transferencia western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PC2. El

documento WO 97/45746 titulado “Prion Protein Binding Proteins and Uses Thereof”, describe la utilización de PC2 como un receptor para la proteína prión y se incorpora en la presente memoria por referencia.

Ensayo de pAbC2 en un ELISA

Con el fin determinar si pAbC2 era útil en el reconocimiento específico de PrP^{Sc} de extractos de cerebro bovino comparado con PrP^C utilizando PrP recombinante (rbPrP) se utilizó un método ELISA. Para ensayar la especificidad de pAbC2 por PrP^{Sc} se utilizaron bien mezclas de extractos de cerebro que contenían PrP^{Sc} o rbPrP.

Los pocillos de una placa ELISA Immunolon (Dynex) se recubrieron toda la noche a 4°C con el sobrenadante del cultivo que contenía PC2 en un tampón TBS que contenía Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM. Para los experimentos con extractos de cerebro BSE, los pocillos control se recubrieron con un sobrenadante que contenía Mek-4; para los experimentos con rbPrP se utilizó leche como un control para determinar la unión no específica del anticuerpo al pocillo. El recubrimiento de las placas ELISA con PC2 soluble se confirmó con un anticuerpo monoclonal anti-PC2. Los pocillos se lavaron cuatro veces utilizando un lavador de microplacas SLT “Columbus” (Tecan) con TBS que contenía Tween 20 0,05% y se bloquearon rellenando los pocillos con I-Block 0,2% (Tropix) en TBST e incubando la placa a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron y el homogenado de cerebro bovino (diluido al 1% p/v en TBS) o rbPrP se añadió a los pocillos correspondientes y se incubaron a RT durante 1 hora. Los pocillos se lavaron cuatro veces con TBST. Se añadió pAbC2 a los pocillos apropiados y se incubó a RT durante 1 hora, seguido de una incubación adicional de 45 minutos con 100 µl de un conjugado de IgG anti-conejo o ratón/peroxidasa de rábano (1:5.000) en TBST que contenía 1% de leche desnatada. Los pocillos se lavaron cuatro veces con TBST. Las señales se revelaron con TMB/H₂O₂ como sustrato para la peroxidasa. Las reacciones se pararon después de 15 minutos mediante la adición de 100 µl de ácido fosfórico 2M. Las señales se determinaron a 450 nm con referencia a 620 nm utilizando un lector de microplacas SLT. Las señales positivas específicas se determinaron comparando la unión de PrP a PC2 con la unión de PrP al control negativo, Mek-4 o leche. Los controles preinmunes no mostraron unión.

En todos los casos de extractos de cerebro bovino infectados con BSE, los valores absolutos registrados para estos puntos fueron mayores que los registros de los extractos del cerebro normal, independientemente de la presencia de PC2s en las placas. Es concebible que la agregación en las muestras BSE resultara en una adherencia no específica a los pocillos de las placas ELISA por lo que se registraron señales mayores. Sin embargo, los valores de las muestras BSE no fueron mayores que los obtenidos en las mismas muestras ensayadas con el control Mek-4.

El pAbC2 reaccionó más fuertemente con material unido a PC2 que con material unido a Mek-4, habitualmente 1,5-2 veces mayor que la unión al control Mek-4, lo que sugiere una unión específica a PrP^{Sc} (Figura 16). El anticuerpo pAbC2 como un reactivo de detección secundario se unió sólo a las muestras positivas para PrP^{Sc} en la mayoría de los casos, lo que sugiere que esta combinación de reactivos puede permitir la detección de PrP^{Sc} en ausencia de un pretratamiento con proteasa.

Ensayo de detección de PrP utilizando inmunoprecipitación

Una vez establecido que pAbC2 reconocía PrP^{Sc} en los ensayos ELISA, se realizó posteriormente una inmunoprecipitación para verificar si pAbC2 podía inmunoprecipitar PrP a partir de extractos de cerebro bovino. En los experimentos se utilizaron mezclas de varios extractos de cerebro normales o infectados con BSE, a no ser que se indique otra cosa. Todas las muestras de cerebro se habían caracterizado previamente respecto a la presencia de PrP^{Sc}. Brevemente, se incubaron 20 µl de un homogenado de cerebro al 10% durante 2 horas a RT con varios anticuerpos que se sabe que se unen a PrP, tales como mAb6H4 así como pAbC2 en TBS que contenía GuHCl 0,5 M. Después de la incubación con 25 µl de lechos magnéticos acoplados con proteína A o proteína G (lechos Dyna) durante 1 hora a temperatura ambiente, se precipitaron los lechos de agarosa utilizando un imán. Los sedimentos se lavaron tres veces y se hirvieron en tampón de muestra con SDS para análisis en transferencias western. PrP se detectó con un anticuerpo policlonal o monoclonal anti PrP.

Utilizando pAbC2, no se detectó PrP en las reacciones que contenían extractos de cerebro normal, sin embargo, se detectaron bandas que migraban en una posición similar a PrP en las reacciones que contenían extractos de muestras infectadas con BSE (Figura 7). Estos resultados apoyan más los estudios de ELISA que muestran que pAbC2 es específico para PrP^{Sc} y no para PrP^C. Los lechos no acoplados se utilizaron como un control negativo, y no mostraron precipitación de PrP^{Sc}. Se utilizó mAb 6H4 como control positivo en las reacciones de inmunoprecipitación. Como se esperaba, PrP^C precipitó de manera eficaz a partir de cerebro normal utilizando mAb 6H4.

Utilización

Los péptidos PrP y los anticuerpos específicos de PrP^{Sc} descritos en la presente memoria pueden utilizarse, por ejemplo, para los fines de diagnóstico, terapéuticos, de vacunación y de descontaminación siguientes, así como para el cribado de compuestos nuevos que pueden utilizarse para diagnosticar o combatir enfermedades causadas por priones o para descontaminar muestras con priones.

Kits de ensayo para el diagnóstico de enfermedades causadas por priones

Los anticuerpos anti-PrP específicos de epítipo encuentran generalmente una utilización de diagnóstico en la detección o seguimiento de enfermedades causadas por priones. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PrP pueden utilizarse para evaluar la presencia o ausencia de PrP^{Sc} en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia de tejido, una célula o fluido) utilizando ensayos de detección estándar. Los ensayos inmunológicos pueden implicar la detección directa de PrP^{Sc} y son particularmente adecuados para el cribado de un gran número de muestras para detectar la presencia de PrP^{Sc}. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales o monoclonales producidos frente a un epítipo continuo YYX tal como YYR (como se ha descrito anteriormente) pueden utilizarse en cualquier formato de inmunoensayo estándar (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación, citometría de flujo o ensayo RIA) para determinar la formación de complejos. Además, si se desea, debido a la especificidad de los anticuerpos descritos en la presente memoria para PrP^{Sc}, puede omitirse el pretratamiento de una muestra de ensayo con proteasa antes del análisis inmunológico. En estos ensayos de detección puede utilizarse cualquier marcador apropiado que pueda visualizarse directa o indirectamente incluyendo, sin limitación, cualquier marcador radiactivo, fluorescente, cromogénico (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano) o quimioluminiscente o un hapteno (por ejemplo, digoxigenina o biotina) que puede visualizarse utilizando un anticuerpo específico del hapteno marcado u otra pareja de unión (por ejemplo, avidina). Los inmunoensayos ejemplares se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, *supra*, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988) y Moynagh y Schimmel, *Nature* 400:105, 1999. Por ejemplo, mediante la utilización de los anticuerpos descritos en la presente memoria, se puede detectar fácilmente PrP^{Sc} en la superficie celular (por ejemplo, un leucocito) utilizando métodos estándar de citometría de flujo tales como los descritos en la presente memoria. Se considera que las muestras en las que se han observado niveles incrementados de complejo marcado comparados con los de las muestras control apropiadas indican la presencia de PrP^{Sc} y son por lo tanto indicativas de una enfermedad relacionada con priones.

Además, utilizando los anticuerpos de la invención pueden identificarse compuestos nuevos útiles para diagnosticar enfermedades causadas por priones. Por ejemplo, se criban bibliotecas de química combinatoria o bibliotecas de moléculas pequeñas para identificar compuestos que tienen la capacidad de inhibir la interacción de unión de uno o más anticuerpos anti-YYX a un epítipo YYX según métodos estándar (por ejemplo, diálisis en equilibrio, análisis Biacore o inhibición competitiva). Dichas bibliotecas pueden obtenerse a partir de productos naturales, extractos sintéticos (o semi-sintéticos) o bibliotecas químicas según métodos conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica del descubrimiento y desarrollo de fármacos entenderán que la fuente precisa de los compuestos no es crítica para el o los procedimientos de cribado de la invención. Los ejemplos de fuentes de compuestos naturales incluyen, pero no están limitadas a, fuentes de plantas, fúngicas, procariotas o animales, así como modificación de compuestos existentes. También están disponibles numerosos métodos para generar la síntesis al azar o dirigida (por ejemplo, semi-síntesis o síntesis total) de cualquier número de compuestos químicos incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos basados en sacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos. Las bibliotecas de compuestos sintéticos pueden obtenerse comercialmente o pueden producirse según métodos conocidos en la técnica. Es más, si se desea, cualquier biblioteca o compuesto puede modificarse fácilmente utilizando métodos químicos, físicos o bioquímicos estándar.

Los compuestos que inhiben la unión de un anticuerpo anti-YYX a un epítipo YYX a la concentración más baja se refieren como “competidores de alta afinidad” y son útiles en los métodos de diagnóstico de la invención. Dichos competidores de alta afinidad que mimetizan la actividad del anticuerpo anti-YYX (por ejemplo, la región determinante de la complementariedad (“CDR”) de un anticuerpo anti-YYX) se ensayan para estudiar el reconocimiento y la unión eficaz de PrP^{Sc}. Una vez identificados, los competidores de alta afinidad pueden acoplarse a sustratos sólidos (por ejemplo, pocillos ELISA o lechos) para utilizarse en la fase de captura de prácticamente cualquier ensayo de diagnóstico para una infección de priones.

Conversión de anticuerpo monoclonal anti-PrP^{Sc} en IgM

Los métodos de diagnóstico también pueden realizarse utilizando anticuerpos IgM que tienen una avidéz incrementada por PrP^{Sc}. Con el fin de incrementar la avidéz del anticuerpo por PrP^{Sc}, puede construirse un gen de la región Fab de IgG de unión específica en un fragmento de IgM pentavalente como sigue.

Las moléculas de inmunoglobulina (Ig) están compuestas por diferentes dominios estructurales y funcionales. Cada inmunoglobulina tiene 2 cadenas pesadas (50-80 kD cada una) y 2 cadenas ligeras (25 kD cada una). Las cadenas pesadas son un producto de la reorganización de uno de cuatro tipos de genes de inmunoglobulina, V_H, D_H, J_H y C_H. Los tres primeros genes, conocidos en conjunto como la región variable, se combinan para crear el sitio de unión de la cadena pesada. El cuarto gen, C_H, también conocido como la región constante, no está implicado en la generación del sitio de unión pero contribuye al reconocimiento de la cadena pesada por otros componentes del sistema inmune. De manera similar, la cadena ligera procede de la reorganización de una copia de 3 tipos de genes de inmunoglobulina, V_L, J_L y C_L. Al igual que en el caso de la cadena pesada, el sitio de unión de la cadena ligera se genera por la combinación de los genes V_L y J_L, mientras que el gen C_L no está implicado. El sitio de unión de cualquier anticuerpo determinado se produce por lo tanto por la interacción de dos regiones variables: el polipéptido V_H-D_H-J_H y el polipéptido V_L-J_L. La mayoría de los anticuerpos tienen dos sitios de unión como estos.

Durante una respuesta inmune el primer tipo de inmunoglobulina producido se denomina IgM. Generalmente las IgM contienen sitios de unión con afinidades relativamente bajas, pero esta característica se compensa por la expresión de cinco sitios de unión por cada molécula de anticuerpo. Al progresar la respuesta inmune, se generan otros

anticuerpos tales como IgG que contienen afinidades mucho mayores que las IgM generadas previamente aunque sólo tienen dos sitios de unión por molécula.

Como se ha indicado anteriormente, el tripéptido YYR o restos relacionados aparecen tres veces en la secuencia de PrP. En PrP de bovinos, roedores y seres humanos el resto aparece dos veces como YYR y una vez como YYX. Es posible, por lo tanto, que cuantos más de estos restos individuales detecte un reactivo particular más sensible sea este reactivo. Los sitios de unión con mayor afinidad están contenidos en las moléculas de IgG. Sin embargo, como sólo tienen dos sitios de unión, estos anticuerpos pueden no ser los reactivos óptimos para la detección de PrP^{Sc}. Las moléculas de IgM contienen suficientes sitios de unión pero tienen una afinidad menor por lo que no son los reactivos óptimos para la detección de PrP^{Sc}. La construcción modular de una molécula de Ig proporciona, por lo tanto, una solución a este problema y una manera de construir una Ig óptima para la detección de PrP^{Sc}.

El antígeno YYR-KLH que se utilizó para generar el anticuerpo policlonal anti-PrP^{Sc} se utiliza para inmunizar ratones. Los ratones se inmunizan utilizando protocolos establecidos en la técnica que se sabe que resultan en anticuerpos IgG de alta afinidad. Se generan hibridomas de células B mediante procedimientos estándar y los sobrenadantes de cultivo tisular generados a partir de estas células que contienen sus anticuerpos monoclonales secretados se ensayan para detectar inmunorreactividad frente al resto YYR del antígeno mediante ELISA. Los genes reorganizados de la inmunoglobulina que producen el anticuerpo se clonan utilizando un protocolo de PCR anclada como se describe en Heinrichs *et al.* (*J. Immunol. Methods*, 178:241-51, 1995). Sólo se necesita clonar las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Éstas se insertan utilizando procedimientos estándar en vectores plasmídicos de expresión que contienen una región constante apropiada, en este caso, la versión secretada de una región constante de IgM, aunque podría ser cualquier otro isotipo de Ig. Esta región puede obtenerse a partir de un origen de ratón o humano, éste último para humanizar el anticuerpo de manera que resulte en efectos secundarios mínimos después de su administración a seres humanos (para revisiones véanse Winter y Harris, *Immunol Today*, 14(6):243-6, 1993; Vaughan *et al.*, *Nature Biotech*, 16(6):535-9, 1998). Los vectores, que ahora contienen regiones variables procedentes de moléculas de IgG acopladas a regiones constantes procedentes, por ejemplo, de moléculas de IgM, se utilizan para dirigir la generación de anticuerpos anti-PrP^{Sc} recombinantes en sistemas de expresión bacterianos o eucariotas. Para un ejemplo de dicha estrategia véase Poul *et al.*, *Immunotechnology*, 1:189-96, 1995.

Alternativamente, la combinación de la región variable que rinde la mejor reactividad frente al resto YYR del antígeno YYR-KLH se seleccionará a partir de una biblioteca de expresión en fago como se describe en la bibliografía (Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991; Vaughan *et al.*, *Nature Biotech*, 14:309-14, 1996) antes del aislamiento y subclonación en un anticuerpo de longitud completa descrito anteriormente.

35 *Conversión de anticuerpo monoclonal anti-PrP^{Sc} en IgE*

Un método alternativo para detectar PrP^{Sc} en una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre) implica la conversión de anticuerpo monoclonal anti-PrP^{Sc} en IgE. PrP^{Sc} forma agregados de diferentes tamaños que normalmente no se hacen con PrP^C. Estos multímeros de PrP^{Sc} pueden existir en la sangre de los individuos infectados. Esta característica puede utilizarse para detectar PrP^{Sc} con un bioensayo. Específicamente, los anticuerpos monoclonales que son específicos para PrP^{Sc} o que reaccionan de manera cruzada con PrP^C y PrP^{Sc} se convierten, mediante subclonación, en el isotipo IgE. Esto puede implicar los mismos métodos que se han descrito anteriormente utilizando una región constante de IgE en lugar de una región constante de IgM.

Los anticuerpos IgE se unen a receptores de la superficie celular específicos para la región constante de IgE. Estos receptores están ampliamente distribuidos en el cuerpo y juegan un papel crucial en las reacciones alérgicas. El receptor considerado aquí, el receptor de alta afinidad para IgE (Fc RI) se encuentra en mastocitos, basófilos, eosinófilos, monocitos y células de Langerhans. Es un receptor de la superficie celular compuesto por 3 cadenas polipeptídicas y presenta una afinidad exquisita por IgE ($K_a = 10^{-10}$ M). Cada Fc RI se une a una molécula de IgE (Kulczycki y Metzger, *J. Exp. Med.*, 140:1676, 1974; Barclay *et al.*, *The Leukocyte Antigen Factsbook*, San Diego: Academic Press, 1997). Sin embargo, para que se inicie una respuesta de señalización, numerosos receptores Fc RI se entrecruzan por un antígeno multivalente (Metzger, *J. Immunol*, 149:1477, 1992). La intensidad de la señal intracelular es proporcional al grado de entrecruzamiento. Una vez que esto se produce, la célula que expresa Fc RI se desgranula produciendo la liberación rápida de histaminas y de otros mediadores almacenados.

En el presente método de bioensayo, se incubaba una muestra de sangre con un anticuerpo monoclonal reactivo frente a PrP^{Sc} o que reacciona de manera cruzada con PrP^C y PrP^{Sc}. PrP monomérica y PrP polimérica (por ejemplo, agregados de PrP^{Sc}) se unen y la mezcla se incubaba con una línea celular que expresa Fc RI, tal como RBL-2H3, que se sabe que expresa $2-3 \times 10^5$ Fc RI por célula (Barsumian *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 11:317, 1981). Una línea celular como esa está disponible a partir de ATCC. Debido a que se requiere la agregación de Fc RI para que se produzca la desgranulación, PrP monomérica, unida o no por el anticuerpo, no producirá la desgranulación celular al contrario que PrP polimérica. Los mediadores liberados se detectan directamente en un ensayo inmunológico estándar, por ejemplo, mediante ELISA.

65 *Vacunas de PrP^{Sc}*

Los péptidos descritos en la presente memoria y las mezclas y combinaciones de éstos también son útiles como componentes activos de vacunas capaces de inducir una respuesta inmune profiláctica o terapéutica frente a enferme-

dades causadas por priones en anfitriones susceptibles a y/o que presentan la infección. Las vías de administración, las dosis del antígeno, número y frecuencia de las inyecciones variará de especie a especie y pueden ser semejantes a los utilizados actualmente en la clínica y/o experimentalmente para proporcionar inmunidad o terapia frente a otras enfermedades infecciosas o cáncer. Por ejemplo, las vacunas son composiciones aceptables desde un punto de vista farmacéutico que contienen el péptido de esta invención, sus análogos o mezclas o combinaciones de éstos, en una cantidad eficaz en el mamífero, incluyendo un ser humano, tratado con esa combinación para inducir una inmunidad suficiente como para proteger al mamífero tratado frente a una infección por priones durante un periodo de tiempo. También es posible que la inmunidad específica de PrP^{Sc} provocada por la inmunización con YYX (YYR o YYD o YYQ) o compuestos relacionados sea útil para favorecer la degradación de PrP^{Sc} o para mitigar las manifestaciones de la enfermedad sin afectar la expresión o función de PrP^C en el cerebro y otros tejidos, lo que resulta en una mejora del estado clínico en seres humanos con síntomas clínicos de una enfermedad causada por priones.

Pueden desarrollarse diferentes tipos de vacunas según procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vacuna puede ser vacunas basadas en péptidos, ácidos nucleicos, bacterias o virus. Más específicamente, respecto a las vacunas peptídicas, los péptidos correspondientes al epítipo específico PrP^{Sc} o los derivados funcionales de éstos pueden utilizarse como una vacuna profiláctica o terapéutica de diferentes maneras, incluyendo: 1) como monómeros o multímeros de la misma secuencia, 2) combinados de manera contigua o no contigua con secuencias adicionales que pueden facilitar la agregación, promover la presentación o procesamiento del epítipo (por ejemplo, secuencias diana de clase I/II) y/o epítipos adicionales para anticuerpos, células T colaboradoras o CTL para incrementar la inmunogenicidad del epítipo específico de PrP^{Sc} como medio para incrementar la eficacia de la vacuna, 3) modificados químicamente o conjugados con agentes que incrementarán la inmunogenicidad o administración de la vacuna (por ejemplo, cadenas de ácidos grasos o acilo, KLH, toxoide del tétanos, toxina del cólera, etc.), 4) cualquier combinación de los anteriores, 5) lo anterior en combinación con adyuvantes, incluyendo, pero sin limitarse a, sales de aluminio, saponinas o triterpenos, MPL y toxina del cólera y/o vehículos para la administración, incluyendo, pero sin limitarse a, liposomas, VPL o partículas semejantes a virus, microemulsiones, vectores bacterianos y virales atenuados o muertos, y microesferas degradables, 6) administrados por cualquier ruta o como un medio para cargar las células con antígeno *ex vivo*.

Los ejemplos de utilidades de vacunas basadas en ácidos nucleicos como un medio profiláctico o terapéutico incluyen: 1) cualquier ácido nucleico que codifica la expresión (transcripción y/o traducción) del epítipo específico de PrP^{Sc}, 2) secuencias adicionales de ácidos nucleicos que facilitan el procesamiento y presentación, agregación, secreción, selección de dianas (un tipo celular determinado) del epítipo específico de PrP^{Sc} bien fusiones de traducción o unidades transcripcionales independientes, 3) secuencias adicionales de ácidos nucleicos que funcionan como adyuvantes/inmunomoduladores, bien fusiones de traducción o unidades transcripcionales independientes, 4) epítipos adicionales para anticuerpos, células T colaboradoras o CTL que incrementan la inmunogenicidad del epítipo específico de PrP^{Sc} o la eficacia de las vacunas, bien fusiones de traducción o unidades transcripcionales independientes, 5) cualquier combinación de los anteriores, 6) los anteriores administrados en disolución salina (ADN "desnudo") o en combinación con un o unos adyuvantes (por ejemplo sales de aluminio, QS-21, MPL), agente(s) inmunomoduladores (por ejemplo, IL-2r, GM-CSFr, IL-12r), y/o agentes para la administración de ácidos nucleicos (por ejemplo, basados en polímeros, lípidos o péptidos, partículas degradables, microemulsiones, VPL, vectores bacterianos o virales atenuados) utilizando cualquier ruta o carga *ex vivo*.

Pueden utilizarse vectores bacterianos o virales atenuados o muertos para administrar el antígeno o el ADN/ARN que codifica la expresión del antígeno. Éstos también pueden utilizarse como un medio para cargar las células con el antígeno *ex vivo*.

Las vacunas se preparan según los métodos estándar conocidos en la técnica y serán fácilmente aplicables a cualquier método nuevo o mejorado para la producción de vacunas.

Descontaminación de Priones

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son útiles para la descontaminación de muestras biológicas que se sabe o sospecha que están contaminadas con un prión, por ejemplo, dirigidas a transplante. En particular, las muestras biológicas pueden incubarse con anticuerpo anti-PrP^{Sc} y los complejos pueden eliminarse utilizando métodos estándar. Alternativamente, pueden incubarse anticuerpos anti-PrP^{Sc} con muestras biológicas para formar complejos inhibiéndose de esta manera la infectividad del prión.

Terapéutica de las Enfermedades Causadas por Priones

Los métodos y composiciones de la invención también proporcionan un medio para tratar o prevenir las enfermedades causadas por priones en mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, ovejas, cerdos, ganado vacuno, cabras, perros, gatos y especies domésticas. Como se ha indicado anteriormente, es posible que cambios en la orientación de las cadenas laterales de las tirosinas en los dímeros de tirosina, o el agrupamiento de epítipos YYX (por ejemplo, YYR/D/Q) puedan contribuir al cambio de las propiedades fisicoquímicas de PrP después de la conversión a PrP^{Sc}, tales como hidrofobicidad y tendencia a la agregación. También es posible que estos restos sean críticos en la reacción de conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. Si esto puede mostrarse, los tratamientos de las enfermedades causadas por priones pueden basarse en antagonistas que interrumpan, supriman, atenúen o neutralicen los eventos biológicos

asociados con la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}. Los anticuerpos producidos de manera activa a partir de la inmunización con el péptido YYX (por ejemplo, YYR) o la transferencia pasiva de anticuerpos policlonales o monoclonales frente a YYX, son útiles para tratar estas enfermedades. Más aún, la invención incluye no sólo un anticuerpo monoclonal intacto sino también un fragmento de anticuerpo inmunológicamente activo. Los ejemplos de un fragmento de este tipo incluyen un fragmento Fab o (Fab)₂, una molécula F_v de cadena única obtenida mediante ingeniería, y un anticuerpo quimérico (tal como un anticuerpo “humanizado”). El término “anticuerpo humanizado” tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a moléculas de anticuerpo en las que las secuencias de aminoácidos en las regiones que no unen antígenos se han alterado de manera que el anticuerpo se parece más a un anticuerpo humano, pero conserva su capacidad de unión original. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) se construyen y caracterizan según métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Kute-meier *et al.* (*Biotechniques* 17:242-246, 1994); Major *et al.* (*Hum. Antibodies Hybridomas* 5:9-17, 1994); Jolliffe (*Int. Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993); Carter *et al.* (*Biotechnology* 10:163-167, 1992); Miyachi *et al.* (*J. Clin. Lab. Anal.* 6:343-50); y Leung *et al.* (*Mol. Immunol.* 32:1413-1427, 1995). Es menos probable que los anticuerpos humanizados sean inmunogénicos y son útiles en inmunoterapias pasivas. Además, un anticuerpo quimérico de la invención puede incluir, si se desea, una región variable de un anticuerpo no humano, por ejemplo, una región variable murina y una región constante de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones de la invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, un marcador radiactivo, un marcador isotópico no radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador enzimático y un marcador colorimétrico.

Más aún, moléculas pequeñas obtenidas a partir de la estructura del o de los epítopos YYR, incluyendo, pero sin limitarse a, derivados de la cadena lateral de la tirosina, pueden bloquear la reacción de conversión. Finalmente, la modificación química directa de restos críticos, tales como lisis enzimática de los anillos de tirosina, o la derivatización covalente de los anillos de tirosina con sustituciones voluminosas, también puede interrumpir la reacción de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} si los aminoácidos en el o los epítopos YYR son críticos para el proceso de conversión.

Por ejemplo, dichos compuestos pueden identificarse utilizando los anticuerpos de la invención. De acuerdo con esto, se criban bibliotecas combinatorias o bibliotecas de pequeñas moléculas o ambas (*infra*) para identificar compuestos que tienen la capacidad de inhibir la interacción de unión de uno o más anticuerpos anti-YYX a un epítipo YYX según métodos estándar (por ejemplo, diálisis de equilibrio, análisis Biacore o inhibición competitiva). Los compuestos que inhiben la unión de un anticuerpo como ese son útiles en los métodos terapéuticos de la invención. Una vez identificados, dichos compuestos se ensayan para estudiar su capacidad de combatir las enfermedades causadas por priones en cualquier sistema modelo apropiado.

La evaluación de si un antagonista ensayado confiere protección frente al desarrollo de una enfermedad causada por priones *in vivo* implica generalmente la utilización de un animal que se sabe que desarrolla dicha enfermedad (por ejemplo, Chandler, *Lancet* 6:1378-1379, 1961; Eklund *et al.*, *J. Infectious Disease* 117:15-22, 1967; Field, *Brit. J. Exp. Path.* 8:129-239, 1969). Un animal apropiado (por ejemplo, un ratón o hámster) se trata con el compuesto de ensayo según métodos estándar y se detecta como una indicación de la protección una incidencia reducida o la aparición o progresión retardada de una enfermedad relacionada con priones, en comparación con animales control no tratados. El compuesto de ensayo puede administrarse a un animal al que previamente se ha inyectado un agente prión o alternativamente el compuesto de ensayo puede ensayarse para estudiar su capacidad para neutralizar un agente prión preincubando el prión y el compuesto e inyectando la mezcla prión/compuesto al animal de ensayo. Una molécula (por ejemplo, un antagonista como se ha descrito anteriormente) que se utiliza para tratar o prevenir una enfermedad causada por priones se refiere como un “terapéutico anti-prión”.

Alternativamente, es posible que anticuerpos circulantes reactivos frente a PrP^{Sc} actúen acelerando la enfermedad mediante la estabilización de la conformación de PrP^{Sc}. Por lo tanto, el bloqueo de la acción de estos anticuerpos endógenos puede ralentizar la progresión de la enfermedad o tener otros efectos beneficiosos. Los anticuerpos monoclonales específicos de YYR pueden utilizarse como sustratos para inducir otro conjunto de anticuerpos monoclonales reactivos frente al sitio de unión de los anticuerpos específicos de YYR. Este segundo conjunto de anticuerpos se conoce como anti-idiotípico. Los anticuerpos anti-idiotípicos son útiles para neutralizar los anticuerpos circulantes reactivos frente a PrP^{Sc}.

Un terapéutico anti-prión según la invención puede administrarse con un diluyente, vehículo o excipiente aceptable desde un punto de vista farmacéutico en forma de dosificación única. Por ejemplo, puede utilizarse la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar dichos terapéuticos anti-prión a animales que presentan una enfermedad causada por priones o presintomáticos o con riesgo de desarrollar una enfermedad causada por priones. Puede utilizarse cualquier ruta de administración apropiada, por ejemplo, administración parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol u oral.

Los métodos muy conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en “Remington’s Pharmaceutical Sciences”. Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua o disolución salina estéril, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites vegetales o nftalenos hidrogenados. Para controlar la liberación de los compuestos pueden utilizarse polímero láctido, copolímero láctido/glicólido o copolímeros polioxietileno-polioxipropileno biocompatibles, biodegradables. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para los compuestos terapéuticos anti-prión incluyen partículas de copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formu-

ES 2 278 617 T3

laciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser disoluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietilen-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato o pueden ser disoluciones grasas para la administración en la forma de gotas nasales o como un gel.

- 5 Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para reducir o prevenir los trastornos descritos en la presente memoria en cualquier animal, por ejemplo, seres humanos, animales domésticos o ganado. Cuando se trata un animal no humano el terapéutico anti-prión utilizado es preferiblemente específico para esa especie.

Otras realizaciones están en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento de éste que se une con una afinidad de unión alta a un epítopo YYX de una PrP^{Sc} de mamíferos.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal generado frente a un epítopo YYR de PrP^{Sc}.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que el epítopo YYR es parte de CYR (SEQ ID NO: 32).
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal generado frente a un epítopo YYR de PrP^{Sc}.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es una IgG, IgM, IgE, IgD o IgA.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab o Fv.
7. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une con una afinidad de unión alta a un epítopo YYX de una PrP^{Sc} de mamíferos.
8. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la línea celular de hibridoma de la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo se une a un epítopo YYR de una PrP^{Sc} de mamíferos.
9. El anticuerpo de la reivindicación 4 o la línea celular de hibridoma de la reivindicación 7, en el que dicho epítopo YYR es parte de CYRRYYRYY (SEQ ID NO:33).
10. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8, 9 ó 20.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha composición comprende además un vehículo.
12. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha composición es una composición terapéutica.
13. Un kit de ensayo inmunológico que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8, 9 ó 20 y un medio para detectar dicho anticuerpo.
14. Un método para detectar PrP^{Sc} en una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) poner en contacto dicha muestra biológica con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8, 9 ó 20 en condiciones que permitan la formación de complejos entre dicho anticuerpo y PrP^{Sc}; y
 - (b) detectar dichos complejos como una indicación de que PrP^{Sc} está presente en dicha muestra biológica.
15. El método de la reivindicación 14, en el que dicha muestra biológica comprende un tejido o célula, un extracto tisular o celular, un fluido corporal o una biopsia.
16. El método de la reivindicación 14, en el que dicha PrP^{Sc} es de un ser humano, especie de ganado o especie doméstica.
17. El método de la reivindicación 14, en el que dicho complejo se detecta utilizando un ELISA, RIA, transferencia western, inmunoprecipitación o citometría de flujo.
18. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8, 9 ó 20 para utilizarse para tratar o prevenir una enfermedad causada por PrP^{Sc} en un mamífero.
19. Un método para generar un anticuerpo que se une con una afinidad de unión alta a una PrP^{Sc} de mamíferos, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) proporcionar un péptido de una proteína prión que comprende un epítopo accesible que tiene dos o más cadenas laterales de aminoácidos;
 - (b) inmunizar un mamífero no humano con dicho péptido de una proteína prión de la etapa (a); y
 - (c) purificar un anticuerpo que se une con una afinidad de unión alta a un epítopo YYX de una PrP^{Sc} de mamíferos a partir de un tejido de dicho mamífero o a partir de un hibridoma obtenido utilizando dicho tejido.
20. El anticuerpo de la reivindicación 1, hibridoma de la reivindicación 7 o los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 19, en el que dicho anticuerpo no se une sustancialmente a PrP^C.

ES 2 278 617 T3

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 19, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un fragmento de éste.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 19, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de éste.

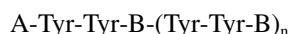
23. El método de la reivindicación 19, en el que dicho péptido de una proteína prión comprende una secuencia de aminoácidos YYX.

24. El método de la reivindicación 23, en el que dicho péptido de una proteína prión comprende una secuencia de aminoácidos YYR o YYQ o YYD.

25. El método de la reivindicación 24, en el que dicho péptido está compuesto por 18, 12, 8, 5 o menos aminoácidos.

26. El método de la reivindicación 24, en el que dicho péptido de una proteína prión consiste en una secuencia de aminoácidos YYR.

27. El método de la reivindicación 19, en el que dicho péptido de una proteína prión comprende un péptido sintético que tiene la fórmula:



en la que A es cualquier aminoácido o está ausente;

en la que B es cualquier aminoácido o está ausente; y

en la que n es de 0 a 10, inclusive; o un péptido sintético de la fórmula:



en la que A es cualquier aminoácido o está ausente;

en la que B es cualquier aminoácido o está ausente;

en la que C es cualquier aminoácido o está ausente;

en la que D es cualquier aminoácido o está ausente; y

en la que n es de 0 a 10, inclusive.

28. El método de la reivindicación 19, en el que dicho péptido de una proteína prión comprende una cualquiera de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 31-33 unido a un vehículo inmunológico.

29. El método de la reivindicación 28, en el que dicho péptido de una proteína prión consiste en una cualquiera de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 31-33 unido a un vehículo inmunológico.

30. Un método para descontaminar PrP^{Sc} de una muestra biológica, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) tratar la muestra biológica con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-9 y 20 durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la formación de un complejo anticuerpo anti-PrP^{Sc}:PrP^{Sc}; y

(b) recuperar dicho complejo anticuerpo anti-PrP^{Sc}:PrP^{Sc} a partir de dicha muestra biológica.

31. Un método para inhibir PrP^{Sc} en una muestra biológica aislada del cuerpo humano o animal, comprendiendo dicho método:

tratar la muestra biológica con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-9 y 20 durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la formación de un complejo anticuerpo anti-PrP^{Sc}:PrP^{Sc}.

32. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31, en el que dicha muestra biológica es un fluido corporal, un tejido u órgano.

33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31, en el que dicha muestra biológica se perfunde con dicho anticuerpo.

ES 2 278 617 T3

34. Utilización de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-9 y 20 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedades causadas por priones.

5 35. El método de la reivindicación 26, en el que dicho péptido de una proteína prión está unido a un vehículo inmunológico.

10

15

20

25

30

35

40

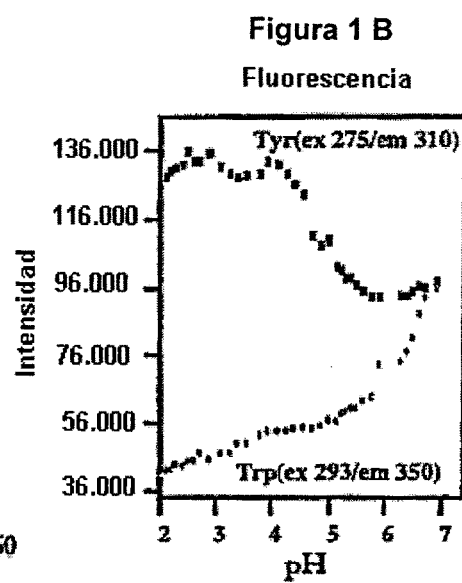
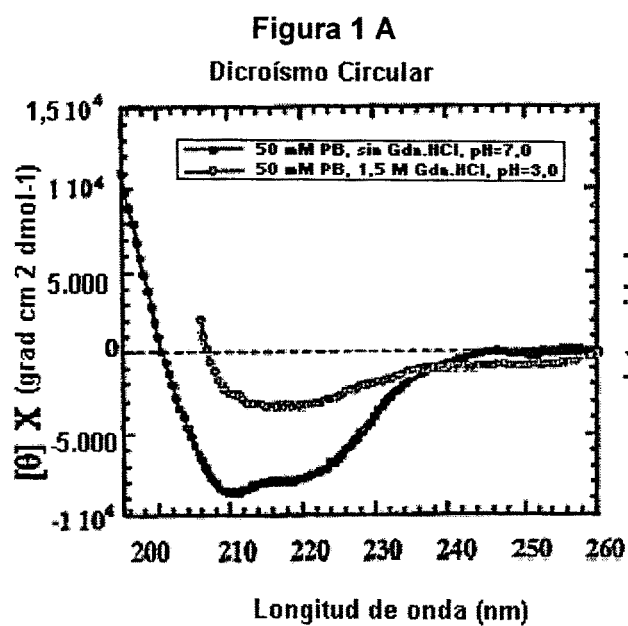
45

50

55

60

65



26

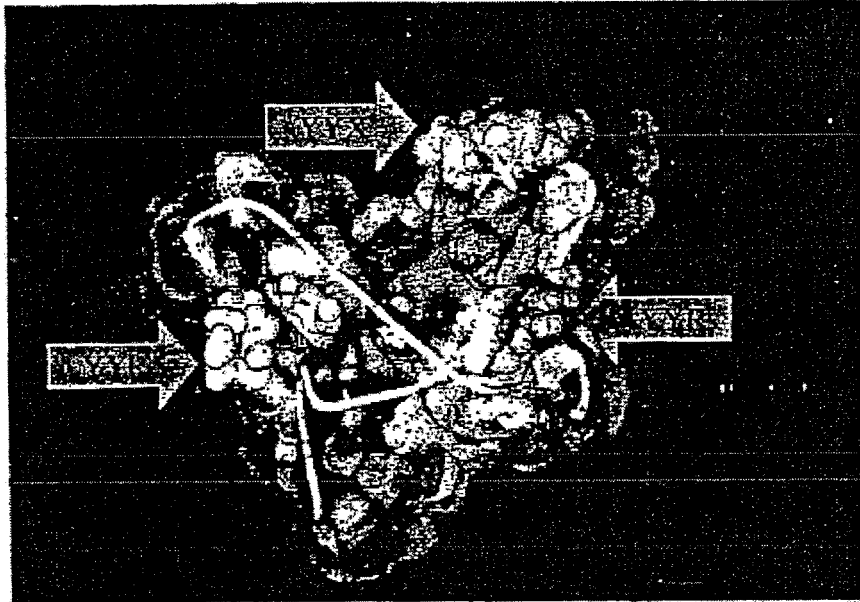


Figura 3

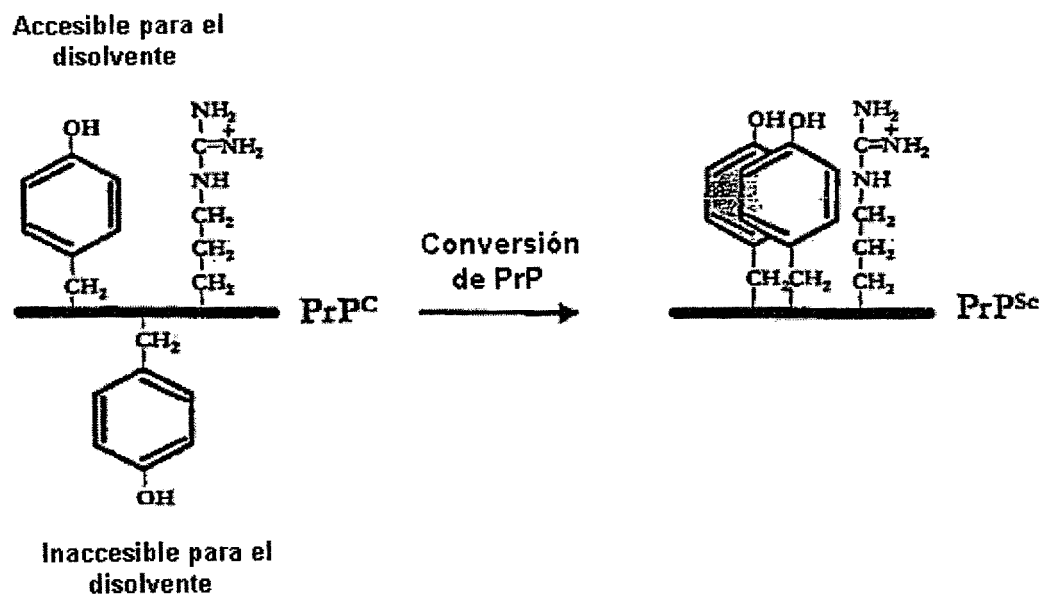


Figura 4

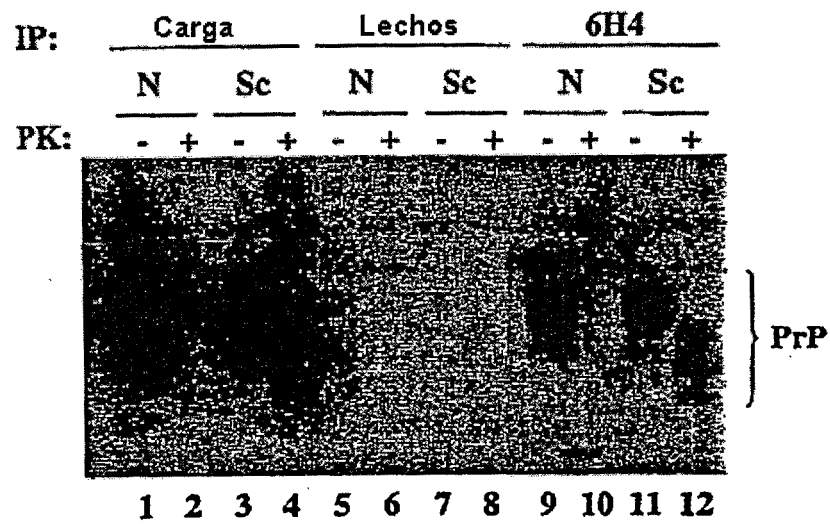


Figura 5

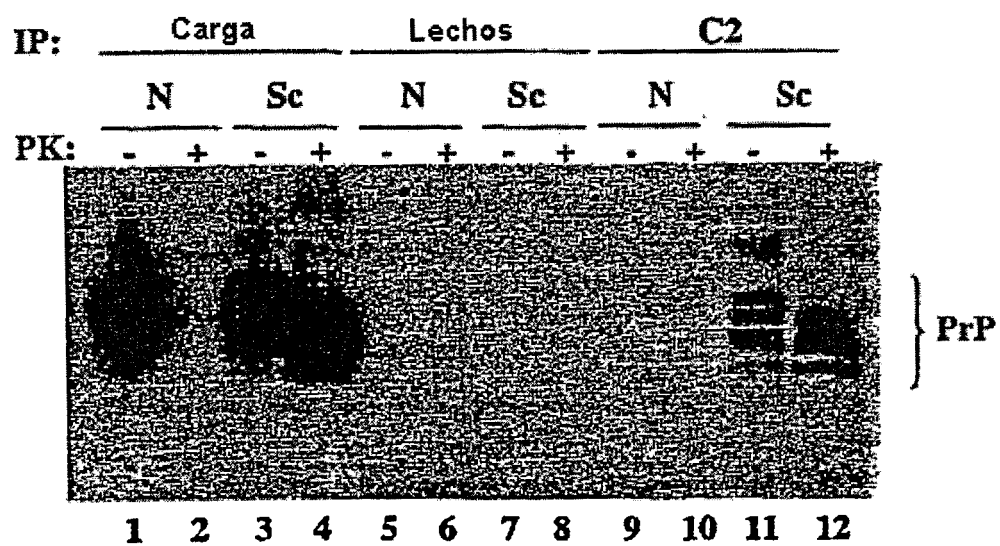


Figura 6

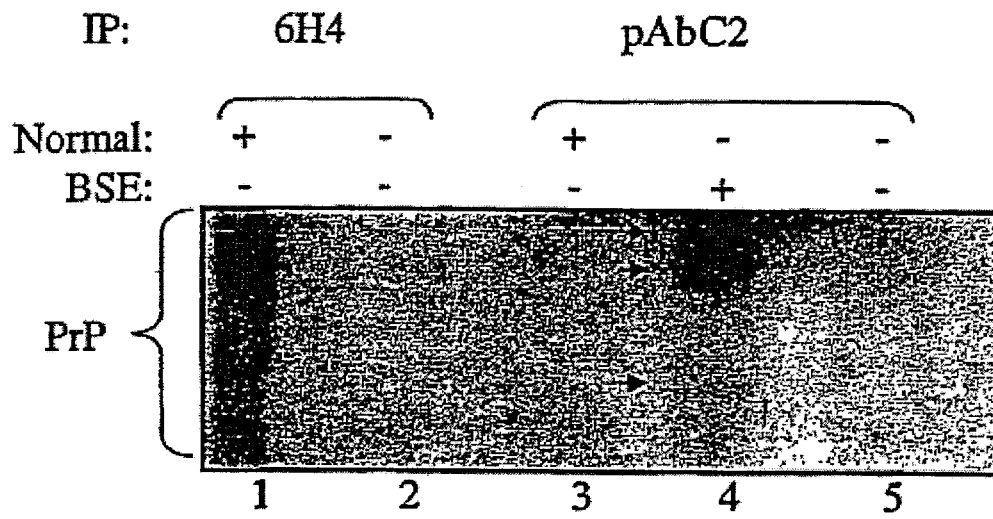
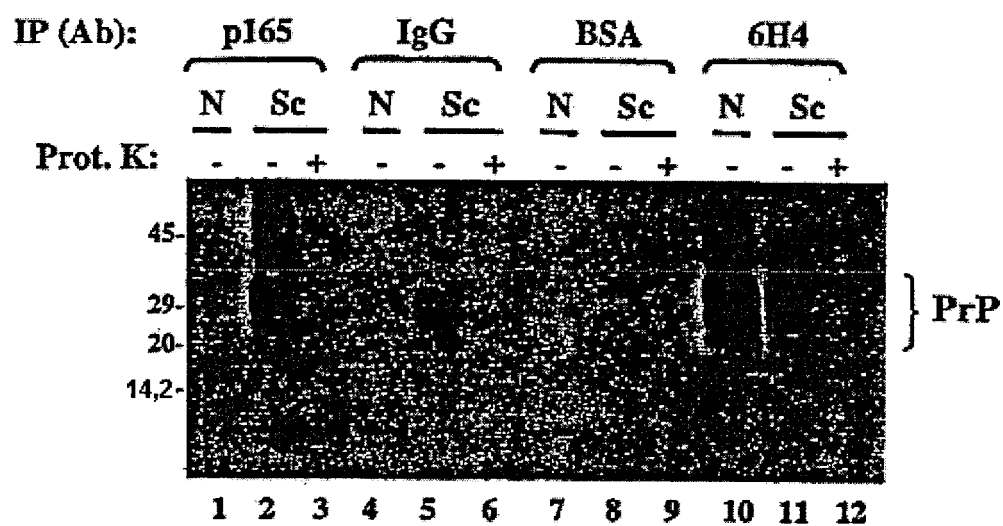


Figura 7

**Figura 8**

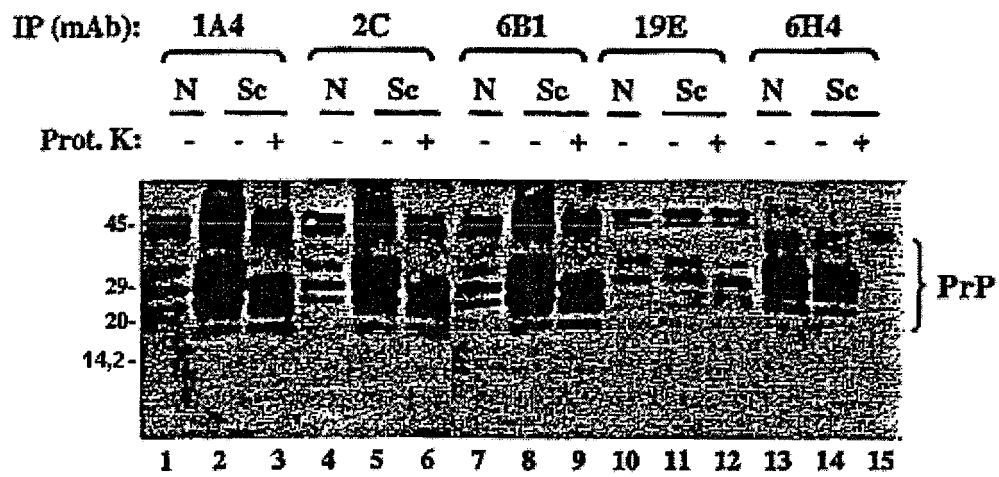


Figura 9

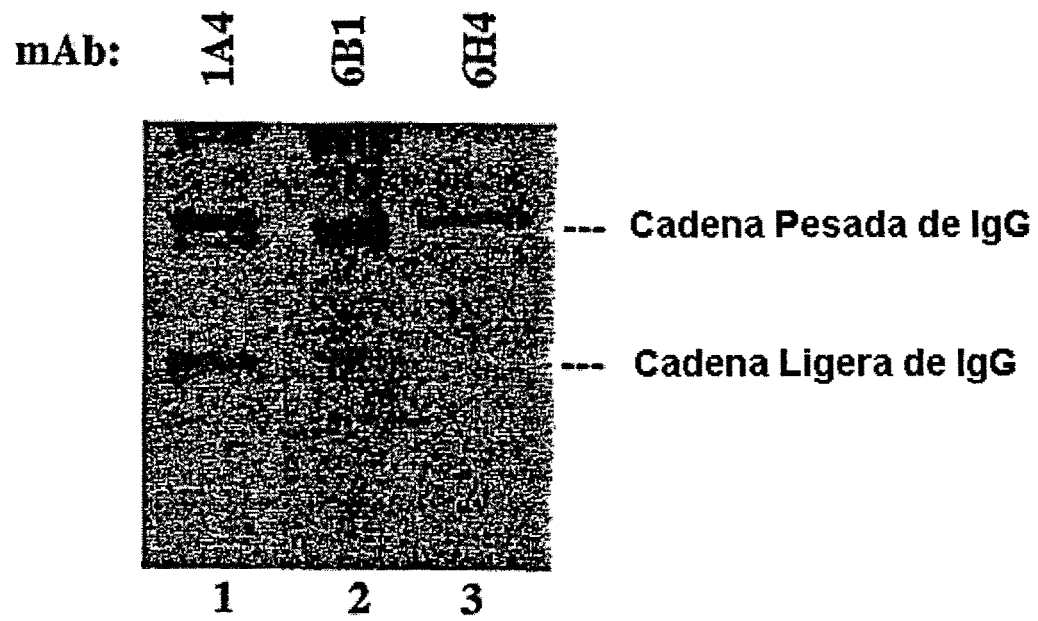


Figura 10

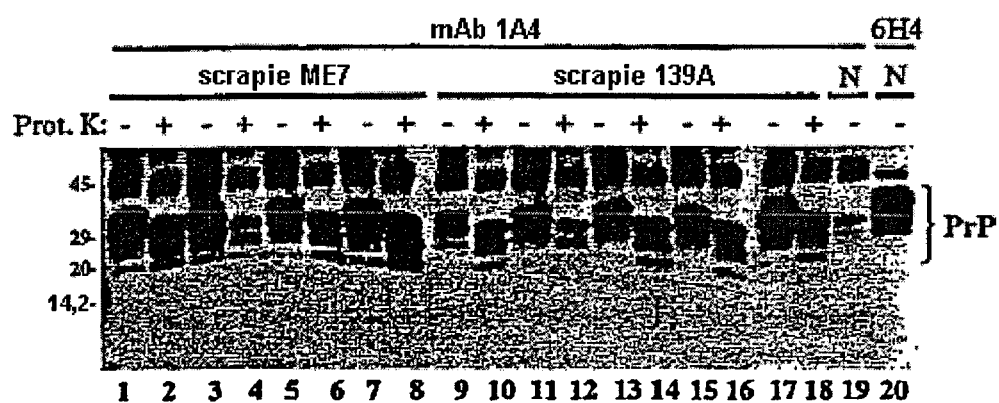


Figura 11

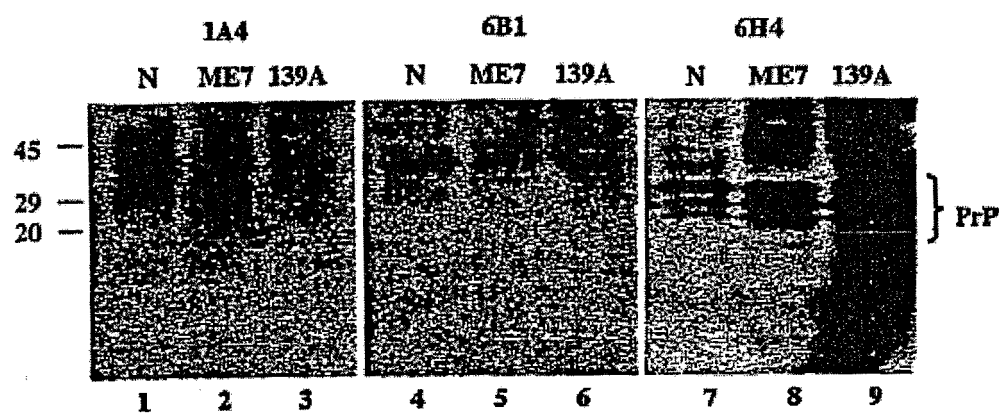
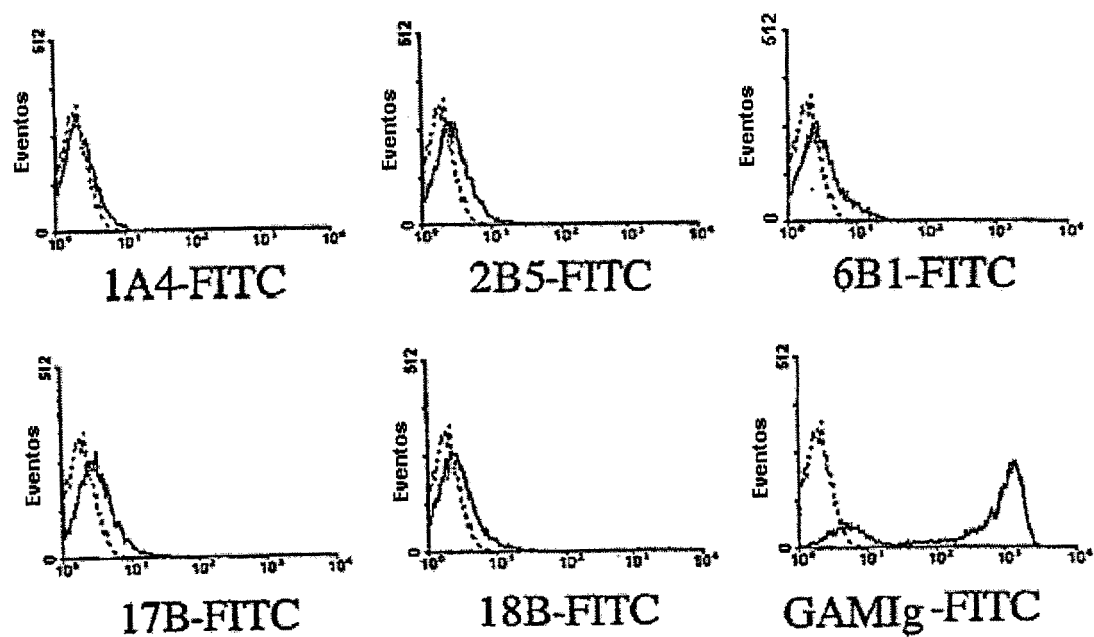


Figura 12

Figura 13



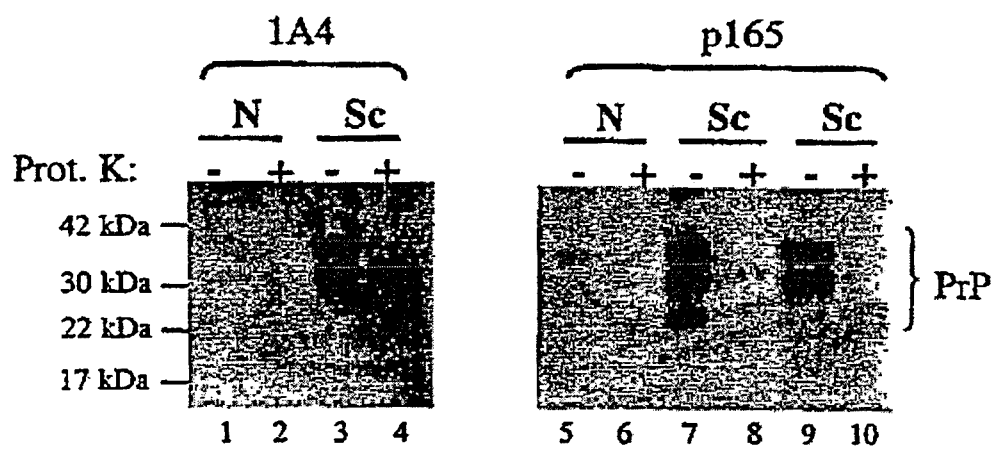


Figura 14

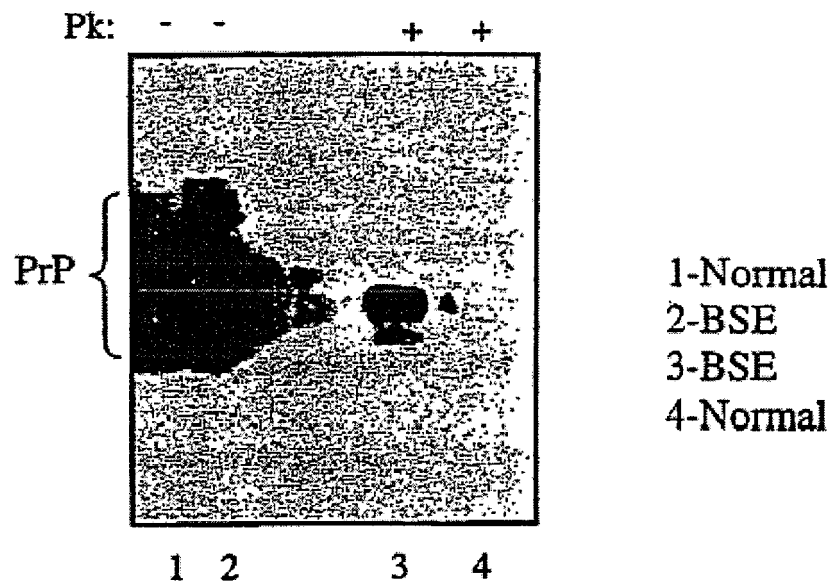
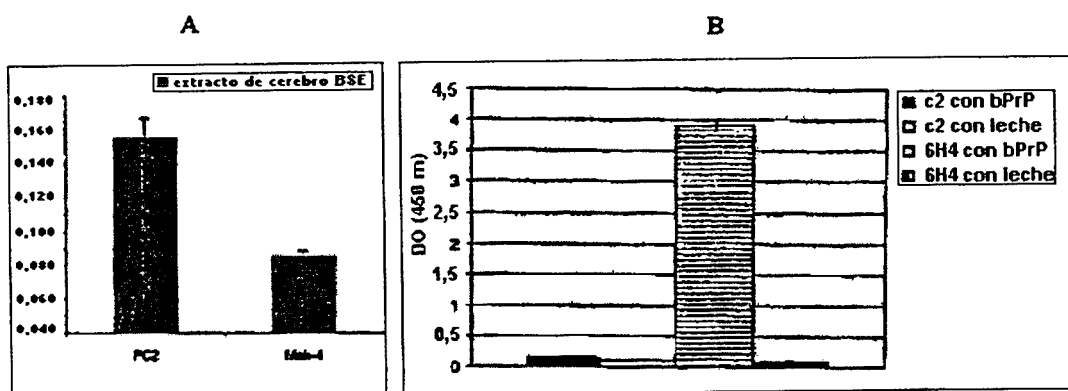


Figura 15

Figura 16



ES 2 278 617 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Caprion Pharmaceuticals, Inc.

5 <120> PÉPTIDOS DE PROTEÍNA PRIÓN Y UTILIZACIONES DE ÉSTOS
<130> 50111 /002W02
<150> 60/140,634
<151> 1999-06-23

10 <160> 34
<170> FastSEQ para la Versión de Windows 4.0
<210> 1
<211> 4

15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
<221> VARIANTE
<222> (1)...(4)
<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

25 <400> 1

Xaa Tyr Tyr Xaa
1

30 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
<221> VARIANTE
<222> (1)...(7)
<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

45 <400> 2

Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5

50 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
<221> VARIANTE
<222> (1)...(10)
<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

65

ES 2 278 617 T3

<400> 3
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10
 5
 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 15 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 20 <400> 4
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10
 25
 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 35 <222> (1)...(16)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 40 <400> 5
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 45 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 55 <222> (1)...(19)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 <400> 6
 60 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa
 65
 <210> 7

ES 2 278 617 T3

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 10 <222> (1)...(22)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

 <400> 7
 15 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20
 20
 <210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(25)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

 35 <400> 8
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 40 20 25

 <210> 9
 <211> 28
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(28)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 55
 <400> 9
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 60 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25

 <210> 10
 65 <211> 31
 <212> PRT

ES 2 278 617 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(31)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 10 <400> 10
 Xaa Tyr Tyr xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 15 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25 30
 <210> 11
 20 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(34)
 30 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 <400> 11
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa
 40
 <210> 12
 <211> 4
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 50 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(4)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 55 <400> 12
 Xaa Tyr Tyr Arg
 1
 60
 <210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 278 617 T3

<223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(4)
 5 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

 <400> 13

 10 Xaa Tyr Tyr Gln
 1

 <210> 14
 15 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(4)
 25 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

 <400> 14

 30 Xaa Tyr Tyr Asp
 1

 <210> 15
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(13)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 45
 <400> 15

 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa
 1 5 10
 50
 <210> 16
 <211> 16
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 60 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(16)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

 65

ES 2 278 617 T3

<400> 16

Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15

5

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <221> VARIANTE

<222> (1)...(19)

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

20 <400> 17

Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15

25 Tyr Tyr Xaa

<210> 18

30 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Péptido sintético

<221> VARIANTE

<222> (1)...(22)

40 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 18

Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
45 1 5 10 15

Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
20

50 <210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Péptido sintético

<221> VARIANTE

60 <222> (1)...(25)

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 19

65 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15

ES 2 278 617 T3

Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
20 25

5 <210> 20
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Péptido sintético
<221> VARIANTE
15 <222> (1)...(28)
<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 20

20 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15
Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
20 25

25 <210> 21
<211> 31
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
35 <221> VARIANTE
<222> (1)...(31)
<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

40 <400> 21

Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15
Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
45 20 25 30

<210> 22
<211> 34
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Péptido sintético
<221> VARIANTE
<222> (1)...(34)
<223> Xaa = Cualquier Aminoácido
60

65

ES 2 278 617 T3

<400> 22
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 5 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa
 10
 <210> 23
 <211> 37
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(37)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 25 <400> 23
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 30 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35
 35 <210> 24
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE
 45 <222> (1)...(40)
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido
 <400> 24
 50 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 55 Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35 40
 <210> 25
 60 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Péptido sintético
 <221> VARIANTE

ES 2 278 617 T3

<222> (1)...(10)

<223> Xaa = Cualquier Aminoácido

5 <400> 25

Xaa Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
1 5 10

10 <210> 26

<211> 264

<212> PRT

15 <213> *Bos taurus*

<400> 26

20 Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
1 5 10 15
Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
20 25 30
Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
35 40 45
25 Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60
Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
65 70 75 80
30 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys
100 105 110
Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
115 120 125
35 Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
130 135 140
Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
145 150 155 160
Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
165 170 175
40 Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
180 185 190
Ile Thr Val Lys Glu His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
195 200 205
45 Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
210 215 220
Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
225 230 235 240
Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser
245 250 255
50 Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
260

<210> 27

55 <211> 253

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 278 617 T3

<400> 27

```

Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp
 1          5          10          15
5 Ser Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
 20          25          30
Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
 35          40          45
Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
10 50          55          60
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
65 70          75          80
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His
 85          90          95
15 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
100          105          110
Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
115          120          125
Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp
20 130          135          140
Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln
145          150          155          160
Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val
165          170          175
25 His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr
180          185          190

Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg
195          200          205
Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala
210          215          220
30 Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Met Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val
225          230          235          240
Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
245          250

```

35 <210> 28

<211> 256

<212> PRT

40 <213> *Ovis aries*

45

50

55

60

65

ES 2 278 617 T3

<400> 28

```

5      Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
      1          5          10          15
      Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
      20          25          30
      Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
      35          40          45
      Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
      50          55          60
      Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
      65          70          75          80
      Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly
      85          90          95
      Gly Ser His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
      100          105          110
      Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
      115          120          125
      Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe
      130          135          140
      Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr
      145          150          155          160
      Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Arg Tyr Ser Asn Gln Asn
      165          170          175
      Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val
      180          185          190
      Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile
      195          200          205
      Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu
      210          215          220
      Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser
      225          230          235          240
      Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
      245          250          255

```

35

<210> 29

<211> 254

<212> PRT

40

<213> *Mus musculus*

<400> 29

```

45      Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
      1          5          10          15
      Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
      20          25          30
      Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
      35          40          45
      Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp

```

55

60

65

ES 2 278 617 T3

```

50          55          60
Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp
65          70          75          80
Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn
85          90          95
Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala
100          105          110
Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met
115          120          125
Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp
130          135          140
Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val
145          150          155          160
Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His
165          170          175
Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr
180          185          190
Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val
195          200          205
Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr
210          215          220
Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro
225          230          235          240
Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
245          250

<210> 30
<211> 254
<212> PRT
30 <213> Mesocricetus auratus

<400> 30

35 Met Ala Asn Leu Ser Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Ala Met Trp
1 5 10 15
Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
20 25 30
Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg
35 40 45
Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
50 55 60
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly
65 70 75 80
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His
85 90 95
Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
100 105 110
Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
115 120 125
Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Met Met His Phe Gly Asn Asp
130 135 140
Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Asn Arg Tyr Pro Asn Gln
145 150 155 160
Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Asn Phe Val
165 170 175
His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr
180 185 190
Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu Arg
195 200 205
Val Val Glu Gln Met Cys Thr Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala
210 215 220
Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ala Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro
225 230 235 240
Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Met Val Gly
245 250

65 <210> 31

```

ES 2 278 617 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 31
 10 Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
 1 5

 15 <210> 32
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 32
 25 Cys Tyr Tyr Arg
 1

 30 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 33
 40 Cys Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
 1 5 10

 45 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 34
 55 Cys Lys Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu
 1 5 10

 60

 65