

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2005.09.29	(73) Titular(es): ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, INC. 100 INDIGO CREEK DRIVE ROCHESTER, NEW YORK 14626 US
(30) Prioridade(s): 2004.09.30 US 614533	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.08.05	(72) Inventor(es): JIAN ZHENG US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.03.21 102/2012	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PÉPTIDOS PARA A DISCRIMINAÇÃO DE PRIÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO A PÉPTIDOS PARA A DETECÇÃO DE DOENÇAS DOS PRIÕES EM SERES HUMANOS E EM ANIMAIS. A INVENÇÃO DIZ AINDA RESPEITO A COMPOSIÇÕES E ESTOJOS PARA DETERMINAR A DOENÇA DOS PRIÕES.

RESUMO**"PÉPTIDOS PARA A DISCRIMINAÇÃO DE PRIÕES"**

A presente invenção diz respeito a péptidos para a detecção de doenças dos priões em seres humanos e em animais. A invenção diz ainda respeito a composições e estojos para determinar a doença dos priões.

DESCRIÇÃO

"PÉPTIDOS PARA A DISCRIMINAÇÃO DE PRIÕES"

I. Antecedentes

As doenças dos priões ou encefalopatia espongiforme transmissível (TSE) despertaram o interesse da comunidade científica devido a terem desafiado os pensamentos convencionais a propósito da natureza dos agentes infecciosos e também devido à ameaça da saúde pública, potencialmente grave que constituem para segurança dos alimentos e do sangue. Além do mais, a possibilidade de transmissão da doença entre animais e seres humanos tem sido sublinhada recentemente pela ocorrência de epidemias de uma nova forma de variante da doença, vCJD. A presente invenção diz respeito à utilização de péptidos sintéticos para o diagnóstico de doenças encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) em animais e em seres humanos.

Priões - um agente patogénico que provoca as TSE

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE) compreendem um grupo de doenças neurodegenerativas fatais de rápida progressão que afectam tanto os seres humanos como os animais. As TSE apresentam características clínicas e neuropatológicas que compreendem demência devastante, sinais piramidais e extrapiramidais com mioclonos, alterações espongiformes multifocais, astrogliose, placas amilóides, perdas neuronais, ausência de reacção inflamatória e são normalmente caracterizadas por um longo período de incubação.

Foi já sugerido uma vez que as doenças TSE poderiam ser provocadas por “vírus lentos” ou por viróides (Gajdusek 1977). No entanto, a resistência extrema da infecciosidade dos tremores epizooticos a radiação, nucleases e outros reagentes que provocam danos nos materiais genéticos são inconsistentes com a teoria de “vírus”. Todas estas características “não usuais” dos agentes infecciosos TSE fizeram com que o Dr. Stanley Prusiner propusesse o conceito de “priões” em 1982 (Prusiner 1982). O prião (PrP), o qual designa uma partícula infecciosa proteínica isenta de ácido nucleico, é uma glicoproteína que está presente em seres humanos e em animais. A forma celular desta proteína (PrP^C) possui dois locais de glicosilação N-ligados e um local de ancoragem GPI no terminal C. Tem sido habitualmente encontrado em neurónios e, num nível bastante mais reduzido, também foi já encontrado em outras células, tais como leucócitos, monócitos e plaquetas (Holada 2000). A forma de doença de tremor epizootico transmissível da proteína do prião (PrP^{Sc}) é uma isoforma resistente a proteases do seu precursor celular e é predominantemente encontrada no cérebro. Num grau bastante mais reduzido, também foi encontrada nas amígdalas, no baço e nos nódulos linfáticos em pacientes com vCJD (Parizek 2001). Como resultado do conceito de Prusiner de “prião” como o agente infeccioso responsável pela doença dos tremores epizooticos, e, por extensão, de todas as doenças TSE, tal deu origem à noção de que são as agora habitualmente referidas doenças do prião, as quais dizem respeito a uma classe de patologias que se crê estarem associadas a esta proteína.

A doença de priões humana é conhecida como doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) e afecta normalmente as pessoas mais idosas. Dependendo do fenótipo da doença, a doença de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD) é responsável pela maior parte da CJD, ao passo que cerca de 10% diz respeito a CJD familiar (fCJD). Apenas recentemente, surgiu uma nova variante de CJD (vCJD) que ocorre apenas em adolescentes. Desde 1995, foram já registados mais de 100 casos. As doenças de priões afectam muitas espécies de animais domésticos e selvagens, cujas manifestações apresentam nomes característicos, por exemplo, tremor epizootico em ovelhas e cabras (McGowan 1922), doença debilitante crónica (CWD, Williams 1980) em cervos e encefalopatia espongiforme bovina (BSE ou doença das "vacas loucas", Wells 1987) em gado.

Características de PrP^C e PrP^{Sc}

De acordo com a hipótese de "apenas proteína" de Prusiner, o patogénio transmissível que provoca as doenças de priões é uma proteína. O componente principal do prião parece ser PrP dobrado anormalmente, designado como PrP^{Sc} (específico de doença, isoforma de "tremor epizootico"). Crê-se que o PrP^{Sc} seja gerado a partir da sua contraparte normal, PrP^C, por meio de uma alteração na conformação (Cohen, 1998). Embora exista ainda ambiguidade no que diz respeito ao mecanismo da conversão, é normalmente aceite que na presença de PrP^{Sc}, PrP^C normal, actuando como substrato, sofra uma alteração da estrutura conformacional, que se transforme em PrP^{Sc} por meio de um processo autocatalítico e provoque a agregação de PrP^{Sc} e a formação de hastes amiloides, causando assim a morte

celular (Hope 1986, Horwich 1997). A alteração estrutural de PrP^{C} para PrP^{Sc} é principalmente suportada por uma alteração conformacional crucial, a qual implica um aumento substancial na quantidade de estrutura de folha beta da proteína, possivelmente com uma pequena diminuição na quantidade de hélice alfa, indicada por dicroísmo circular e espectroscopia de infravermelhos (Pan 1993, Caughey 1991). Crê-se que a eficácia da conversão de PrP^{C} em PrP^{Sc} depende do grau de homologia de sequência entre os dois confórmeros PrP . Devido a este mecanismo único, as doenças de priões podem ser facilmente transmitidas entre as mesmas espécies e no caso de a homologia de sequência de PrP ser suficiente, de espécie para espécie (Raymond, 2000). Assim sendo, caso esteja correcto, o mecanismo proposto de transmissão de doenças de priões proporciona o potencial para desencadear epidemias por transmissão destes distúrbios cerebrais entre animais e seres humanos.

A resistência à protease constitui uma outra característica que distingue PrP^{Sc} de PrP^{C} . Em células de cultura e no cérebro ou em amostras de diversos pacientes com GSS, PrP^{Sc} é mais pequeno do que o seu precursor celular PrP^{C} . Embora o prião celular e o prião do tremor epizootico sejam duas isoformas do mesmo produto genómico *PRNP*, o PrP^{C} é completamente degradado por tratamento com proteinase K ao passo que o PrP^{Sc} apenas sofre uma digestão limitada. A digestão proporciona uma forma de proteína designada por PrP 27-30, na qual o terminal N foi removido. O PrP 27-30 foi postulado como sendo o núcleo de PrP^{Sc} necessário para a replicação de PrP^{Sc} hospedada por PrP^{C} . A molécula de prião tratada com protease, PrP 27-30 ou PrP^{res} , está firmemente ligada à infectividade dos tremores

epizooticos (Gabizon 1988), e constitui uma prova suplementar de o PrP^{Sc} ser uma proteína infecciosa.

Um atributo suplementar, possivelmente ligado ao aumento significativo na estrutura de folha beta e da consequente resistência à protease, é a diferença observada em termos de solubilidade entre PrP^{Sc} e PrP^C. Ao passo que o PrP^C é uma proteína solúvel, a isoforma PrP^{Sc} é extremamente insolúvel. Além do mais, o PrP^C está ligado à superfície dos neurónios por meio de uma cauda GPI ancorada à membrana (Shyng 1994) ao passo que o PrP^{res} é encontrado no citoplasma de células afectadas (Taraboulos 1990), com uma maior probabilidade de estar associado com os compartimentos endossómico anterior e lisossómico (Arnold 1995) e o PrP^{Sc} também está localizado nos agregados amorfos nas fracções enriquecidas provenientes de cérebros infectados (Meyer 1986).

Existem evidências crescentes que sugerem uma relação estreita entre a infectividade dos tremores epizooticos e PrP 27-30. Mesmo para as amostras mais puras, a proporção estimada entre moléculas de PrP e unidades infecciosas é de $\sim 10^4$ a 10^5 (Horwich 1997, Bolton 2001). Para níveis tão reduzidos de infectividade, é possível que outros componentes, co-factores ou modificações covalentes sejam necessárias para a infectividade. Os estudos transgénicos sobre a susceptibilidade de murganhos expressarem PrP^C quimérico humano-murganho sugerem a presença pelo menos de um factor hospedeiro diferente de PrP^C, designado por factor X, o qual pode actuar como acompanhante molecular na formação de PrP^{Sc} (Telling 1995).

Infectividade e transmissibilidade das doenças de priões

As doenças de priões são transmissíveis. A transmissibilidade de doenças de priões de animais foi já determinada experimentalmente por meio da inoculação de homogenados de cérebro provenientes de animais infectados em animais saudáveis, tais como de tremores epizooticos de ovelhas para ovelhas (Cuillé 1936) e entre espécies para cabras (Pattison 1957), kuru e CJD de seres humanos para chimpanzés (Gajdusek 1966, Gibbs 1968). A conclusão significativa foi a transmissão com sucesso de tremores epizooticos para murganhos (Chandler 1961) que facilitou bastante a pesquisa de TSE devido ao facto de proporcionar um modelo experimental. A causa de BSE recente em gado e a nova variante de CJD em seres humanos (vCJD) foi considerada uma consequência da exposição alimentar à mistura de tremores epizooticos de carcaças de ovelha utilizadas para rações para animais no caso de BSE (Brown 1997) e de carne proveniente de gado afectado com BSE no caso de vCJD (Bruce 1997). A ligação entre vCJD e BSE é ainda suportada pelas provas neuropatológicas provenientes de macacos adaptados à BSE, que constituem o modelo mais próximo para os seres humanos, e a partir do estudo de murganhos consanguíneos inoculados com o agente que causa a BSE e vCJD (Lasmézas 1996). Constitui uma preocupação particular relativamente a uma epidemia crescente de CWD em veados e em alces na América do Norte o facto de CWD, tal como a BSE, poder ser transmitida para os seres humanos que possam ser expostos à doença através da caça ou do manuseamento e alimentação de carne infectada. A transmissão trágica e não pretendida da doença de priões em seres humanos foi já documentada, tal como a epidemia de

kuru provocada pela ingestão canibalística de tecido do cérebro proveniente de mortos, e da transmissão iatrogénica de CJD através da utilização de hormonas, transplantes de tecidos e instrumentos clínicos infectados.

Não existem provas fortes que indiquem que qualquer uma das doenças CJD está associada à TSE em animais que possa ter atravessados a barreira entre espécies. A epidemia de kuru proporcionou a principal evidência de doença de priões humana adquirida. Embora não tenha sido documentado nenhum paciente de vCJD como vítima de transmissão ser humano-ser humano, a ligação estreita entre a BSE e a vCJD atraiu uma atenção considerável. As preocupações relativamente a uma infecção humana têm por base o facto de PrP^{Sc} ser facilmente detectável em tecidos linfo-recticulares de BSE vCJD mas não em CJD clássica (Hill 1997), e também o pressuposto de que o patogénio de tremores epizooticos resultante da passagem das ovelhas para o gado poder ter alterado a amplitude de hospedeiros, tornando-se mais adaptável aos seres humanos. Os precedentes experimentais para um tal comportamento são bem conhecidos: a passagem de estirpes adaptadas a murganhos de tremores epizooticos para hamsters alterou a sua transmissibilidade numa nova passagem para murganhos (Kimberlin 1987, Kimberlin 1989); as estirpes humanas de kuru ou de CJD não se transmitiram para furões ou para cabras até passar por primatas ou gatos (Gibbs 1979); e uma estirpe bovina de BSE não se transmitiu para hamsters até passar por murganhos (Foster 1994). Em alternativa, no caso de a BSE ter tido origem numa mutação espontânea em gado, então os estudos experimentais de espécies susceptíveis a esta nova estirpe de encefalopatia espongiforme

transmissível (TSE) não avançaram o suficiente para prever que os seres humanos não seriam susceptíveis.

Os estudos sobre a doença CJD e vCJD em seres humanos indicam que a susceptibilidade genética pode constituir ainda um outro factor que pode influenciar a propagação de TSE em seres humanos. Concluiu-se que a maioria dos pacientes de CJD esporádica era homozigótico para Met/Met ou para vaginal no codão 129 (Belay 1999). No entanto, concluiu-se que todos os casos de vCJD reportados eram homozigóticos para Met/Met.

A amplitude e a duração de uma epidemia de vCJD permanece ainda incerta. Dependendo dos pressupostos feitos e dos cálculos de modelamentos utilizados, são propostas diferentes previsões. Uma estimativa de vCJD total prevê um máximo de 205 casos (Valleron 2001). Por outro lado, uma outra previsão para a mortalidade de vCJD para os próximos 80 anos compreende entre 50 e 50000, caso a infecção seja apenas proveniente de BSE. Poderá atingir 150000, caso seja provado que a BSE infecta as ovelhas e caso seja subsequentemente introduzida na cadeia alimentar dos seres humanos (Ferguson 2002). Embora seja impossível efectuar previsões rigorosas no caso de os parâmetros necessários estarem errados ou não estarem disponíveis, uma coisa é certa que no caso de a infectividade de vCJD esteja presente no sangue, então qualquer previsão irá ser subestimada. Além do mais, concluiu-se que a vCJD constitui uma nova entidade de doença e não constitui apenas o resultado de uma maior vigilância de CJD nos seres humanos (Hillier 2002).

Foram já tomadas medidas pelo governo para eliminar o aumento da incidência de BSE. As rações de proteínas para

ruminantes foram banidas nos EU e no RU (1988). Também foram tomados conjuntos de medidas para evitar que carne potencialmente infectada seja introduzida na cadeia alimentar dos seres humanos. Para reduzir ainda mais o risco para os seres humanos, o FDA e o CBER emitiram uma nova política em Agosto de 2001, que defere indefinidamente qualquer dador que tenha permanecido durante um período acumulado ≥ 6 meses durante 1980-1996 no Reino Unido (FDA 2001).

Ensaio de diagnóstico para a doença de priões

O desenvolvimento de ensaios sensíveis e confiáveis para a detecção de priões é absolutamente essencial para a vigilância da doença e, quando combinado com fármacos futuros, para a prevenção e erradicação da doença. Até ao momento presente, existem essencialmente três formatos de ensaios para o diagnóstico das doenças de priões. **(1) Bioensaios de infectividade animal** constituem de longe o método mais sensível para a medição de priões infecciosos em tremores epizooticos experimentais em roedores, sendo normalmente efectuados por injeção intracerebral de homogenados cerebrais de animais doentes em animais recipientes. No entanto, a medição quantitativa da infectividade da doença de priões em espécies diferentes de animais é limitada devido à existência de “barreira entre espécies” e “estirpes” de priões distintas que são diferentes em termos de patologia, período de incubação e características moleculares de PrP^{Sc}. Assim sendo, este diagnóstico pós-morte dispendioso e consumidor de tempo é principalmente utilizado como ferramenta de pesquisa para a distinção entre estirpes diferentes de priões em roedores e

serve como referência para a calibração de material cerebral infeccioso. **(2) Imunoensaios PrP correntes** são baseados na detecção de PrP^{Sc} resistente à protease, que é a única marca de referência conhecida para todas as doenças de priões. Durante vários anos, a detecção de PrP^{Sc} por métodos imunoquímicos (imuno-histoquímica e Western blotting) proporcionou o diagnóstico mais correcto para as doenças de priões em animais e em seres humanos (Schaller 1999, Biffiger 2002). São bastante utilizados para o diagnóstico pós-morte. Foram desenvolvidos diversos anticorpos monoclonais e policlonais contra diversas regiões de PrP para este propósito, tais como os amplamente utilizados 3F4, 6H4, descritos nos documentos US4806627 e EP0861900. No entanto, apenas alguns foram reivindicados como sendo capazes de efectuar a discriminação entre PrP^C (muitas vezes presente em quantidades superiores) e PrP^{Sc}. Os anticorpos monoclonais descritos por Korth em 1997 e por Paramithiotis em 2003 eram ambos IgM, não tendo sido desenvolvido qualquer ensaio de diagnóstico para estes anticorpos. Assim sendo, praticamente todos os métodos imunoquímicos correntes requerem um passo para reduzir ou eliminar um PrP^{Sc}, normalmente por proteólise não específica, tal como digestão por proteinase K (PK), antes da detecção de PrP^{Sc}. Tal pré-tratamento cliva os primeiros 60 a 70 resíduos de PrP^{Sc} para proporcionar um núcleo PrP 27 kDa-30 kDa resistente a PK, designado por PrP^{res}. Os anticorpos anti-PrP que reconhecem a região do terminal C restante da proteína podem ser utilizados para detectar o PrP^{Sc} truncado no terminal N, ou PrP^{res}, que está presente apenas nas amostras patológicas. Para os ensaios de com manchas imuno-histoquímicas, as secções de tecido também

são pré-tratadas, normalmente por hidrólise ácida para reduzir o nível de fundo associado a PrP^{C} . Assim sendo, o PrP^{res} é um substituto para o precursor PrP^{Sc} nestes imunoensaios. Entre os vários formatos de imunoensaios, o ensaio por Western blotting possui a vantagem de revelar padrões moleculares pormenorizados de PrP com base na migração de bandas de PrP di-, mono- e não-glicosiladas. Este método também tem vindo a ser bastante utilizado para distinguir subtipos de PrP^{res} cerebrais em doenças de priões de seres humanos e de animais. Para além de Western blot, os outros formatos de ensaio foram agora desenvolvidos para um processamento mais elevado de amostras, um sensibilidade aumentada e uma melhor quantificação, incluindo o ensaio ELISA tradicional, o imunoensaio de fluorescência de dissociação de aumentada de lantanida (DELFI, Barnard 2000 e um método descrito no documento US20020137114A1) e imunoensaio dependente da conformação (CDI) combinado com ELISA e detecção de fluorescência (Safar 1998, documentos US 20010001061A1, US20020001817A1). No entanto, independentemente do formato, o PrP^{Sc} pode ser diferenciado de PrP^{C} apenas após a necessária digestão com PK, a qual pode ser difícil de otimizar para amostras biológicas desiguais. (3) Outros métodos foram também já descritos para o tratamento de amostras, incluindo imuno-histoquímica de tecido linfóide da pálpebra para o diagnóstico pré-clínico de tremores epizooticos ovinos (O'Rourke 2000, US6165784, US6261790), tratamento químico com fosfotungstato de sódio para enriquecer PrP^{Sc} de cérebro e de outros homogenizados de tecidos periféricos (Wadsworth 2001) e detecção de uma nova isoforma da proteína de prião na urina de animais e de seres humanos infectados (Shaked

2001b, WO 0233420A2). Também foram já documentados outros sistemas de detecção, incluindo electroforese capilar e espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier. Estes métodos encontram-se ainda nas suas etapas iniciais de desenvolvimento e são tecnicamente complexos. Para além da identificação tradicional do prião patogénico por meio da eliminação do prião celular e subsequente reconhecimento com anticorpos anti-prião não discriminatórios, concluiu-se que há outros reagentes que são capazes de diferenciar PrP^{Sc} de PrP^{C} , tais como plasminogénio e fibrinogénio. As provas fornecidas sugerem a existência de uma propriedade comum a PrP^{Sc} de espécies diferentes, em vez de uma sequência primária de prião ou da estrutura terciária específica de moléculas de PrP^{Sc} individuais, que poderá ser responsável pela ligação ao plasminogénio (Fischer 2000, Maissen 2001). A aplicação para a utilização de plasminogénio e de outras proteínas do soro/plasma para a captura e para a detecção da proteína do prião patogénica foi já descrita no documento WO 020071 e no documento US 20010053533A1 (Aguzzi 2001).

Todos os ensaios de diagnóstico de prião produzidos, até ao momento presente, utilizam tecido cerebral como fonte de amostras. A comissão europeia em 1999 avaliou 4 estojos de teste de BSE de diferentes fabricantes (Moynagh 1999). Todos eles requeriam um procedimento de preparação da amostra diferente. Em função das instruções do estojo, o homogenado de tecido cerebral deveria ser submetido a processamento, incluindo desnaturação, digestão com PK ou enriquecimento de PrP^{Sc} . Os sistemas de detecção utilizados nos formatos DELFA, immunoblot ou ELISA de placas utilizam

um substrato quimioluminescente ou um substrato calorimétrico.

Desafios do diagnóstico pré-morte da doença de priões

Um problema comum aos ensaios pré-morte com base em PrP^{Sc} é o facto de o PrP^{Sc} se encontrar presente nos tecidos periféricos ou nos fluidos corporais. Devido a dificuldades técnicas, encontram-se disponíveis poucos dados experimentais sobre a presença de PrP^{Sc} ou da sua infectividade associada em fluidos corporais, permanecendo este assunto controverso. No modelo de hamster de tremores epizooticos, é possível detectar um nível reduzido de infectividade no sangue. Embora a infectividade em revestimentos tamponados enriquecidos com linfócitos provenientes de sangue de hamster doente seja superior à do plasma, esta apenas diz respeito a uma porção relativamente pequena em comparação com inóculos do sangue total. A definição molecular deste agente infeccioso presente no sangue ainda não é clara. A procura de factores de risco e de outras fontes possíveis de infecção em pacientes com CJD esporádica não revelou uma correlação significativa da doença com a dieta, com transfusões de sangue ou com a aceitação de outro produto sanguíneo. Embora os estudos iniciais tenham indicado uma presença possível de infectividade em sangue proveniente de pacientes com CJD após inoculação intracerebral em murganhos (Manuelidis 1985, Tateishi 1985), a quantidade superior de infectividade ou de PrP^{Sc} é invariavelmente encontrada no sistema nervoso central (SNC), não sendo consistentemente encontrada em tecidos periféricos em doenças de priões humanas clássicas, com a excepção do caso de vCJD. A

presença de PrP^{Sc} facilmente detectável em tecidos linfó-reticulares periféricos, tais como as amígdalas, o baço e os nódulos linfáticos de pacientes com vCJD provocou uma preocupação séria sobre o facto de quantidades abundantes de PrP^{Sc} presentes nos tecidos linfó-reticulares poderem interagir com o sistema circulatório e, por tal motivo, quantidades vestigiais de PrP^{Sc} poderem estar presentes no sangue de pacientes com vCJD para uma possível transmissão sanguínea. Também foi demonstrada outra infectividade de TSE no sangue em diversas experiências animais. A maior parte do sangue para os estudos de infectividade foi obtida a partir de roedores adaptados a RSE, tais como murganhos e hamsters. A BSE adaptada a murgancho e a vCJD adaptada a murgancho foi estabelecida por meio de transmissão intracerebral ou intravenosa. O único modelo de excepção foi um estudo realizado em ovelhas. Nesta experiência, uma ovelha, a qual tinha sido submetida a transfusão com sangue total recolhido a partir de outra ovelha com lisado cerebral de BSE, desenvolveu sintomas de BSE (Houston 2000, Hunter 2002). No entanto, estes resultados experimentais necessitam ainda de ser totalmente avaliados. É antecipado que a descoberta de um tal agente infeccioso no sangue ira permitir uma melhor compreensão da relação entre PrP^{Sc} e a doença TSE.

É importante salientar que o tratamento rigoroso da amostra para eliminar o nível de fundo de PrP^C pode não ser adequado para outras amostras de tecido periférico ou fluidos corporais, devido a um teor de proteína diferente, à dificuldade de aplicação deste ensaio a números elevados de amostras, à eliminação inevitável de intermediários do dobramento de PrP^{Sc} sensível a protease ou mesmo à fracção

de PrP^{Sc} autêntico, reduzindo assim a sensibilidade da detecção. Tal pode ser particularmente relevante em ensaios nos quais são utilizados tecidos periféricos e fluidos corporais, uma vez que podem apenas estar presentes níveis reduzidos de PrP^{Sc} (Horiuchi 1999, Jackson 1999, Swietnicki 2000). Estas preocupações requerem o desenvolvimento de reagentes imunológicos com uma elevada afinidade para PrP^{Sc}, o que permite a detecção específica sem ser necessário o tratamento proteolítico.

Descoberta de um novo reagente de captura para a detecção de PrP^{Sc}

Quer se aceite ou não a hipótese “apenas proteína” ou “apenas prião”, mantém-se a decorrer esforços contínuos para a pesquisa de agentes ou moléculas diferentes do prião que possam contribuir para a patogénese da doença de priões. Esta pesquisa é dirigida à satisfação de muitas questões sem resposta. Por exemplo, a proteína de prião sintetizada, isenta de qualquer contaminação, não provoca a doença; o mecanismo que desencadeia a conversão de PrP^{Sc} normal na isoforma de PrP^{Sc} patogénica não é conhecido. Uma outra questão por resolver diz respeito aos diversos fenótipos da doença de priões observados em animais e em seres humanos, definido pelo período de incubação da doença, pelo nível de glicosilação e pelos padrões de lesão. Após um conjunto de passagem em murganhos consanguíneos homozigóticos para um genótipo PRNP individual, todas as estirpes de tremores epizooticos mantinham o seu perfil original de doença. Estas observações levaram os investigadores a questionar se as diversas estirpes fenotípicas seriam dominadas por

diferentes isoformas conformacionais do mesmo precursor celular de prião ou se existia um outro factor que determinasse o fenótipo da estirpe transmissível. De facto, os modelos de conversão *in vitro* de PrP^{Sc} formado em reacções isentas de células nunca demonstraram constituir uma nova infectividade de TSE em animais (Caughey 2003). Estas questões levaram muitos a crer que existe um elemento em falta, designado “proteína X” conforme sugerido por Prusiner, ainda não descoberto.

Foi proposta a presença de uma molécula de ARN ou de ADN fortemente ligada na partícula do prião para explicar a propagação de estirpes diferentes do agente dos tremores epizooticos com fenótipos distintos em animais homozigóticos para o gene *PRNP* (Weissmann 1991). A análise de priões de tremores epizooticos extremamente purificados por eletroforese em gel com retorno focado revelou o tamanho reduzido dos ácidos nucleicos restantes (Kellings 1992). No entanto, num artigo recente, Narang indicou que os animais inoculados com ADNss purificado a partir de cérebros de hamster com tremores epizooticos desenvolveram a doença clínica (Narang 2002). Com base nestas conclusões, ele postulou que a “proteína acessória” codificada pelo ADNss pode estar implicada na conversão de PrP^C em PrP^{Sc}. Com base nesses estudos de conformação e conversão *in vitro*, foi colocada a hipótese que o ADN pudesse actuar como guardião da conformação de PrP^{Sc}, bem como catalisador para facilitar a conversão e agregação de PrP^{Sc} (Cordeiro 2001). Mais recentemente, foi descrito que a transformação estequiométrica de PrP^C em PrP^{res} *in vitro* requer moléculas de ARN específicas (Deleault 2003). O anticorpo monoclonal anti-ácido nucleico desenvolvido por Ortho-Clinical

Diagnostics que pode capturar de um modo discriminativo PrP^{Sc} mas não PrP^C (US 60/434 627, US 60/446 217) constitui uma outra evidência para demonstrar a associação de PrP^{Sc} a ácidos nucleicos.

Sabe-se que PrP^{Sc} isolado a partir de cérebro portador da doença também é associado a diversos glicanos. Tais compreendem unidades glicose 1,4-ligadas em hastes de priões, esfingolípídeos, polissacáridos e outros componentes da membrana em agregados de PrP^{Sc} (Appel 1999, Klein 1998) e proteoglicano sulfatado em placas amiloides de prião (Snow 1990), uma propriedade que é explorada na imunohistoquímica, na qual a ligação com anticorpos de sulfato de heparano (anti-HS) e anticorpos de proteoglicano-sulfato de heparano (anti-HSPG) tem demonstrado estar correlacionada com PrP anormal num intervalo de tempo tão rápido quanto 70 dias após a infecção e ao longo do decurso da doença (McBride 1998). Por meio de um mecanismo porventura diferente daquele em que os ácidos nucleicos participam na conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, os glicanos também podem converter a proteína de prião celular na conformação de folha beta. A conversão *in vitro* de PrP^C em PrP^{Sc} e em experiências de reconstituição de infectividade de prião, os sulfato-glicanos demonstraram facilitar a conversão ou fazer escalar a infectividade (Wong 2001, Shaked 2001 a, Diaz-Nido 2002). Com GST::prião de comprimento completo recombinante e GST::fragmento de prião, Warner demonstrou recentemente a ligação directa de prião recombinante a heparina e sulfato de heparano (Warner 2002). A região do péptido 23-52 na sequência do prião foi positiva para todos os testes de ligação a HS e HSPG. Uma vez que o péptido não conseguiu competir o prião de comprimento completo para a

ligação a heparina, a autor sugeriu que poderia existir um outro local principal de ligação a GAG no PrP^C intacto. Uma outra observação interessante é o facto de o plasminogénio ter sido descrito como capaz de se ligar a PrP^{Sc} proveniente de cérebro, mas não a PrP^C. Embora não tenha sido demonstrado que o plasminogénio possui uma interacção directa com PrP^{Sc}, é sugerido um local de ligação na região Kringle do plasminogénio, a qual é uma região conhecida que apresenta afinidade para heparina. Uma outra observação importante é o facto de GAG de espécies diferentes (bovina e suína) ou de órgãos diferentes (pulmão, rim e intestino) apresentarem afinidades diferentes para a ligação ao prião. A diferença em termos de afinidade pode ser devida à própria sequência do prião ou pode depender da presença de uma unidade particular de açúcar nos GAG testados.

À luz destas observações, foram propostos diversos péptidos que foram concebidos para capturar de um modo selectivo PrP^{Sc} mas não PrP^C através de afinidade peptídica para uma configuração de PrP^{Sc} única ou para moléculas associadas a PrP^{Sc}. Foram pesquisados quanto à sua aptidão para identificar e para capturar PrP^{Sc} a partir de homogenizados de cérebros portadores da doença, por imunoprecipitação na ausência de pré-tratamento com protease.

(1) Heparina/sulfato de heparina, péptidos de domínios de ligação

Os glicanos (GAG), tais como heparina e sulfato de heparina, foram associados a agregados amiloides PrP^{Sc}. Devido ao facto de a afinidade de associação ser muito superior em GAG::PrP^{Sc} do que em GAG::PrP^C é possível

utilizar péptidos caracterizados como domínio de ligação de glicanos para capturar de um modo selectivo PrP^{Sc} mas não PrP^C. Por este motivo, foram sintetizados péptidos descritos como domínio de ligação a heparina ou a sulfato de heparina: (1) WQPPRARI de fibronectina no terminal carboxi (Woods 1993, Hines 1994) (2) NWCKRGRKNCKTH do precursor proteico amiloide (Small 1994), (3) NYKKPKLG de factor de crescimento de fibroblastos do terminal N (FGF) (Lou 1996) e (4) KDFLSIELVRGRVK de domínio G do terminal C da cadeia alfa 1 de laminina (Yoshida 1999).

(2) Péptidos Kringle "condensados"

A região Kringle foi implicada na ligação selectiva de plasminogénio a PrP^{Sc}. Sabe-se também que a região Kringle possui actividade de ligação a heparina/sulfato de heparina (Mizuno 1994) para a qual estão implicados aminoácidos carregados positivamente (tais como Arg e Lys) (Soeda 1989). Num outra publicação, concluiu-se que dois tripéptidos conservados 2YYR", ou então são sugeridos três "YYX" descontinuados na sequência de prião, interactuam com PrP^{Sc} mas não interactuam com PrP^C (Paramithiotis 2003, WO 0078344A1). De um modo interessante, encontrou-se na sequência de plasminogénio humano, que existem quatro sequências Tyr-Arg-Gly em quatro de cinco regiões Kringle (região Kringle 1, 3, 4 e 5); existem seis sequências Tyr-Arg ou Arg-Tyr ou Arg-Lys no plasminogénio. Além do mais, diversos resíduos distantes foram aproximados por pontes dissulfureto formadas em laços Kringle (figura 1). Com base nestas observações, foi postulado que os aminoácidos Tyr, Arg e Lys na região Kringle do plasminogénio e na sequência de prião, possivelmente por meio de uma interacção com o

glicano associada ao complexo PrP^{Sc}, poderia ser considerada para a ligação selectiva a PrP^{Sc}. Por este motivo, foram sintetizados dois péptidos “Kringles condensados” YRGYRGYRGYRG e YRGYRGYKGYGYRG.

(3) Péptidos de ligação a ácido nucleico

Os ácidos nucleicos constituem uma outra categoria de moléculas que é associada a agregados de PrP^{Sc}. Os anticorpos anti-ADN foram já utilizados eficazmente para capturar PrP^{Sc}. As histonas constituem um grupo de proteínas sobre as quais se sabe que se ligam a ADN nuclear. Assim sendo, foram sintetizados três péptidos (1) AQKKDGKKRKRSRKESYSIYV de H2B(21-41), (2) ARTKQTARKSTGGKAPR-KQLA de H3(1-21) e (3) SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLR de H4(2-24) para avaliar a sua aptidão para capturar PrP^{Sc}.

II. Descrição abreviada da invenção

Constitui o objectivo da presente invenção proporcionar um meio não intrusivo para isolar, concentrar e monitorizar a proteína do prião patogénica associada à doença TSE. A memória descritiva descreve oito péptidos (péptido-1, péptido-2, péptido-3, péptido-5, péptido-6, péptido-7, péptido-8 e péptido-9) e a sua aptidão para capturar PrP^{Sc} a partir de homogenado de cérebro de animais e de seres humanos anteriormente infectados com a doença. Estes oito péptidos não capturam a proteína de prião celular de indivíduos que não padeçam da doença de priões. As provas fornecidas para suportar a presente invenção demonstram que o PrP^{Sc} está associado com uma afinidade elevada a muitas outras moléculas, tais como ácido nucleico e glicanos, conforme investigado. As provas também demonstram que a

associação é forte, resistente a tratamento por digestão com PK e que o PrP^{Sc} pode ser facilmente isolado por péptidos por meio do reconhecimento de tais parceiros de ligação associados.

A presente invenção diz respeito à utilização do péptido constituído pela sequência NWCKRGRKNCKTH (SEQ ID NO: 6) para capturar Prp^{Sc} através de glicanos ou de ácidos nucleicos associados com uma afinidade elevada a PrP^{Sc}, em combinação com qualquer anticorpo específico da sequência de prião para a detecção de PrP^{Sc}, de acordo com as reivindicações.

De acordo com outro aspecto, a presente memória descritiva diz respeito a péptidos, conforme descritos antes, que se liguem preferencialmente à proteína do prião patogénica mas não à forma celular normal da proteína do prião.

De acordo com outro aspecto, a presente memória descritiva diz respeito a péptidos, conforme descritos antes, para a detecção de PrP^{Sc} por meio do reconhecimento de afinidade elevada de glicanos ou de ácidos nucleicos associados em combinação com anticorpos específicos da sequência do prião.

De acordo com outro aspecto, a presente memória descritiva diz respeito a péptidos, conforme descritos antes, para o isolamento, purificação, captura, eliminação e monitorização de PrP^{Sc} na produção biológica de reagentes.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção diz respeito a estojos para a determinação da presença de PrP^{Sc}, os quais compreendem o péptido da presente invenção

para o passo de captura ou de detecção no procedimento de ensaio, de acordo com as reivindicações.

De acordo com outro aspecto, a presente memória descritiva diz respeito a estojos para a determinação da presença do anticorpo de PrP^{Sc} produzido em resposta a glicanos ou ácidos nucleicos associados com elevada afinidade como parceiros de ligação à proteína do prião patogénica.

Ainda de acordo com outro aspecto, a presente memória descritiva diz respeito a anticorpos anti-PrP^{Sc} e à sua produção utilizando os referidos glicanos ou ácidos nucleicos, os quais podem interagir com e/ou estar associados a PrP^{Sc}, e à sua utilização para a detecção do complexo glicano::PrP^{Sc} ou ácido nucleico::PrP^{Sc} e da infecção com doença de priões.

De acordo com outro aspecto, a presente memória descritiva diz respeito a um procedimento não agressivo de tratamento da amostra, o qual envolve a digestão com glicanase ou nucleasse para benefício da utilização dos péptidos descritos antes.

III. Descrição minuciosa

Preparação do homogenado de cérebro

Obteve-se lisado de cérebro de hamster normal e com tremores epizooticos a partir de Baltimore Research and Education Foundation sob a forma de um homogenado de tecido cerebral total a 10% em PBS (p/v). Tratou-se ainda o lisado por adição de 1/10 de volume de tampão homogenado de detergente 10X, constituído por 5% de desoxilato de sódio e 5% de Igpal CA-630 (equivalente a NP-40) em PBS, mantendo a

incubar a 4°C durante 1 hora e subsequente centrifugação a 1000g durante 10 minutos. Recolheu-se o sobrenadante resultante e utilizou-se no ensaio.

Obteve-se tecido cerebral bovino normal e com BSE a partir da Veterinary Laboratories Agency (VLA), UK. Obteve-se tecido de vCJD humana e de demência de corpo de Lewy na National CJD Surveillance Unit (NCJDSU), UK. Processou-se o tecido cerebral de um modo idêntico (ou semelhante) à da preparação de homogenado de cérebro de hamster.

Péptidos sintéticos

Foram sintetizados nove péptidos por ResGen (presentemente uma divisão da Invitrogen Corporation) ou então foram adquiridos ao Upstate Group, Inc. Cada péptido foi marcado com biotina na lisina do terminal C que suporta um espaçador amino-hexanoílo (K(Lc)) ou no terminal C através de um espaçador amino-hexanoílo (AMCAP). * Apresentados apenas para fins ilustrativos.

ID do Péptido		Sequência do péptido, preparado por	Origem da sequência
Péptido um*:	ResGen	WQPPRARIG-K(Lc)-Biotina	Fibronectina
Péptido dois:	ResGen	Biotina-AMCAP-NWCKRGRKNCKTH	Precursor proteico amilóide
Péptido três*:	ResGen	Biotina-AMCAP-NYKKPKLG	Factor de crescimento de fibroblastos (FGF)-1
Péptido quatro*:	ResGen	Biotina-AMCAP-KDFLSIELVRGRVK	Cadeia A de laminina
Péptido cinco*:	ResGen	YRGYRGYRGYRG-K(Lc)-Biotina	Kringle "condensado"-A

ID do Péptido		Sequência do péptido, preparado por	Origem da sequência
Péptido seis*:		YRGRYGYKGKYGIRG- K(Lc)-Biotina	Kringle "condensado"-B
Péptido sete*:	Upstate	AQKKDGKKPKRSRKESYSIYV- GGK(Lc)-Biotina	Histoma 2B humano
Péptido oito*:	Upstate	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA. GGK(Lc)-Biotina	Histoma 3 humano
Péptido nove*:	Upstate	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLR- GSGSK(Lc)-Biotina	Histoma 4 humano
Péptido dez*:	ResGen	Biotina-AMCAP -TIADRYRETAR	Proteína VP16, HSV-2
* apresentado apenas para fins ilustrativos			

Dissolveu-se o péptido biotinilado em PBS a 1 mg/mL e armazenou-se a -20°C, até à sua utilização.

Conjugação do péptido biotinilado com esferas magnéticas de estreptavidina

Lavou-se duas vezes 0,5 mL de Dynabeads® M-280 estreptavidina (DynaL Biotech, NY, USA, nº cat. 112.06) com PBS e isolou-se as esferas do tampão com uma barra magnética (DynaL Magnetic Particle Concentrator, MPC). Adicionou-se 100 µg de péptido e 1 mL de PBS às esferas lavadas. Manteve-se a incubar com rotação a 37°C durante 1 a 2 horas. Isolou-se as esferas a partir do tampão com a MPC, lavou-se duas vezes com 1 mL de PBS (0,1% de BSA) e manteve-se sob rotação durante 5 minutos à temperatura ambiente e sob lavagem. Bloqueou-se então as esferas de péptido-conjugado durante 2 horas, a 37°C com biotina 1 mM em Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, que continha 0,1% de BSA. Subsequentemente, lavou-se as esferas duas vezes com 1 mL de PBS (0,1% de BSA) e uma vez com 1 mL de PBS (0,1% de

BSA, 1% de Tween 20), mantendo de cada vez a incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente. Lavou-se então as esferas uma vez com 1 mL de PBS (0,1% de BSA) e depois armazenou-se em 1 ml de PBS (0,05% de azida de sódio) a 4°C.

Digestão com proteinase K

Condições para a digestão com PK de lisado de cérebro: colocou-se em suspensão homogenado de cérebro em tampão PBS na presença ou na ausência de detergente não iónico. A concentração total de proteína no homogenado não era superior a 2,5 mg/mL. Adicionou-se PK (Roche Diagnostics, IN, USA, n° de cat. 1373196) até uma concentração final de 50 ug/mL. Manteve-se a incubar a 37°C durante 0,5 a 1 hora. Interrompeu-se a digestão por adição de Pefabloc SC (Roche Diagnostics, IN, USA, n° de cat. 1585916) até uma concentração final de 4 mM.

Imunoprecipitação (IP), electroforese não redutora e detecção por imunoblot de PrP^{Sc}

Utilizou-se as esferas magnéticas de péptido conjugado para capturar PrP^{Sc} a partir do homogenado de cérebro por imunoprecipitação. O procedimento de IP é constituído pelo protocolo seguinte: mistura-se 50 uL de esferas de péptido conjugado com homogenado de cérebro tratado com PK ou não tratado com PK numa quantidade total de 1 mL de tampão de IP (3% de Tween20 e 3% de Igpal CA-630 em PBS) e mantém-se a incubar a 25°C durante 2,5 horas com rotação → separa-se as esferas utilizando o dispositivo MPC e lava-se as esferas 3 vezes, sob um vórtex durante 30 segundos, com tampão de lavagem IP (2% de Tween20 e 2% de Igpal CA-630 em

PBS) → Efectua-se a eluição de PrP^{Sc} capturado por aquecimento das esferas com tampão de amostra NuPAGE durante 10 a 15 minutos. Carrega-se a amostra aluída a partir da captura por IP em 4% a 12% de gel NuPAGE® Bis-Tris (Invitrogen, CA, USA, n° cat. NP0302) e submete-se a electroforese não redutora a 200 V durante 45 minutos. O procedimento de immunoblot é efectuado do modo seguinte: transfere-se as proteínas separadas no gel para uma membrana de PVDF de 0,2 um (Invitrogen, n° cat. LC2002) a 30 V durante 60 minutos → bloqueia-se a membrana com caseína Blocker™ em TBS (0,05% de Tween20) (Pierce Chemical Corp., IL, USA, n° cat. 37532) a 25°C durante 1 hora com agitação ou a 4°C de um dia para o outro → Utiliza-se com anticorpo principal 3F4 (Signet, MA, USA, n° cat. 9620-02) a uma diluição de 1: 3000 ou 6H4 (Prionics AG, Switzerland, n° cat. 01-011) a uma diluição de 1:5000 para se detectar o anticorpo principal em 10% de caseína Blocker™ em tampão TBST (Tri-Cl 25 mM, NaCl 0,2 M, 0,2% de Tween20, pH 8,0) a 25°C durante 1 hora com agitação. → Lava-se 3x durante 5 minutos com tampão TBST e com agitação. → Mantém-se a incubar a membrana com peroxidase de rábano de IgG anti-murganho policlonal de cabra (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA, n° cat. 115-035-003) a uma diluição entre 1:10000 e 1:30000 em 50% de caseína Blocker™ em tampão TBST buffer a 25°C durante 1 hora com agitação. → Lava-se 6x durante 5 minutos com tampão TBST e com agitação. → Adiciona-se substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences, NJ, USA, n° cat. RPN2109) ou substrato quimioluminescente SuperSignal West Dura (Pierce) à membrana para se desenvolver durante 5 minutos. → Obtém-se uma imagem por exposição a película Bio Max MR-2 (Kodak,

NY, USA) ou ao sistema de documentação de gel ChemiDoc (Bio-Rad, CA, USA).

Descrição das figuras

Figura 1: sequência de plasminogénio humano e regiões Kringle. Existem 4 sequências YRG em 4 de 5 regiões Kringle (retângulos a preto). Existem 6 sequências YK, RY, RK (retângulos a branco). Existem diversos Y, R ou K em torno de diversas pontes dissulfureto dos laços Kringle (círculos a preto).

Figura 2: captura por IP e immunoblot de PrP^{Sc} de hamster. Carrega-se directamente homogenado de cérebro de hamster normal (4 uL) e de tremores epizooticos (3 uL) em gel ou então submete-se a imunoprecipitação utilizando esferas magnéticas de estreptavidina com péptido biotinilado. Detecta-se o PrP por immunoblot utilizando 3F4. O lisado de tremores epizooticos foi digerido com PK por introdução directa. O homogenado para a captura por IP não foi tratado com PK.

Figura 3: captura por IP e immunoblot de PrP^{Sc} de BSE. Adicionou-se homogenado de cérebro de gado normal (10 uL) ou de gado afectado com BSE (5 uL) a 1 mL de tampão de IP e submeteu-se a imunoprecipitação do péptido-esferas. Tratou-se então o PrP imunoprecipitado com PK e analisou-se por SDS-PAGE e por immunoblot, detectado por 6H4. O PrP capturado proveniente do homogenado de cérebro com BSE era PrP^{Sc} autêntico uma vez que o tratamento com PK (50 ug/mL durante 1 hora a 37°C) gerou os fragmentos de PrP^{res} nucleares resistentes a PK. Os homogenados de cérebro clarificados provenientes de BSE e do controlo normal também foram mantidos a incubar na ausência (-) ou na

presença (+) de PK (50 ug/mL durante 1 hora a 37°C) e carregados directamente em SDS-gel como controlos.

Figura 4: imunocaptura de PrP^{Sc} a partir de cérebros de vCJD por péptidos. As esferas de péptido conjugado foram utilizadas para efectuar a imunoprecipitação de PrP em 5 uL de homogenados de cérebro clarificados provenientes de pacientes afectados por demência de corpo de Lewy (LBD) ou por vCJD (99/090). Analisou-se então os imunoprecipitados por SDS-PAGE (4%-12% de gel) e por Western blotting utilizando o anticorpo anti-PrP, 3F4. Carregou-se directamente 5 ul de homogenado de LBD não tratado e 5 ul de homogenado de cérebro com vCJD em SDS-gel para indicar o teor em prião.

IV. Vantagens.

A presente invenção utiliza péptidos para capturar PrP^{Sc} por reconhecimento de moléculas associadas com uma elevada afinidade no complexo de PrP^{Sc}, tais como glicanos, ácido nucleico. Devido à estreita associação destas moléculas apenas ao PrP^{Sc}, mas não ao PrP^C, a presente invenção proporciona um meio não intrusivo para a detecção de PrP^{Sc}, não sendo necessária a digestão com PK ou outro procedimento de modificação de proteínas. É esperado que condições suaves preservem a estrutura original e a conformação da proteína do prião patogénica, oferecendo assim uma oportunidade para a determinação da presença de PrP^{Sc} verdadeiro e minimizando a criação de PrP^{Sc} devido ao tratamento forte da amostra.

A utilização de péptidos sintéticos confere vantagens uma vez que estes apresentam uma especificidade de ligação, podendo também ser facilmente manuseados em revestimentos

directos numa fase sólida bem como ser conjugados para se ligarem ao sinal apresentado pelos reagentes, tais como peroxidase de rábano (HRP), ou serem adoptados em outro formato de ensaio de diagnóstico desejado.

V. Literatura citada.

Aguzzi A, Fischer MB, (2001) Prion-Binding Activity in Serum and Plasma., US 20010053533A1

Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D. (1999) Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. Biol Chem 380(11): 1295-306

Arnold, JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. J. Pathol. 176: 403-411

Barnard G, Helmick B, Madden S, Gilboume C and Patel R (2000) The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE Luminescence 2000; 15: 357-362

Belay ED (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. Annu. Rev. Microbiol. 53: 283-314.

Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, Bottcher S, Struckmeyer T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbriggen A, Stack M, Moser M, Oesch B, Kubler E. (2002) Validation of a luminescence immunoassay for the

detection of PrP(Sc) in brain homogenate. J Virol Methods 101(1-2): 79-84.

Bolton DC (2001) Prions and proteins: distinguishing between conformations. The Lancet 358(9277): 164-165

Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P. (1987) The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15 year investigation in France and review of the world literature. Neurology 37: 895-904.

Brown P. The risk of bovine spongiform encephalopathy ("mad cow disease") to human health. JAMA 1997; 278: 1008-101

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H and Bostock CJ. (1997) Transmissions to mice indicate that new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature 389: 498-501

Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey, W.S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP27-30 in water by infrared spectroscopy. Biochemistry 30: 7672-7680.

Caughey B and Kocisko DA. (2003) A nucleic-acid accomplice? Nature Oct 16;425(6959): 673-4

Chandler R, (1961) Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material. Lancet 1: 1378-1379

Cohen FE, Prusiner SB. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem* 67: 793-819

Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL. (2001) DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem*. 276(52): 49400-9.

Cuillid J, Chelle PL (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable? *C. R. Acad. Sci.* 203, 1552-1554

Deleault ND, Lucassen RW and Supattapone S. (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* Oct 16; 425(6959): 717-20

D'iaz-Nido J., Wandosell F. and Avila J (2002) Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* Jul; 23(7): 323-32

FDA and CBER, U.S. Department of Health and Human Services (2001) IV. RECOMMENDATIONS FOR DONOR DEFERRAL in Guidance for Industry: Revised Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products

Ferguson NM, Ghani AC, Donnelly CA, Hagenshaars TJ, Anderson RM. (2002) Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature* 415(6870): 420-4

Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A, (2000) Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 408: 479-83.

Foster JD, Hope J, McConnell I, Bruce M, Fraser H. (1994) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice. *Ann N Y Acad Sci* 724: 300-3.

Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6617-6621.

Gajdusek DC, Gibbs CJJ, Alpers MP (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209: 794-796

Gajdusek DC, (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197: 943-60

Gibbs CJJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388-389

Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Amyx H. (1979) Strain variation in the viruses of Creutzfeldt-Jakob disease and kuru. In: Prusiner SB, Hadlow WJ, editors. *Slow transmissible diseases of the nervous system. Volume 2.* New York: Academic Press; p. 87-110.

Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J (1997) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349(9045): 99-100

Hillier CE, Salmon RL, Neal JW, Hilton DA. (2002) Possible underascertainment of variant Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72(3): 304-9

Hines KL, Kulkarni AB, McCarthy JB, Tian H, Ward JM, Christ M, McCartney-Francis NL, Furcht LT, Karlsson S, Wahl SM. (1994) Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor beta 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* May 24; 91(11): 5187-91.

Holada K, Simak J, Vostal JG (2000) Transmission of BSE by blood transfusion. *Lancet* 356(9243): 1772

Hope J, Morton LJD, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH (1986). The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* 5, 2591-2597.

Horiuchi M, Caughey B, (1999) Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J* 18(12): 3193-203.

Horwich AL, Weissman JS (1997) Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease. *Cell*, 89: 499-510

Houston F (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356(9234): 999-1000

Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* Nov;83(Pt 11): 2897-905

Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 283(5409): 1935-7.

Kellings K, Meyer N, Mirenda C, Prusiner SB, Riesner D. (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* 73, 1025-1029.

Kimberlin RH, Cole S, Walker CA. (1987) Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol* 68: 1875-81.

Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H. (1989) The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol* 70: 2017-25.

Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R. and Riesner D (1998) Biol. Chem. 379: 655-666

Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Homemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B. (1997) Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature 390(6655): 74-7

Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, et al. (1996) BSE transmission to macaques. Nature 381: 743-44

Luo Y, Gabriel JL, Wang F, Zhan X, Maciag T, Kan M, McKeehan WL. (1996) Molecular modeling and deletion mutagenesis implicate the nuclear translocation sequence in structural integrity of fibroblast growth factor-1. J Biol Chem. Oct 25;271 (43): 26876-83.

Maissen M, Roeckl C, Markus G, Goldman W, Aguzzi A, (2001) Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. Lancet 357: 2026-8.

Manuelidis EE, Kim JH, Mericangas JR, Manuelidis L. (1985) Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. Lancet 2: 896-97

McBride PA, Wilson MI, eikelenboom P, Tunstall A, Bruce ME (1998) Heparan Sulfate Proteoglycan is Associated with Amyloid Plaques and Neuroanatomically Targeted PrP

Pathology throughout the Incubation Period of Scrapie-Infected Mice. *Experimental Neurol.* 149: 447-454

McGowan JP. (1922) Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.* 5: 365-75

Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2310-2314.

Mizuno K, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nose T, Shimohigashi Y, Nakamura T. (1994) Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem.* Jan 14;269(2): 1131-6. **plasminogénio**

Moynagh J, Schimmel H, (1999) The evaluation of tests for the diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines (8 July 1999)
http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse_12-en.html.

Narang HK (2002) A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: prion theory versus virus theory. *Exp Biol. Med.* (Maywood) 227(1): 4-19

O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE, Miller JM, Cutlip RC, Wells GA, et al. (2000) Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol* 38: 3254-9.

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10962-10966

Paramithiotis E et al (2003) A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation Nat Med Jul;9(7): 893-9

Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzzi A, Raeber AJ. (2001) Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells.

Pattison I (1957) Transmission of scrapie to the goat. Lancet 272: 104-105.

Prusiner SB, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science (1982) 216: 136-44

Raymond GJ et al. (2000) Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. EMBO J Sept 1; 19(17): 4425-30

Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. Nat. Med. 4(10): 1157-65

Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandevelde M, Heim D, Oesch B, Moser

M. (1999) Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol (Berl)* 98(5): 437-43.

Shaked GM, Meiner Z, Avraham I, Taraboulos A, Gabizon R (2001 a) Reconstitution of Prion Infectivity from Solubilized Protease-resistant PrP and Nonprotein Components of Prion Rods. *J. Biol. Chem.* 276(17): 14324-14328

Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R, (2001b) A Protease-resistant Prion Protein Isoform Is Present in Urine of Animals and Humans Affected with Prion Diseases *J. Biol. Chem.*, 276(34): 31479-82

Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. (1994) Aglycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 125: 1239-50

Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci.* Apr;14(4): 2117-27

Snow AD (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest.* 63(5): 601-1

Soeda S, Ohki H, Shimeno H, Nagamatsu A (1989) Further characterization of the binding of plasminogen to heparin: evidence for the involvement of lysine residues. *Biochim Biophys Acta*. Nov 9;999(1): 29-35. **Plasminogen**

Swietnicki W, Morillas M, Chen SG, Gambetti P, Surewicz WK. (2000) Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry* 39(2): 424-31.

Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell. Biol.* 110: 2117-32

Tateishi J. (1985) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. *Lancet* 2: 1074

Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R., Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90.

Valleron AJ, Boelle PY, Will R, Cesbron JY. (2001) Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science* 294(5547): 1726-8

Wadsworth JD, Joiner S, et al. (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358(9277): 171-80

Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE (2002) Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem.* May 24;277(21): 18421-30

Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, et al. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 31: 419-20

Williams ES, Young S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16: 89-98

Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, Caughey B (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrPSc-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein *EMBO J* 20(3): 377-386

Woods A. McCarthy JB, Furcht LT, Couchman JR. (1993) A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell.* Jun;4(6): 605-13

Yoshida I, Tashiro K, Monji A, Nagata I, Hayashi Y, Mitsuyama Y, Tashiro N. (1999) Identification of a heparin binding site and the biological activities of the laminin

alpha 1 chain carboxy-terminal globular domain. J Cell Physiol. Apr; 179(1): 18-28.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, INC.

<120> PÉPTIDOS PARA A DISCRIMINAÇÃO DE PRIÕES

<130> P052657EP

<140> EP

<141> 2005-09-29

<150> US 60/614533

<151> 2004-09-30

<160> 20

<170> seqwin99, versão 1.02

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 1

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile
1 5

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 2

```

Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser
1      5      10      15
Tyr Ser Ile Tyr Val
      20

```

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 3

```

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1      5      10      15
Arg Lys Gln Leu Ala
      20

```

<210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 4

```

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
1      5      10      15
Arg His Arg Lys Val Leu Arg
          20

```

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 5

```

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Gly
1      5

```

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 6

Asn Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Asn Cys Lys Thr His
 1 5 10

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 7

Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Gly
 1 5

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 8

Lys Asp Phe Leu Ser Ile Glu Leu Val Arg Gly Arg Val Lys
 1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 9

Tyr Arg Gly Tyr Arg Gly Tyr Arg Gly Tyr Arg Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 10

Tyr Arg Gly Arg Tyr Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Gly Tyr Arg Gly
1 5 10 15

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 11

Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser
 1 5 10 15
 Tyr Ser Ile Tyr Val
 20

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 12

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
 1 5 10 15
 Arg Lys Gln Leu Ala
 20

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 13

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
 1 5 10 15
 Arg His Arg Lys Val Leu Arg
 20

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 14

```

    Thr Ile Ala Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Thr Ala Arg
    1           5           10

```

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 15

```

    Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Gly Lys
    1           5           10

```

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 16

Tyr Arg Gly Tyr Arg Gly Tyr Arg Gly Tyr Arg Gly Lys
 1 5 10

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 17

Tyr Arg Gly Arg Tyr Gly Tyr Lys Gly Lys Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys
 1 5 10 15

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 18

Ala Gln Lys Lys Asp Gly Lys Lys Arg Lys Arg Ser Arg Lys Glu Ser
 1 5 10 15
 Tyr Ser Ile Tyr Val Gly Gly Lys
 20

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 19

```

Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly Lys Ala Pro
1           5           10           15
Arg Lys Gln Leu Ala Gly Gly Lys
                20

```

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> PÉPTIDO

<400> 20

```

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala Lys
1           5           10           15
Arg His Arg Lys Val Leu Arg Gly Ser Gly Ser Lys
                20           25

```

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- US 4806627 A
- EP 0861900 A
- US 20020137114 A1
- US 20010001061 A1, Safar
- US 20020001817 A1
- US 6165784 A, O'Rourke
- US 6261790 B
- WO 0233420 A2
- WO 020071 A
- US 20010053533 A1, Aguzzi
- US 60434627 B
- US 60446217 B
- WO 0078344 A1, Paramithiotis

Literatura citada na descrição, para além das patentes de invenção

- Appel TR; Dumpitak C; Matthiesen U; Riesner D. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem*, 1999, vol. 380 (11), 1295-306
- Arnold, JE; Tipler C; Laszlo L; Hope J; Landon M; Mayer RJ. The abnormal isoform of the prion protein accumulates

in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.*, 1995, vol. 176, 403-411

- **Barnard G; Helmick B; Madden S; Gilboume C; Patel R.** The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential extraction and DELFIA as a diagnostic test for. *BSE Luminescence*, 2000, vol. 15, 357-362

- **Belay ED.** Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, vol. 53, 283-314

- **Biffiger K; Zwald D; Kaufmann L; Briner A; Nayki I; Purro M; Bottcher S; Struckmeyer T; Schaller O; Meyer R.** Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate. *J Virol Methods*, 2002, vol. 101 (1-2), 79-84

- **Bolton DC.** Prions and proteins: distinguishing between conformations. *The Lancet*, 2001, vol. 358 (9277), 164-165

- **Brown P; Cathala F; Raubertas RF; Gajdusek DC; Castaigne P.** The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15 year investigation in France and review of the world literature. *Neurology*, 1987, vol. 37, 895-904

- **Brown P.** The risk of bovine spongiform encephalopathy (''mad cow disease'') to human health. *JAMA*, 1997, vol. 278, 1008-101

- **Bruce ME; Will RG; Ironside JW; McConnell I; Drummond D; Suttie A; McCardle L; Chree A; Hope J; Birkett C.** Transmissions to mice indicate that new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 1997, vol. 389, 498-501

- **Caughey BW; Dong A; Bhat KS; Ernst D; Hayes SF; Caughey, W.S.** Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 7672-7680

- **Caughey B; Kocisko DA.** A nucleic-acid accomplice?. *Nature*, vol. 425 (6959), 673-4
- **Chandler R.** Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material. *Lancet*, 1961, vol. 1, 1378-1379
- **Cohen FE; Prusiner SB.** Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biocem*, 1998, vol. 67, 793-819
- **Cordeiro Y; Machado F; Juliano L; Juliano MA; Brentani RR; Foguel D; Silva JL.** DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem.*, 2001, vol. 276 (52), 49400-9
- **Cuillid J; Chelle PL.** La maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable?. *C. R. Acad. Sci.*, vol. 203, 1552-1554
- **Deleault ND; Lucassen RW; Supattapone S.** RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 16 October 2003, vol. 425 (6959), 717-20
- **D'iaz-Nido J.; Wandosell F.; Avila J.** Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem*, July 2002, vol. 23 (7), 323-32
- **Ferguson NM; Ghani AC; Donnelly CA; Hagenshaars TJ; Anderson RM.** Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature*, 2002, vol. 415 (6870), 420-4
- **Fischer MB; Roeckl C; Parizek P; Schwarz HP; Aguzzi A.** Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 2000, vol. 408, 479-83
- **Foster JD; Hope J; McConnell I; Bruce M; Fraser H.** Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, vol. 724, 300-3
- **Gabizon R; McKinley MP; Groth D; Prusiner SB.** Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie

prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6617-6621

- **Gajdusek DC; Gibbs CJJ; Alpers MP.** Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 1966, vol. 209, 794-796

- **Gajdusek DC.** Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 1977, vol. 197, 943-60

- **Gibbs CJJ; Gajdusek DC; Asher DM; Alpers MP; Beck E; Daniel PM; Matthews WB.** Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, 1968, vol. 161, 388-389

- Strain variation in the viruses of Creutzfeldt-Jakob disease and kuru. **Gibbs CJ Jr; Gajdusek DC; Amyx H.** Slow transmissible diseases of the nervous system. Academic Press, 1979, vol. 2, 87-110

- **Hill AF; Zeidler M; Ironside J; Collinge J.** Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet*, 1997, vol. 349 (9045), 99-100

- **Hillier CE; Salmon RL; Neal JW; Hilton DA.** Possible underascertainment of variant Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2002, vol. 72 (3), 304-9

- **Hines KL; Kulkarni AB; McCarthy JB; Tian H; Ward JM; Christ M; McCartney-Francis NL; Furcht LT; Karlsson S; Wahl SM.** Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor beta 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 24 May 1994, vol. 91 (11), 5187-91

- **Holada K; Simak J; Vostal JG.** Transmission of BSE by blood transfusion. *Lancet*, 2000, vol. 356 (9243), 1772

- **Hope J; Morton LJD; Farquhar CF; Multhaup G; Beyreuther K; Kimberlin RH.** The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 2591-2597
- **Horiuchi M; Caughey B.** Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J*, 1999, vol. 18 (12), 3193-203
- **Horwich AL; Weissman JS.** Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease. *Cell*, 1997, vol. 89, 499-510
- **Houston F.** Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*, 2000, vol. 356 (9234), 999-1000
- **Hunter N; Foster J; Chong A; McCutcheon S; Parnham D; Eaton S; MacKenzie C; Houston F.** Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*, November 2002, vol. 83, 2897-905
- **Jackson GS; Hosszu LL; Power A; Hill AF; Kenney J; Saibil H; Craven CJ; Waltho JP; Clarke AR; Collinge J.** Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*, 1999, vol. 283 (5409), 1935-7
- **Kellings K; Meyer N; Mirenda C; Prusiner SB; Riesner D.** Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, 1025-1029
- **Kimberlin RH; Cole S; Walker CA.** Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol*, 1987, vol. 68, 1875-81

- **Kimberlin RH; Walker CA; Fraser H.** The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, 1989, vol. 70, 2017-25
- **Klein TR; Kirsch D; Kaufmann R.; Riesner D.** *Biol. Chem.*, 1998, vol. 379, 655-666
- **Korth C; Stierli B; Streit P; Moser M; Schaller O; Fischer R; Schulz-Schaeffer W; Kretzschmar H; Raeber A; Braun U.** Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, 1997, vol. 390 (6655), 74-7
- **Lasmézas CI; Deslys JP; Demaimay R; Adjou KT; Lamoury F et al.** BSE transmission to macaques. *Nature*, 1996, vol. 381, 743-44
- **Luo Y; Gabriel JL; Wang F; Zhan X; Maciag T; Kan M; McKeehan WL.** Molecular modeling and deletion mutagenesis implicate the nuclear translocation sequence in structural integrity of fibroblast growth factor-1. *J Biol Chem.*, 25 October 1996, vol. 271 (43), 26876-83
- **Maissen M; Roeckl C; Markus G; Goldman W; Aguzzi A.** Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. *Lancet*, 2001, vol. 357, 2026-8
- **Manuelidis EE; Kim JH; Mericangas JR; Manuelidis L.** Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. *Lancet*, 1985, vol. 2, 896-97
- **McBride PA; Wilson MI; eikelenboom P; Tunstall A; Bruce ME.** Heparan Sulfate Proteoglycan is Associated with Amyloid Plaques and Neuroanatomically Targeted PrP Pathology throughout the Incubation Period of Scrapie-Infected Mice. *Experimental Neurol.*, 1998, vol. 149, 447-454
- **McGowan JP.** Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.*, 1922, vol. 5, 365-75

- **Meyer RK; McKinley MP; Bowman KA; Braunfeld MB; Barry RA; Prusiner SB.** Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 2310-2314
- **Mizuno K; Inoue H; Hagiya M; Shimizu S; Nose T; Shimohigashi Y; Nakamura T.** Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem.*, 14 January 1994, vol. 269 (2), 1131-6
- **Moynagh J; Schimmel H.** *The evaluation of tests for the diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines*, 08 July 1999, <http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12-en.html>.
- **Narang HK.** A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: prion theory versus virus theory. *Exp Biol. Med. (Maywood)*, 2002, vol. 227 (1), 4-19
- **O'Rourke KI; Baszler TV; Besser TE; Miller JM; Cutlip RC; Wells GA et al.** Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol*, 2000, vol. 38, 3254-9
- **Pan KM; Baldwin M; Nguyen J; Gasset M; Serban A; Groth D; Mehlhorn I; Huang Z; Fletterick RJ; Cohen FE.** Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10962-10966
- **Paramithiotis E et al.** A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med*, July 2003, vol. 9 (7), 893-9
- **Parizek P; Roeckl C; Weber J; Flechsig E; Aguzzi A; Raeber AJ.** Similar turnover and shedding of the cellular

prion protein in primary lymphoid and neuronal cells. *Lancet*, 2001, vol. 272, 104-105

• **Pattison I (1957) Transmission of scrapie to the goat.** *Lancet*, vol. 272, 104-105

• **Prusiner SB.** Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, vol. 216, 136-44

• **Raymond GJ et al.** Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *EMBO J*, 01 September 2000, vol. 19 (17), 4425-30

• **Safar J; Wille H; Itri V; Groth D; Serban H; Torchia M; Cohen FE; Prusiner SB.** Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.*, 1998, vol. 4 (10), 1157-65

• **Schaller O; Fatzer R; Stack M; Clark J; Cooley W; Biffiger K; Egli S; Doherr M; Vandevelde M; Heim D.** Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol (Berl)*, 1999, vol. 98 (5), 437-43

• **Shaked GM; Meiner Z; Avraham I; Taraboulos A; Gabizon R.** Reconstitution of Prion Infectivity from Solubilized Protease-resistant PrP and Nonprotein Components of Prion Rods. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276 (17), 14324-14328

• **Shaked GM; Shaked Y; Kariv-Inbal Z; Halimi M; Avraham I; Gabizon R.** A Protease-resistant Prion Protein Isoform Is Present in Urine of Animals and Humans Affected with Prion Diseases. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276 (34), 31479-82

- **Shyng SL; Heuser JE; Harris DA.** Aglycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol*, 1994, vol. 125, 1239-50
- **Small DH; Nurcombe V; Reed G; Clarris H; Moir R; Beyreuther K; Masters CL.** A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci.*, April 1994, vol. 14 (4), 2117-27
- **Snow AD.** Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest.*, 1990, vol. 63 (5), 601-1
- **Soeda S; Ohki H; Shimeno H; Nagamatsu A.** Further characterization of the binding of plasminogen to heparin: evidence for the involvement of lysine residues. *Biochim Biophys Acta*, 09 November 1989, vol. 999 (1), 29-35
- **Swietnicki W; Morillas M; Chen SG; Gambetti P; Surewicz WK.** Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry*, 2000, vol. 39 (2), 424-31
- **Taraboulos A; Serban D; Prusiner SB.** Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell. Biol*, 1990, vol. 110, 2117-32
- **Tateishi J.** Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. *Lancet*, 1985, vol. 2, 1074
- **Telling GC; Scott M; Mastrianni J; Gabizon R.; Torchia M; Cohen FE; DeArmond SJ; Prusiner SB.** Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes

implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 1995, vol. 83, 79-90

• **Valleron AJ; Boelle PY; Will R; Cesbron JY.** Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science*, 2001, vol. 294 (5547), 1726-8

• **Wadsworth JD; Joiner S et al.** Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*, 2001, vol. 358 (9277), 171-80

• **Warner RG; Hundt C; Weiss S; Turnbull JE.** Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem.*, 24 May 2002, vol. 277 (21), 18421-30

• **Wells GAH; Scott AC; Johnson CT; Gunning RF; Hancock RD et al.** A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 1987, vol. 31, 419-20

• **Williams ES; Young S.** Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.*, 1980, vol. 16, 89-98

• **Wong C; Xiong LW; Horiuchi M; Raymond L; Wehrly K; Chesebro B; Caughey B.** Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrPSc-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J*, 2001, vol. 20 (3), 377-386

• **Woods A; McCarthy JB; Furcht LT; Couchman JR.** A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*, June 1993, vol. 4 (6), 605-13

• **Yoshida I; Tashiro K; Monji A; Nagata I; Hayashi Y; Mitsuyama Y; Tashiro N.** Identification of a heparin binding site and the biological activities of the laminin alpha 1

chain carboxy-terminal globular domain. *J Cell Physiol.*,
April 1999, vol. 179 (1), 18-28

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de PrP^{Sc} *in vitro* que compreende:

fazer contactar uma amostra com um péptido constituído pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 (NWCKRGRKNCKTH) e um anticorpo específico do prião, em que o péptido e o anticorpo específico do prião se ligam a PrP^{Sc} ; e detectar o PrP^{Sc} .

2. Método para a detecção de PrP^{Sc} *in vitro* que compreende:

proporcionar um suporte sólido que possui a ele ligado um péptido constituído pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 (NWCKRGRKNCKTH) e um anticorpo específico do prião, em que o péptido ou o anticorpo específico do prião se ligam a PrP^{Sc} ;

fazer contactar o suporte sólido com a amostra;

lavar o suporte para remover qualquer amostra não ligada;

fazer contactar o suporte sólido com outro péptido constituído pela sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (NWCKRGRKNCKTH) ou o anticorpo específico do prião e

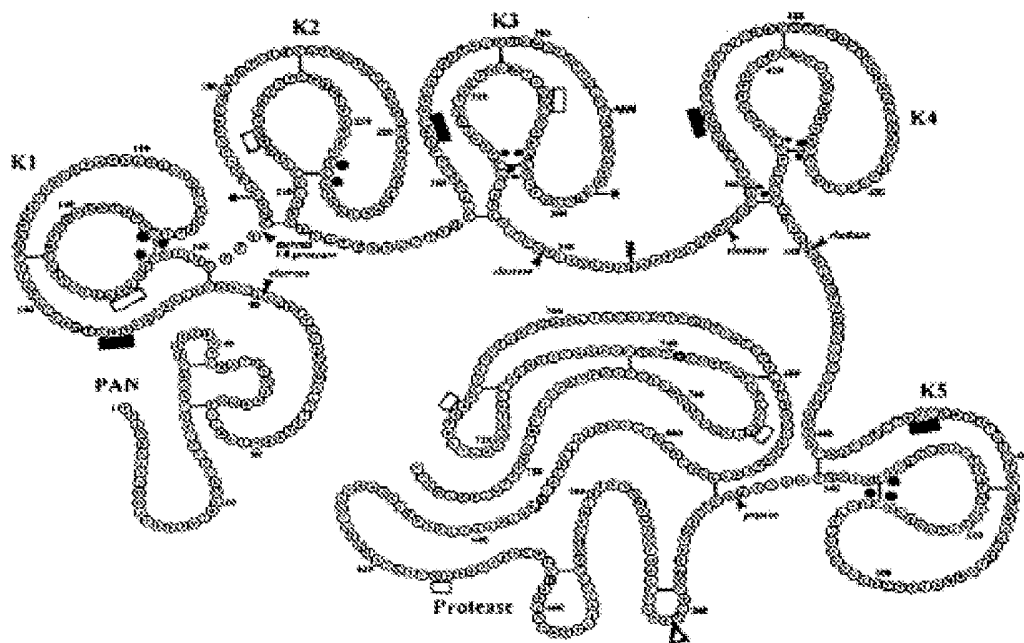
efectuar um passo de detecção para se determinar se o PrP^{Sc} está ligado ao suporte sólido.

3. Estojo para a detecção de PrP^{Sc} que compreende:

um suporte sólido que possui a ele ligado um péptido constituído pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 (NWCKRGRKNCKTH) ou um anticorpo específico do prião e

um outro péptido constituído pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6 (NWCKRGRKNCKTH) ou um anticorpo específico do prião.

FIGURA 1



<http://www.chem.cmu.edu/groups/Li/struct/rg/plasminogen/plasminogen.html>

FIGURA 2

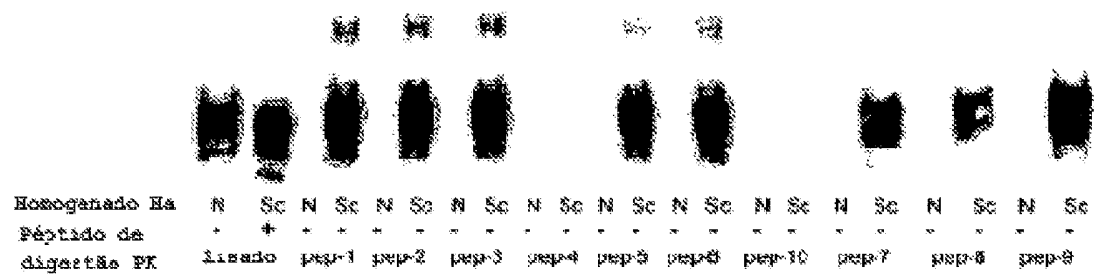


FIGURA 3

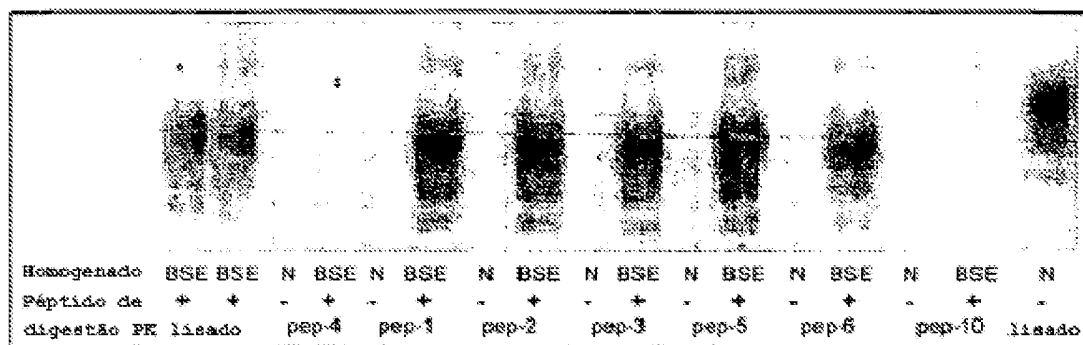


FIGURA 4

