

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 925**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03746148 .0**  
96 Fecha de presentación: **08.04.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1572937**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Polipéptidos híbridos con motivos injertados y usos de los mismos**

30 Prioridad:  
**09.04.2002 US 371610 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.05.2012**

73 Titular/es:  
**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE  
10550 NORTH TORREY PINES ROAD  
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:  
**BURTON, Dennis, R.;  
WILLIAMSON, R., Anthony y  
MORONCINI, Gianluca**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 380 925 T3

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

Polipéptidos híbridos con motivos injertados y usos de los mismos

- 5 La materia objeto proporcionada en la presente memoria se realizó con ayuda del gobierno bajo el nº de subvención HL63817 concedida por el National Institutes of Health. El gobierno puede tener ciertos derechos en dicha materia objeto.

## Solicitudes relacionadas

- 10 Beneficio de prioridad respecto a la solicitud de Estados Unidos provisional de Nº de Serie 60/371.610, presentada el 9 de abril de 2002, titulada "POLIPEPTIDOS HÍBRIDOS CON MOTIVOS INJERTADOS QUE CONTIENEN LA INTERFAZ DE REPLICACIÓN DEL POLIPÉPTIDO PRIÓNICO CELULAR Y DE OTRAS ENFERMEDADES DE LA AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS Y USOS DE LOS MISMOS" para R. Anthony Williamson, Dennis R. Burton y Gianluca Moroncini.

- 15 La materia objeto en la presente memoria está relacionada con la materia objeto en la solicitud PCT internacional Nº (nº de expediente 22908-1229PC), presentada el mismo día con la presente, titulada "POLIPÉPTIDOS HÍBRIDOS CON MOTIVOS INJERTADOS QUE CONTIENEN LA INTERFAZ DE REPLICACIÓN DEL POLIPÉPTIDO PRIÓNICO CELULAR Y MOTIVOS DE OTRAS ENFERMEDADES DE LA CONFORMACIÓN DE PROTEÍNAS Y USOS DE LOS MISMOS".

## Antecedentes

- 25 Las encefalopatías espongiformes transmisibles, incluyendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) de seres humanos y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE; también conocida como Enfermedad de las Vacas Locas) y la tembladera de los animales (*scrapie*), son enfermedades de demencia estrechamente relacionadas de vacas, ovejas, seres humanos y otros animales. La encefalopatía espongiforme bovina (BSE), la tembladera de ovejas, el Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) de seres humanos son sólo unos cuantos ejemplos de un grupo
- 30 de trastornos neurodegenerativos denominados encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE); están caracterizados por pérdida de control motor, demencia, parálisis, ceguera, desgaste y, en última instancia, muerte. Estas enfermedades pueden ser hereditarias o esporádicas. Un riesgo de contraer TSE para seres humanos es a través de productos alimenticios derivados de ganado bovino infectado con BSE. Otro riesgo de transmisión es una posible infección a través de sangre y productos sanguíneos humanos que tengan su origen en donantes infectados
- 35 por TSE. Esta familia de enfermedades neurodegenerativas invariablemente mortales y la enfermedad del desgaste crónico (CWD) de ciervos y alces están causadas por priones (Prusiner et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 13363-13383).

- 40 La proteína priónica corresponde al producto de un gen que se encuentra de forma natural en el genoma de todos los vertebrados desde seres humanos a peces. El gen está codificado típicamente por aproximadamente 771 nucleótidos que codifican 257 aminoácidos. Se expresa en muchos, pero no en todos, los tejidos de animales, siempre en la superficie externa de la membrana celular. Se han secuenciado los genes de más de 89 especies; también se han identificado y secuenciado mutaciones, incluyendo aquellas con inserciones y deleciones y otras alteraciones. Se ha detectado ácido nucleico relacionado con PrP en organismos tales como *Drosophila*, el
- 45 nematodo *Caenorhabditis elegans* y levaduras.

- El precursor de la proteína priónica (PrP o PrP<sup>c</sup>) es la isoforma celular normal de la proteína priónica. La proteína priónica infecciosa se denomina PrP<sup>Sc</sup>, y la proteína priónica normal es la PrP<sup>c</sup> (la "sc" es por *scrapie* y la "c" por celular). También se conocen formas truncadas y recombinantes. Por lo tanto, existen dos isoformas diferentes de la
- 50 proteína priónica, una se expresa de forma normal y una está presente de forma anormal. La PrP<sup>Sc</sup> es el componente principal de las placas amiloides que se encuentran a veces en los cerebros de ovejas infectadas con tembladera y en cerebros de seres humanos y otros animales infectados con enfermedades priónicas. Se cree que la conversión de PrP<sup>c</sup> en PrP<sup>Sc</sup> implica la conversión de regiones alfa-helicoidales de la proteína en láminas beta. Las mutaciones asociadas con enfermedad priónica familiar aumentan la probabilidad de conversión; diferentes
- 55 mutaciones dan como resultado diferentes síntomas de enfermedad. La CJD es una demencia, la GSS (Enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker) ataxia y el FFI (insomnio familiar fatal).

- Las formas heredadas de la enfermedad priónica constituyen aproximadamente el 25% de todos los casos de enfermedades priónicas en seres humanos, particularmente, GSS, CJD familiar y FFI. En cada una de las formas heredadas, se han encontrado mutaciones en la ORF (fase de lectura abierta) del gen de PRNP. La primera mitad de la ORF de PRNP contiene aproximadamente 170 pb con un alto contenido (aproximadamente el 80%) de los nucleótidos guanidina (G) y citidina (C), la mayoría de esta secuencia está organizada en repeticiones de 24 pb (o 27 pb). Se observan pocas diferencias entre estas secuencias y entre las de otras especies, sugiriendo que están
- 60 altamente conservadas a través de la evolución. El gen se expresa predominantemente en células neuronales, así como en ganglios y nervios del sistema nervioso periférico. No se expresa exclusivamente en el sistema nervioso central (SNC) y neuronas, sino que también se expresa en otros tejidos, incluyendo riñón, corazón, pulmón y bazo.
- 65

Existen muchas mutaciones que se han identificado con la ORF de la PRNP y con frecuencia están genéticamente vinculadas a enfermedad priónica hereditaria. La proteína PrP<sup>c</sup> se expresa como una glicoproteína anclada a glicosil fosfatidil inositol que se encuentra en la membrana celular externa de las neuronas y en menor medida de linfocitos y otras células.

5 La transmisión entre especies está caracterizada por bajas tasas de transmisión o un tiempo de incubación largo. La BSE se ha transmitido a ratones, ovejas, cerdos y titís. La transmisión se caracteriza por la inducción de una forma alterada del producto génico del hospedador a través de su interacción con el componente homólogo del material infeccioso. Los ratones no se infectan por priones humanos, ni tampoco los ratones transgénicos que llevan una copia de PrP humana; sin embargo, los ratones transgénicos que llevan una PrP híbrida ratón/humano se infectan por priones humanos. Esto sugiere que es necesaria una interacción entre un factor del hospedador y la PrP para la transmisión, y que el factor de ratón no es suficientemente similar al factor humano para interaccionar con la PrP humana. La inclusión de algunas secuencias de ratón en la PrP de otro modo humana restauraba la interacción.

15 El único componente conocido del prión infeccioso es una isoforma anormal causante de enfermedad de la proteína priónica denominada PrP<sup>Sc</sup>. Para distinguir la isoforma celular normal (PrP<sup>c</sup>) de la PrP<sup>Sc</sup> en tejidos infectados, los inmunoensayos convencionales han dependido de la degradación proteolítica de la PrP<sup>f</sup>, seguida de la detección del núcleo resistente a proteasas de la PrP<sup>Sc</sup> (denominada PrP 23-30) que es antigénicamente indistinguible de la PrP<sup>c</sup> (véase, por ejemplo, Oesch et al. (1985) Cell 40: 735-746; Prusiner (1999) en Prion Biology and Diseases (ed. S.B. Prusiner), Cold Spring harbor Laboratory Press).

25 La emergencia en Europa de una nueva forma variante de CJD (vCJD) está estrechamente asociada con la ingestión de carne contaminada con prión de BSE y ha aumentado las preocupaciones sobre el riesgo que representan los priones para la seguridad de los productos alimenticios y sanguíneos (Bruce et al. (1997) Nature 389: 498-501; Hill et al. (1997) Nature 389: 448-450). Los estudios en ratones transgénicos que albergan PrP humana y bovina proporcionan pruebas de que los priones de ganado bovino infectado con BSE causan vCJD (Scott et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 15137-15142; Scott et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 14279-14284; y Hill et al. (1997) Nature 389: 448-450). Son preocupaciones importantes de salud pública si los priones de CWD y BSE tienen características de cepa similares y si la CWD puede atravesar la barrera de especie a seres humanos (Horiuchi et al. (1999) Structure 7: R231-R240; Raymond et al. (1997) Nature 388: 285-288). La ausencia de un ensayo de diagnóstico sensible para la infección por priones ha impedido una evaluación precisa de cuántos de los millones de individuos expuestos a priones de BSE están actualmente incubando la enfermedad (Aguzzi et al. (2001) Nat. Med. 7: 289-290).

35 Se han desarrollado ensayos prototípicos de uso potencial en el diagnóstico de priones (véase, por ejemplo, Safer et al. (1998) Nat. Med 4: 1157-1165). Por ejemplo, se ha desarrollado un inmunoensayo dependiente de conformación que cuantifica la PrP<sup>Sc</sup> realizando un seguimiento de la unión de anticuerpo a las formas desnaturalizada y nativa de la PrP simultáneamente. El ensayo (véase, Safar et al. (2002) Nature Biotechnology issue 20 marzo 2002; véase también la solicitud de Estados Unidos en trámite junto con la presente de N° de Serie 09/627.218) usa un fragmento de anticuerpo recombinante (recFab) que reacciona con los restos 95-105 de la PrP bovina para la detección y un segundo recFab que reacciona con los restos 132-156 para la captura.

45 Los anticuerpos que distinguen entre PrP<sup>c</sup> y PrP<sup>Sc</sup> son de valor en el estudio de la maquinaria específica de la replicación de priones y en el diagnóstico de la infección por priones. Aunque están disponibles anticuerpos monoclonales que reconocen la PrP<sup>c</sup> (Williamson et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 7279-7282; Williamson et al. (1998) J. Virol. 72: 9413-9418; Zanusso et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 8812-8816; Demart et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 265: 652-657), no están disponibles anticuerpos que reconozcan específicamente la PrP<sup>Sc</sup> no desnaturalizada o la PrP 27-30. La inmunización de animales normales o *knock out* para PrP con una amplia variedad de antígenos de PrP incluyendo priones infecciosos, PrP<sup>c</sup> y moléculas de PrP recombinantes y sintéticas replegadas en conformaciones  $\alpha$ -helicoidales o ricas en lámina  $\beta$  ha fracasado de forma repetida en la generación de anticuerpos de alta afinidad que reconozcan exclusivamente formas asociadas a enfermedad de la PrP (Williamson et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 7279-7282; Williamson et al. (1998) J. Virol. 72: 9413-9418; y Peretz et al. (1997) J. Mol. Biol. 273:614-622). Los informes (véase, por ejemplo, Korth et al. (1997) Nature 390: 74-77) de un anticuerpo de este tipo han demostrado ser prematuros (Fischer et al. (2000) Nature 408: 479-483; véase también Heppner et al. (2001) Science 294: 178-182; véase también la solicitud de Estados Unidos en trámite de N° de Serie 09/627.218). Los intentos por evitar la inmunización usando priones infecciosos purificados para seleccionar agentes de unión específicos de grandes bibliotecas de presentación en fago de anticuerpos de cadena sencilla sin tratamiento previo han sido igualmente improductivos.

60 La emergencia de formas variantes de priones, el largo tiempo de incubación para las enfermedades causadas por priones y la posibilidad de una transmisión interespecie señalan la necesidad de desarrollar ensayos para la detección de alimentos y tejidos corporales y fluidos contaminados, así como la necesidad de desarrollar agentes terapéuticos que se dirijan específicamente a formas infecciosas de priones. Por lo tanto, un objeto en la presente memoria es, entre otros objetos, proporcionar reactivos que reaccionen específicamente con priones infecciosos, ensayos de diagnóstico usando dichos reactivos y métodos para preparar reactivos para identificar formas infecciosas y causantes de enfermedad de otras proteínas amiloides y otras proteínas dependientes de

conformación asociadas a enfermedad.

## Sumario

- 5 La presente invención proporciona un polipéptido híbrido, que comprende:
- un motivo polipeptídico de una proteína priónica; y
  - un almacén que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que conserva al menos una porción de la unión específica del anticuerpo de longitud completa, en el que:
    - 10 el motivo polipeptídico comprende al menos los restos 89-105, 89-112, 95-112, 121-131, 121-141, 121-136, 121-144, 121-158, 87-112, 87-118, 87-130, 119-136, 126-158, 131-158, 136-158 ó 141-158 de un polipéptido priónico de hámster sirio que tiene una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 5, o los restos correspondientes de un prion de otra especie;
    - 15 el almacén contiene al menos 10 restos aminoacídicos; y
    - 20 el polipéptido híbrido se une a la forma de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico.
- También se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido híbrido de cualquiera de la invención.
- También se proporciona un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención.
- 25 También se proporciona una célula, que comprende un vector de la invención.
- También se proporciona un método de detección de una forma de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico, que comprende:
- 30 poner en contacto una muestra sospechosa de contener una isoforma infecciosa de un polipéptido priónico con un polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-19; y
  - detectar la unión a cualquier PrP<sup>Sc</sup> en la muestra.
- 35 También se proporciona un soporte sólido que comprende una pluralidad de polipéptidos híbridos de cualquiera de la invención.
- También se proporciona un método de detección de células que contienen una forma de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico, que comprende:
- 40 poner en contacto células de un animal o tejido con un polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el polipéptido híbrido está marcado de forma detectable o comprende un almacén detectable; y
  - 45 detectar las células marcadas *in vitro*.
- Se describen en la presente memoria reactivos que reaccionan específicamente con un polipéptido diana, que es la forma infecciosa de un polipéptido asociado con una enfermedad de la agregación de proteínas (una enfermedad que implica una proteína conformacionalmente alterada), tal como enfermedades amiloides. Se proporcionan moléculas híbridas, tales como los polipéptidos híbridos, con dicha especificidad. Los polipéptidos híbridos incluyen
- 50 un motivo polipeptídico que interacciona específicamente con el polipéptido diana y que se inserta en un almacén, tal como una porción de un anticuerpo o una enzima u otro receptor adecuado, de modo que la molécula híbrida resultante se une específicamente a la conformación de la proteína y no a otra conformación de la proteína. Típicamente, la conformación diana es la conformación implicada en una enfermedad. El motivo polipeptídico se inserta en el almacén de modo que se conserve cualquier función deseada del almacén y que el motivo insertado
  - 55 según se presenta conserve su capacidad para unirse específicamente a la diana. El almacén seleccionado puede aprovecharse por sus actividades o sitios de unión para contribuir a o permitir la detección de complejos entre el motivo y el polipéptido diana. También se proporciona un método para preparar polipéptidos con especificidad de conformación.
- 60 Se describen métodos para producir reactivos para la detección o diagnóstico de enfermedades por proteínas conformacionalmente alteradas y para la exploración para reactivos para el tratamiento de las mismas. Dichas enfermedades incluyen, pero sin limitación, enfermedades priónicas, tales como, pero sin limitación, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, incluyendo variante, esporádica y yatrogénica, tembladera y encefalopatía esponjiforme bovina; enfermedad de Alzheimer, Diabetes de Tipo II (péptido amiloide de islotes); Enfermedad de Huntington; amiloidosis por inmunoglobulinas; amiloidosis reactiva asociada con enfermedad inflamatoria crónica, por ejemplo, artritis
- 65 inflamatoria, enfermedad granulomatosa del intestino, tuberculosis y lepra; amiloidosis sistémica hereditaria

asociada con herencia autosómica dominante del gen de transtiretina variante (también conocida como prealbúmina); ALS; enfermedad de Pick, Enfermedad de Parkinson; demencia frontotemporal; Diabetes de Tipo II; mieloma múltiple; discrasias de células plasmáticas, polineuropatía amiloidótica familiar; carcinoma medular de tiroides; insuficiencia renal crónica; Insuficiencia cardíaca congestiva; amiloidosis cardíaca y sistémica senil; inflamación crónica; aterosclerosis; amiloidosis familiar y otras enfermedades de este tipo.

Los polipéptidos híbridos pueden usarse como reactivos para detectar la presencia del polipéptido diana en una muestra, tal como un fluido corporal, tejido u órgano o una preparación derivada de los mismos, y en ensayos de exploración de fármacos para identificar compuestos que antagonicen o agonicen (es decir, modulen) la actividad de un polipéptido diana o que inhiban competitivamente la interacción del mismo con una forma infecciosa o causante de enfermedad de un polipéptido diana, tal como PrP<sup>Sc</sup>. Las moléculas híbridas también pueden usarse como agentes terapéuticos. Puesto que se unen específicamente a un polipéptido diana, pueden usarse para inhibir su actividad, tal como previniendo o reduciendo la infectividad o la actividad que da como resultado la agregación de proteínas o el cambio de conformación que conduce a un efecto perjudicial. Por ejemplo, como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades de la agregación de proteínas un polipéptido híbrido puede interrumpir la característica de polimerización o agregación de la patogénesis de la enfermedad.

En una realización ejemplar, se describen polipéptidos híbridos que reaccionan específicamente con la forma infecciosa de un prión (PrP<sup>Sc</sup>). Se describen polipéptidos con motivos injertados que se unen específicamente a conformaciones asociadas a enfermedad de la PrP. En realizaciones ejemplares, se usaron una serie de polipéptidos que contenían la secuencia de PrP entre los restos 119-158 (usando la nomenclatura del hámster sirio) para sustituir la región determinante de complementariedad 3 de cadena pesada prolongada (HCDR3) de un Fab de anticuerpo IgG específico para la glicoproteína de la envuelta del VIH-1 (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.652.138, que proporciona el anticuerpo). Los fragmentos de PrP-Fab obtenidos por ingeniería genética resultantes (o moléculas de PrP-IgG) se unen específicamente a PrP<sup>Sc</sup> y a su núcleo resistente a proteasas, pero no a la PrP<sup>C</sup>, a otros componentes celulares o la envuelta del VIH-1. Los restos dentro del segmento de 119-158, tales como los restos 89-112 y 136-158 de la PrP<sup>C</sup>, son un componente clave de una cara del complejo de PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>. Se observó que la desordenación de los restos 136-158 suprime la reactividad.

Pueden usarse moléculas injertadas, tales como los polipéptidos específicos de PrP<sup>Sc</sup> ejemplificados en la presente memoria, y otras moléculas producidas por la estrategia descrita en la presente memoria para estudiar la biología de dichas moléculas, así como para el desarrollo de agentes de diagnóstico y terapéuticos. Por ejemplo, pueden usarse polipéptidos que son específicos para priones de PrP<sup>Sc</sup> no desnaturalizada que se describen y descritos en la presente memoria en el estudio de la biología y la replicación y en la detección de priones infecciosos en materiales humanos y animales.

Se describen métodos para identificar polipéptidos causantes de o relacionados con enfermedad, o para ensayar para infección o contaminación por dichas partículas o complejos de dichas partículas. Los métodos se efectúan por contacto de un polipéptido híbrido reactivo proporcionado en la presente memoria con una muestra a ensayar y detección o identificación de los complejos formados entre el polipéptido híbrido reactivo y la partícula o complejo en la muestra, que es indicativa de la presencia de un agente infeccioso. Los métodos pueden realizarse como ensayos homogéneos o heterogéneos. En los ensayos heterogéneos, los reactivos pueden conectarse o unirse directa o indirectamente a un soporte sólido y ponerse en contacto con una muestra. Como alternativa, la muestra o los componentes de la muestra pueden unirse a un soporte y ponerse en contacto con los reactivos. Se identifican complejos entre los reactivos y moléculas de interés en la muestra. Los reactivos pueden diseñarse para incluir además un segundo sitio de unión para permitir una identificación conveniente, tal como por unión de un segundo resto detectable.

En una realización ejemplar, se describen métodos para la detección de PrP<sup>Sc</sup> en una muestra, tal como un fluido corporal, tejido u órgano de un animal. Los métodos se efectúan en fase de solución o proporcionando los reactivos o la muestra unidos directa o indirectamente a un soporte sólido. Se detectan complejos entre los reactivos proporcionados en la presente memoria y los polipéptidos diana en la muestra.

También se describen métodos para identificar células individuales que contienen o expresan un conformero infeccioso o causante de enfermedad de un polipéptido implicado en una enfermedad de la agregación de proteínas, tales como células infectadas por priones en un fondo de células no infectas. Este método se efectúa por contacto de las células, tales como células sanguíneas, con un polipéptido marcado de forma detectable descrito en la presente memoria que se une específicamente al conformero infeccioso o causante de enfermedad, y detección de las células marcadas. Por ejemplo, un método para detectar células infectadas por priones, incluso células presentes en pequeñas cantidades (a una frecuencia típicamente inferior a 1:10.000) usando un polipéptido híbrido, o una pluralidad de los mismos, proporcionado en la presente memoria que se une a PrP<sup>Sc</sup> no desnaturalizada y que está marcado de forma detectable, tal como marcado fluorescentemente, y detectar células que contienen el polipéptido marcado, tal como por métodos de citometría de barrido para la detección de acontecimientos poco frecuentes. Este método puede efectuarse por métodos de citometría conocidos (véase, por ejemplo, Bajaj et al. (2000) Cytometry 39: 285-294) e instrumentos para los mismos (véase, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos de N° de Serie 09/123564, publicada como documento US2002018674 y comercializada por Q3DM, LLC, San Diego). Pueden

detectarse concentraciones muy pequeñas de células infectadas por dichos métodos.

También se describen combinaciones de los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria y soportes sólidos. Las combinaciones pueden proporcionarse como kits que opcionalmente incluyen instrucciones para realizar ensayos para la detección de polipéptidos diana.

También se describen anticuerpos anti-idiotipo (monoclonales o policlonales) que se producen por inmunización de un animal adecuado con un polipéptido o anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce la región de aproximadamente 89-112 y/o 136-158 de la PrP, tal como los fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal D13 (véase, por ejemplo, Matsunaga et al. (2001) *Proteins* 44: 110-118; véase, Williamson et al. (1998) *J. Virol.* 72: 9413-9418; cadena ligera de D13, véanse las SEC ID N°: 29 y 30; cadena pesada de D13, véanse las SEC ID N°: 31 y 32); o D18 (véase, por ejemplo, Peretz et al. (2001) *Nature* 412: 739-743; Williamson et al. (1998) *J. Virol.* 72: 9413-9418; cadena ligera de D18, véanse las SEC ID N°: 33 y 34; cadena pesada de D18, véanse las SEC ID N°: 35 y 36) u otros anticuerpos inhibidores. Los anticuerpos anti-idiotipo generados contra los sitios de combinación de anticuerpos o Fab inhibidores, tales como D18 o D13, pueden generar anticuerpos que reconocen la PrP<sup>Sc</sup> nativa. Dichos anticuerpos anti-idiotipo pueden usarse en todos los métodos de diagnóstico, pronóstico, terapéuticos y de exploración en que se usan los polipéptidos híbridos también descritos en la presente memoria. También se describen métodos para preparar dichos anticuerpos anti-idiotipo por inmunización con un polipéptido o anticuerpo o fragmento del mismo que reconoce la región de aproximadamente 89-112 y/o 136-158 de la PrP, tal como fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal D13 o D18 (para la cadena ligera de D13 véanse las SEC ID N°: 29 y 30; para la cadena pesada de D13 véanse las SEC ID N°: 31 y 32; para la cadena ligera de D18 véanse las SEC ID N°: 33 y 34, para la cadena pesada de D18, véanse las SEC ID N°: 35 y 36).

#### Descripción de los dibujos

Las FIGURAS 1 presentan A) una ilustración esquemática de péptido Prp 89-112, Prp 136-258 y PrP 121-158 de ratón sustituyendo la secuencia de HCDR3 de Fab b12 para dar PrP-Fab 121-158. El resto de Val N-terminal y los 4 restos C-terminales (Tyr-Met-Asp-Val) de la HCDR3 de b12 original se conservan; se añaden dos restos Gly a cada flanco de la secuencia de PrP injertada; y B) una estructura modelada de Fab 121-158 generada por injerto de la estructura de NMR de la PrP 124-158 de ratón (Riek et al. (1997) *FEBS Lett.* 413: 282-288) en la estructura cristalina de IgG1 b12 (Ollmann Saphire et al. (2001) *Science* 293:1155). Las coordenadas para los restos de PrP 121-123 y los enlazadores GG se modelaron y refinaron usando TOM/FRODO (Jones (1982) en *Computational Crystallography* (Sayre, D., ed.), págs. 303 Oxford University Press)). Para aliviar posibles conflictos estéricos con la cadena pesada de b12, se introdujeron pequeñas variaciones en los ángulos de torsión de los restos de PrP 130-134. Un anticuerpo, denominado Fab D18 (descrito por Williamson et al. (1998) *J. Virol.* 72: 9413-9418; véanse las SEC ID N°: 33-36), que reconoce la región 133-157 de la PrP solamente en presencia de la hélice  $\alpha$  (restos 145-155), se une bien a PrP-Fab 121-158, indicando que el péptido de PrP presentado asume una conformación de tipo PrP<sup>C</sup> en al menos una fracción de las moléculas de Fab 121-158 purificadas. Como se ha señalado, la numeración de los restos corresponde a la PrP de hámster sirio (SEC ID N°: 5); la PrP de ratón se expone en la SEC ID N°: 9; 89-112 corresponde a 88-111 de la SEC ID N°: 9 de ratón; 136-158 corresponde a 135-157 de la SEC ID N°: 9 y 121-158 corresponde a 120-157 de la SEC ID N°: 9.

La FIGURA 3 muestra la medición densitométrica de las bandas de PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30 identificadas en una inmunotransferencia que se muestra en función de la concentración, demostrando la alta afinidad de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria por PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30 ( $K_d$  del orden de aproximadamente  $10^{-9}$  mol/l;  $K_a$  del orden de  $10^9$  mol/l); los valores se proporcionan como unidades densitométricas (UD) en las que el 100% es equivalente a la intensidad de las bandas inmunoprecipitadas a una concentración de anticuerpo de 10  $\mu$ g/ml.

La FIGURA 2 presenta el alineamiento de secuencias ejemplares con hámster sirio dorado (parte superior); las referencias a posiciones de aminoácidos se refieren a los números de restos del hámster sirio. La numeración es secuencial de la parte superior a la parte inferior. Las SEC ID N° son las siguientes:

- SEC ID N°: 5 Hámster sirio
- SEC ID N°: 6 Hámster armenio
- SEC ID N°: 7 Hámster chino
- SEC ID N°: 8 Homo sapiens
- SEC ID N°: 9 Ratón tipo A
- SEC ID N°: 10 Ratón tipo B
- SEC ID N°: 11 Oveja
- SEC ID N°: 12, que no está representada en la Figura es la variante R171Q de oveja
- SEC ID N°: 13 Bovino

**Descripción detallada**

- A. Definiciones
- B. Moléculas híbridas

- 5
- 1. Polipéptidos relacionados con enfermedad
    - a. Priones
      - 10 1) Priones y enfermedades priónicas
      - 2) Polipéptidos híbridos que contienen priones
      - 3) Fuentes de priones
      - 4) Mutaciones
    - 15 b. Otros polipéptidos
    - c. Preparación de polipéptidos híbridos
  - 2. Armazones
    - 20 a. Anticuerpos
    - b. Otras moléculas
  - 3. Híbridos ejemplares
- 25 C. Moléculas de ácido nucleico, vectores, plásmidos, células y métodos para la preparación de los polipéptidos híbridos. Plásmidos, vectores y células.
- D. Peptidomiméticos
- E. Agentes de diagnóstico, terapéuticos, ensayos y otros usos de los polipéptidos híbridos
- 30 1. Agentes de diagnóstico y terapéuticos
- 2. Ensayos de exploración de fármacos**
- 3. Inmovilización y soportes o sustratos para los mismos**
- 4. Preparación de priones normalizada**
- 35 **F. Combinaciones y kits**
- G. Ejemplos**

**A. DEFINICIONES**

40 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención o invenciones. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para los términos de la presente memoria, prevalecen aquellos en esta sección. Cuando se hace referencia a una URL u otro identificador o dirección de este tipo, se entiende que dichos identificadores pueden cambiar y que la información particular en internet puede ir y venir, pero puede encontrarse información equivalente buscando en internet. La referencia a las mismas pone de manifiesto la disponibilidad y diseminación pública de dicha información.

50 Como se usa en la presente memoria, se hace referencia a restos de aminoácidos en la PrP con referencia a la secuencia del hámster sirio (véase la Fig. 2). La secuencia de interés en otra especie puede identificarse entonces por alineamiento de la secuencia (véase, por ejemplo, la Figura 2) e identificación de los restos correspondientes. La Figura 2 proporciona un alineamiento ejemplar. Esta nomenclatura se entiende comúnmente por los expertos en la materia.

55 Como se usa en la presente memoria, un gen de prión es cualquier gen de cualquier especie que codifique cualquier forma de una proteína priónica (PrP<sup>c</sup>).

60 Como se usa en la presente memoria, la referencia a PrP 90-231 se refiere a la porción de PrP que queda después de que la PrP<sup>Sc</sup> (compuesta por los restos 23-231) se digiera parcialmente con proteinasa K, lo que produce PrP 27-30 (que corresponde aproximadamente a los restos 90-231). Puesto que las preparaciones de PrP 27-30 conservan la infectividad del prión, la secuencia 90-231 en la conformación de la PrP<sup>Sc</sup> se considera el núcleo infeccioso de la PrP. El componente principal de los priones infecciosos purificados, denominado PrP 27-30, es el núcleo resistente a proteinasa K de una proteína nativa de mayor tamaño PrP<sup>Sc</sup>, que es la forma causante de enfermedad de la proteína células ubicua PrP<sup>c</sup>. La PrP<sup>Sc</sup> se encuentra solamente en células infectadas por tembladera; mientras que la PrP<sup>c</sup> está presente en células infectadas y no infectadas, implicando a la PrP<sup>Sc</sup> como el componente principal, si no el

65 único de las partículas priónicas infecciosas. Las propiedades que distinguen a la PrP<sup>Sc</sup> de la PrP<sup>c</sup> incluyen baja solubilidad, escasa antigenicidad, resistencia a proteasas y polimerización de PrP 27-30 en agregados en forma de

bacilo que son muy similares, a nivel ultraestructural e histoquímico, a las placas amiloides de PrP observadas en cerebros enfermos de tembladera. Usando la proteinasa K es posible desnaturalizar la PrP<sup>c</sup>, pero no la PrP<sup>Sc</sup>. La PrP<sup>c</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> son isómeros conformacionales de la misma molécula.

5 Como se usa en la presente memoria, la replicación de priones se refiere al proceso en el que la PrP<sup>c</sup> se convierte en PrP<sup>Sc</sup>. La unión de PrP<sup>c</sup> a PrP<sup>Sc</sup> es un requisito indispensable en la ruta por la que la PrP<sup>c</sup> se reorganiza conformacionalmente en una molécula de PrP<sup>Sc</sup>.

10 Como se usa en la presente memoria, una interfaz de replicación de prión es la región de la PrP<sup>c</sup> que se une a la PrP<sup>Sc</sup> en el transcurso de la replicación de priones.

15 Como se usa en la presente memoria, un prión incluye todas las formas de priones que causan todas o cualquiera de las enfermedades causadas por priones en cualquier animal, particularmente en seres humanos y en animales de granja domesticados, ungulados, ciervos y alces. Se contemplan priones de cualquier especie de animal que esté infectada por priones o presente enfermedades priónicas o enfermedades similares para su uso en la preparación de reactivos y como dianas para la detección y exploración de fármacos. Los animales incluyen ungulados, primates, roedores y marsupiales. Las especies incluyen, pero sin limitación, seres humanos, hámsteres, ratones, ratas, ciervos, ovejas, cabras, alces, kudú, caballos, camellos, llamas, cerdos, marsupiales y otras especies en las que las infecciones por priones sean de interés o preocupación. Existen varias variantes conocidas para el gen de la PrP humana. Además, existen polimorfismos conocidos en dichos genes, incluyendo en los genes de PrP humana, ovina y bovina.

25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "péptido de PrP" es cualquier péptido que, cuando se pone en contacto con una variante de PrP o PrP<sup>Sc</sup> recombinante o de origen natural, da como resultado la inducción de un cambio conformacional que se identifica por la presencia de una formación de lámina β aumentada, una insolubilidad aumentada y/o una resistencia a proteasas aumentada, es decir, propiedades y características de PrP<sup>Sc</sup>. Por lo tanto, la referencia a un péptido de PrP significará un polipéptido de origen natural, recombinante o sintético que tiene una secuencia sustancialmente similar (por ejemplo, una homología del 70%, 80%, 85%, 90% o superior) con una porción de una secuencia de proteína priónica de origen natural que incluye los restos que corresponden a 90-231 (SEC ID N°: 5), o una porción de la misma, tal como 90-145, 121-158 u otra porción, y capaz de unirse a PrP<sup>Sc</sup>, de modo que una proteína priónica forma un complejo para producir un polipéptido que tiene una o más de las características de la PrP<sup>Sc</sup>. Un péptido de PrP tiene al menos un dominio α-helicoidal y/o tiene una conformación de enrollamiento aleatorio en una solución acuosa. Además, el péptido de PrP puede caracterizarse por tener una conformación en solución acuosa que esté sustancialmente desprovista de conformación de lámina β. La conformación de un péptido de PrP puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo dicroísmo circular (CD).

40 Un péptido de PrP tiene típicamente entre 1-4 dominios α-helicoidales y se une a PrP<sup>Sc</sup> para formar un complejo de proteína priónica. El péptido de PrP tiene la secuencia de aminoácidos de cualquier especie, tal como las expuestas en cualquiera de las SEC ID N°: 5-13. El péptido de PrP puede incluir modificaciones de la secuencia de aminoácidos tales como, por ejemplo, pero sin limitación, uno o más cambios de aminoácidos, una o más deleciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos, siempre que conserve las características de tener al menos un dominio α-helicoidal y/o una conformación de enrollamiento aleatorio en una solución acuosa, y lo que es más importante, se una a PrP<sup>Sc</sup> para formar un complejo de proteína priónica. Como se muestra en la presente memoria, sin embargo no es necesario un dominio α-helicoidal. Los cambios, deleciones, inserciones y otras modificaciones están generalmente en la secuencia entre los aminoácidos 90-145, pero también incluye 89-112. Por ejemplo, el péptido de PrP 90-145 (A117V) contiene la mutación patógena en el resto aminoacídico 117 (alanina a valina) que causa las formas telencefálica y atáxica de la enfermedad de GSS.

50 Como se usa en la presente memoria, una enfermedad por proteína conformacionalmente alterada (una enfermedad de la agregación de proteínas o una enfermedad de la conformación de proteínas) se refiere a enfermedades asociadas con una proteína o polipéptido que tiene una conformación asociada a enfermedad. La conformación de proteína anormal incluyendo, por ejemplo, el plegamiento erróneo y la agregación, puede conducir a una pérdida o alteración de su actividad biológica. La conformación de proteína anormal, incluyendo el plegamiento erróneo y la agregación, es un agente causal (o agente de contribución) en varias enfermedades de mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, fibrosis quística, enfermedad de Alzheimer, encefalopatías espongiiformes por priones tales como encefalopatía espongiiforme bovina, tembladera de las ovejas, Kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob de seres humanos, incluyendo variante, esporádica y yatrogénica, y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (véase la Tabla a continuación). Dichas enfermedades y proteínas asociadas que ensamblan dos o más conformaciones diferentes en las que al menos una conformación es una proteína conformacionalmente alterada, incluyen aquellas expuestas en la Tabla 1 siguiente:



TABLA 1

Enfermedad	Proteína insoluble
Enfermedad de Alzheimer (AD)	APP, A $\beta$ , $\alpha$ 1-antiquimotripsina, tau, componente no A $\beta$ , presenilina 1, presenilina 2, apoE
Enfermedades por priones, incluyendo pero sin limitación enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, tembladera, encefalopatía espongiforme bovina	PrP <sup>Sc</sup>
Esclerosis lateral amiotrófica (ALS)	superóxido dismutasa (SOD) y neurofilamento
Enfermedad de Pick	cuerpo de Pick
Enfermedad de Parkinson	$\alpha$ -sinucleína en cuerpos de Lewy
Demencia frontotemporal	tau en fibrillas
Diabetes tipo II	amilina
Mieloma múltiple	cadena de IgGL
Discrasias de células plasmáticas	
Polineuropatía amiloidótica familiar	Transtiretina
Carcinoma medular de tiroides	Procalcitonina
Insuficiencia renal crónica	$\beta$ <sub>2</sub> -microglobulina
Insuficiencia cardiaca congestiva	Factor natriurético auricular
Amiloidosis cardiaca y sistémica senil	transtiretina
Inflamación crónica	Amiloide A del suero
Aterosclerosis	ApoAI
Amiloidosis familiar	Gelsolina
Enfermedad de Huntington	Huntington

Los métodos ejemplificados en la presente memoria para la preparación de una molécula híbrida que se une específicamente a la conformación asociada a enfermedad de un polipéptido priónico pueden usarse para preparar moléculas híbridas específicas para conformaciones asociadas a enfermedad de polipéptidos asociados con otras enfermedades por proteínas conformacionalmente alteradas, tales como otras enfermedades amiloides.

Como se usa en la presente memoria, un conformero benigno se refiere a una forma de una proteína de una enfermedad de agregación o conformación de proteínas que no está implicada con la enfermedad, es decir, que no causa la enfermedad o los síntomas de la misma.

Como se usa en la presente memoria, una matriz se refiere a una colección de elementos, tales como anticuerpos, que contienen tres o más miembros. Una matriz abordable es una en la que los miembros de la matriz son identificables, típicamente por su posición en un soporte en fase sólida. Por lo tanto, en general, los miembros de la matriz están inmovilizados en loci identificables separados en la superficie de una fase sólida.

Como se usa en la presente memoria, una proteína diana se refiere a una proteína que tiene una pluralidad de conformeros y está implicada o asociada con una enfermedad de agregación o conformación de proteínas.

Como se usa en la presente memoria, un soporte (también denominado un soporte de matriz, una matriz, un soporte insoluble o soporte sólido) se refiere a cualquier soporte sólido o semisólido o insoluble al que se une o con el que contacta una molécula de interés, tal como moléculas híbridas proporcionadas en la presente memoria. Dichos materiales incluyen cualquier material que se use como matrices de afinidad o soportes para síntesis y análisis de moléculas químicas y biológicas tales como, pero sin limitación: poliestireno, policarbonato, polipropileno, nylon, vidrio, dextrano, quitina, arena, piedra pómez, agarosa, polisacáridos, dendrímeros, buckybolos, poliácridamida, silicio, goma y otros materiales usados como soportes para síntesis en fase sólida, separaciones por afinidad y purificaciones, reacciones de hibridación, inmunoensayos y otras aplicaciones de este tipo. La matriz en la presente memoria puede ser particulada o puede estar en forma de una superficie continua, tal como una placa de microtitulación o pocillo, un portaobjetos de vidrio, una microplaca de silicio, una lámina de nitrocelulosa, una malla de nylon u otros materiales de este tipo. Cuando está particulada, típicamente las partículas tienen al menos una dimensión en el intervalo de 5-10  $\mu$ m o más pequeña. Dichas partículas, denominadas en su conjunto en la presente memoria "perlas", son con frecuencia, pero no necesariamente, esféricas. Dicha referencia, sin embargo, no limita la geometría de la matriz, que puede tener cualquier forma, incluyendo formas aleatorias, agujas, fibras y alargadas. También se contemplan "perlas" aproximadamente esféricas, particularmente microesferas que pueden usarse en la fase líquida. Las "perlas" pueden incluir componente adicionales, tales como partículas magnéticas o paramagnéticas (véase, por ejemplo, Dyna beads (DynaL, Oslo, Noruega)) para la separación usando imanes, siempre que los componentes adicionales no interfieran con los métodos y análisis de la presente memoria.

Como se usan en la presente memoria, las partículas de matriz o soporte se refieren a materiales de matriz que están en forma de partículas separadas. Las partículas tienen cualquier forma y dimensiones, pero típicamente tienen al menos una dimensión que es de 100  $\mu$ m o menos, 50  $\mu$ m o menos, 10  $\mu$ m o menos, 1  $\mu$ m o menos, 100  $\mu$ m o menos, 50  $\mu$ m o menos y, típicamente, tienen un tamaño que es de 100  $\mu$ m<sup>3</sup> o menos, 50  $\mu$ m<sup>3</sup> o menos, 10

mm<sup>3</sup> o menos y 1 mm<sup>3</sup> o menos, 100 μm<sup>3</sup> o menos y pueden ser del orden de micrómetros cúbicos. Dichas partículas se denominan en su conjunto "perlas".

5 Como se usa en la presente memoria, una matriz se refiere a una colección de elementos, tal como los polipéptidos híbridos, que contiene tres o más miembros. Una matriz abordable es una en la que los miembros de la matriz son identificables, típicamente por su posición en un soporte en fase sólida o en virtud de un marcador identificable o detectable, tal como mediante color, fluorescencia, señal electrónica (es decir, RF, microondas u otra frecuencia que no altere sustancialmente la interacción de las moléculas o partículas biológicas), código de barras u otra simbología, marcador químico o de otro tipo. Por lo tanto, en general, los miembros de la matriz se inmovilizan en loci identificables separados en la superficie de una fase sólida, o directa o indirectamente unidos o asociados de otro modo con el marcador identificable, tal como fijados a una microesfera u otro soporte particulado (denominado en la presente memoria como perlas) y suspendidos en solución o extendidos sobre una superficie. Por lo tanto, por ejemplo, las matrices posicionalmente abordables pueden disponerse sobre un sustrato, tal como vidrio, incluyendo portaobjetos de microscopio, papel, nylon o cualquier otro tipo de membrana, filtro, microplaca, portaobjetos de vidrio o cualquier otro soporte sólido adecuado. Si es necesario la superficie del sustrato se funcionaliza, derivatiza o se vuelve de otro modo capaz de unirse a un compañero de unión. En algunos casos, los expertos en la materia se refieren a micromatrices. Una micromatriz es una matriz posicionalmente abordable, tal como una matriz en un soporte sólido, en la que los loci de la matriz están a alta intensidad. Por ejemplo, una matriz típica formada en una superficie del tamaño de una de 96 convencional con una densidad de más de aproximadamente 1550 loci por placa se consideran micromatrices. En ensayos proporcionados en la presente memoria en los que las moléculas se unen a un soporte sólido pueden proporcionarse como matrices, incluyendo matrices abordables, particularmente para protocolos de exploración de alto rendimiento.

25 Como se usa en la presente memoria, una molécula que se une específicamente a un polipéptido tiene típicamente una afinidad de unión ( $K_a$ ) de al menos aproximadamente 10<sup>7</sup> l/mol, 10<sup>8</sup> l/mol, 10<sup>9</sup> l/mol, 10<sup>10</sup> l/mol o más y se une a un conformero particular de un polipéptido en comparación con otro conformero con una  $K_a$  que es de al menos aproximadamente 0,5, 1, 5, 10 veces, en general 100 veces o más. Por lo tanto, por ejemplo, las moléculas híbridas ejemplificadas que se unen a PrP<sup>Sc</sup> interactúan con una afinidad de al menos aproximadamente 10<sup>8</sup> l/mol o con una afinidad suficiente para permitir la detección de PrP<sup>Sc</sup> unida en un ensayo para la misma; y generalmente interactúan con PrP<sup>Sc</sup> con una afinidad de al menos 10 veces, 100 veces o más que con PrP<sup>Sc</sup>.

35 Como se usa en la presente memoria, los animales incluyen cualquier animal, tal como, pero sin limitación, cabras, vacas, ciervo, alce, kudú, caballos, camellos, llamas, ovejas, roedores, cerdos y seres humanos. Los animales no humanos excluyen los seres humanos como el animal contemplado.

40 Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina, ya sea natural o parcialmente o totalmente sintéticamente producida, incluyendo cualquier derivado de la misma que conserve la capacidad de unión específica del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión a inmunoglobulina. Los anticuerpos incluyen miembros de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

45 Como se usa en la presente memoria, un polipéptido híbrido se refiere a un polipéptido que incluye regiones de al menos dos fuentes, tal como de un anticuerpo o enzima u otro armazón que puede ser un destinatario y un motivo de unión, tal como polipéptido de una proteína priónica. Los polipéptidos híbridos resultantes proporcionados en la presente memoria se unen a la conformación infecciosa o a la conformación indicativa de enfermedad de un polipéptido que existe en más de una isoforma, donde al menos una isoforma está implicada en una enfermedad o proceso patológico. El armazón destinatario se selecciona para limitar o permitir que el polipéptido de motivo conserve su capacidad para unirse al polipéptido diana. El armazón destinatario también puede conferir propiedades adicionales al polipéptido híbrido, tal como la capacidad para actuar como indicador o para capturar un resto indicador. La unión a priones infecciosos en realizaciones de la presente memoria se obtiene como resultado de la inclusión de un motivo, un polipéptido que contiene al menos 5 restos, generalmente 10 a 50 o más restos hasta sustancialmente un prión de longitud completa, de un prión y que es capaz de unirse a una PrP<sup>Sc</sup> o PrP<sup>Sc</sup> que está formando un complejo con una PrP<sup>C</sup>.

55 Como se usa en la presente memoria, un motivo polipeptídico se refiere a una secuencia de aminoácidos que procede de una proteína que reconoce una conformación alterada, generalmente anormal (es decir, causante de enfermedad) y conserva la especificidad, aunque la afinidad puede reducirse, de la proteína completa. La proteína con la conformación alterada puede ser transmisible, tal como la forma de PrP<sup>Sc</sup> del prión. El motivo polipeptídico se injerta (es decir, se inserta) en un armazón (típicamente un polipéptido). Como se muestra en la presente memoria, el motivo puede proceder de restos del polipéptido diana que estén implicados en la reacción de agregación o que induzcan o estén implicados en el cambio de conformación. Tras la inserción, pueden incluirse aminoácidos adicionales, tales como aminoácidos neutros, incluyendo Gly y/o Ser, típicamente de uno a unos cuantos restos en cualquier extremo. El motivo puede insertarse en otro polipéptido o puede sustituir a una porción del mismo que sea de mayor tamaño, de menor tamaño o de aproximadamente el mismo tamaño que el motivo.

65

Como se usa en la presente memoria, un armazón se refiere a una molécula destinataria para recibir el motivo injertado. El armazón se selecciona de modo que el motivo injertado conserva su actividad deseada. El armazón puede poseer actividad, tal como afinidad de unión o actividad enzimática, o puede no tener actividad o estar modificado para eliminar una actividad. Los armazones incluyen, pero sin limitación, enzimas o porciones de los mismos que conservan la actividad de unión y/o catalítica, proteínas fluorescentes o porciones de las mismas que conservan su actividad y/o que permiten que la porción injertada conserve su actividad, y/o que permiten que la porción injertada conserve su actividad, anticuerpos o porciones de los mismos que conservan su actividad de unión y/o que permiten que la porción injertada conserve la actividad deseada. El armazón se proporciona para injertar en un motivo polipeptídico que se une a un epítipo en una forma infecciosa o causante de enfermedad de un agente de una enfermedad de la agregación de proteínas para producir una molécula híbrida que se une con mayor afinidad a una forma infecciosa o causante de enfermedad de un agente de una enfermedad de la agregación de proteínas que a una forma benigna (o viceversa).

Como se usa en la presente memoria, "indicador" o "resto indicador" se refiere a cualquier resto que permite la detección de una molécula de interés, tal como una proteína o los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria. Una molécula indicadora se refiere a una molécula, tal como una enzima o indicador, que es capaz de generar una señal detectable (por ejemplo, por medios colorimétricos, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes o potenciométricos) cuando se pone en contacto con un sustrato o medio de detección adecuado en condiciones apropiadas. Las enzimas indicadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina, luciferasa y fotoproteínas, tales como luciferasas/fotoproteínas de especies de aequora y renilla, luciferasa de luciérnaga (deWet et al. (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 725-737); luciferasa bacteriana (Engelbrecht y Silverman (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 4154-4158; Baldwin et al. (1984) Biochemistry 23: 3663-3667); otras enzimas tales como beta-galactosidasa; fosfatasa alcalina (Toh et al. (1989) Eur. J. Biochem. 182: 231-238, Hall et al. (1983) J. Mol. Appl. Gen. 2: 101); generadores de quimioluminiscencia, tales como peroxidasa de rábano picante, aril esterasa, sulfatasa y ureasa. Otros restos indicadores incluyen, por ejemplo, restos luminiscentes, tales como proteínas fluorescentes (FP), incluyendo, pero sin limitación, proteínas fluorescentes rojas, azules y verdes y variantes de las mismas.

Como se usa en la presente memoria, un marcador luminiscente es un marcador que emite o absorbe radiación EM. Los marcadores de luminiscencia ejemplares incluyen, pero sin limitación, fluoróforos, incluyendo proteínas fluorescentes, inactivadores de fluorescencia y bioluminiscencia y otros sistemas generadores de quimioluminiscencia.

Como se usa en la presente memoria, el término "fluorescencia" se refiere a luminiscencia (emisión de luz) que está causada por la absorción de radiación a una longitud de onda ("excitación"), seguida de re-radiación casi inmediata ("emisión"), habitualmente a una longitud de onda diferente, que cesa casi inmediatamente cuando para la radiación incidente. A nivel molecular, la fluorescencia se produce a medida que ciertos compuestos, conocidos como fluoróforos, se llevan de un estado fundamental a un estado superior de excitación por energía luminosa; a medida que las moléculas vuelven a su estado fundamental, emiten luz, típicamente a una longitud de onda diferente (Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Nueva York: Plenum Press (1983); Herman, B., Resonance energy transfer microscopy, en: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, ed. Taylor, D. L. & Wang, Y. -L., San Diego: Academic Press (1989), págs. 219-243; Turro, N.J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Col, Inc. (1978), págs. 296-361). Por lo contrario, la "fosforescencia" se refiere a una luminiscencia que está causada por la absorción de radiación a una longitud de onda seguida por una re-radiación retardada que se produce a una longitud de onda diferente y continúa durante un tiempo perceptible después de que pare la radiación incidente.

Como se usa en la presente memoria, el término quimioluminiscencia se refiere a la luminiscencia que se obtiene como resultado de una reacción química.

Como se usa en la presente memoria, el término bioluminiscencia, que es un tipo de quimioluminiscencia, se refiere a la emisión de luz por moléculas biológicas, particularmente proteínas. La condición esencial para la bioluminiscencia es oxígeno molecular, unido o libre en presencia de una oxigenasa, una luciferasa, que actúa sobre un sustrato, una luciferina. La bioluminiscencia se genera por una enzima u otra proteína (luciferasa) que es una oxigenasa que actúa sobre una luciferina de sustrato (un sustrato de bioluminiscencia) en presencia de oxígeno molecular y transforma el sustrato en un estado excitado, que tras la vuelta a un menor nivel de energía libera la energía en forma de luz.

Como se usa en la presente memoria, las biomoléculas para producir bioluminiscencia se denominan en general luciferina y luciferasa, respectivamente. Cuando se hace referencia a una especie particular de las mismas, por claridad, cada término genérico se usa con el nombre del organismo del que procede, por ejemplo, luciferina bacteriana o luciferasa de luciérnaga.

Como se usa en la presente memoria, la luciferasa se refiere a oxigenasas que catalizan una reacción de emisión de luz. Por ejemplo, las luciferasas bacterianas catalizan la oxidación del mononucleótido de flavina (FMN) y aldehídos alifáticos, produciendo dicha reacción luz. Otras clases de luciferasas que se encuentran entre los artrópodos marinos catalizan la oxidación de luciferina de *Cypridina* (*Vargula*), y otra clase de luciferasas cataliza la oxidación

de luciferina de *Coleoptera*.

Por lo tanto, la luciferasa se refiere a una enzima o fotoproteína que cataliza una reacción bioluminiscente (una reacción que produce bioluminiscencia). Las luciferasas, tales como luciferasas de luciérnaga y *Gaussia* y *Renilla*, que son enzimas que actúan catalíticamente y permanecen sin cambios durante la reacción de generación de bioluminiscencia. Las fotoproteínas de luciferasa, tales como la fotoproteína de aequorina con la que se une no covalentemente la luciferina, se cambian, tal como por liberación de la luciferina, durante la reacción de generación de bioluminiscencia. La luciferasa es una proteína que se produce de forma natural de un organismo, o una variante o mutante de la misma, tal como una variante producida por mutagénesis que tiene una o más propiedades, tal como estabilidad térmica, que difieren de la proteína de origen natural. Son bien conocidas luciferasas y formas mutantes o variantes modificadas de las mismas. Para los fines de la presente memoria, la referencia a luciferasa se refiere a las fotoproteínas o luciferasas. Las luciferasas pueden servir como armazones para injertar un polipéptido que se une a un epítipo en una forma infecciosa o causante de enfermedad de un agente de una enfermedad de la agregación de proteínas para producir una molécula híbrida que se una con mayor afinidad a una forma infecciosa o causante de enfermedad de un agente de una enfermedad de la agregación de proteínas que a una forma benigna (o viceversa).

Las luciferasas y la luciferina, y activadores de las mismas, se denominan reactivos o componentes generadores de bioluminiscencia. Por lo tanto, como se usa en la presente memoria, el componente luciferasas, luciferinas y otros factores, tales como  $O_2$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  también se denominan reactivos (o agentes o componentes) de generación de bioluminiscencia. La combinación de todos dichos componentes es un sistema generador de bioluminiscencia. De forma similar, todos los componentes de un sistema para generar quimioluminiscencia son un sistema de generación de quimioluminiscencia.

Como se usa en la presente memoria, un anticuerpo híbrido se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que incluye una porción o porciones no derivadas de inmunoglobulina, tal como los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria en los que una porción de una inmunoglobulina o Fab se sustituye con otro polipéptido que se une a un polipéptido diana implicado en una enfermedad de la agregación de proteínas. Por comodidad en la presente memoria las moléculas híbridas se denominan Fab o inmunoglobulina, tal como una IgG, pero se entiende que dichas moléculas híbridas no son Fab o Ig de por sí, sino que incluyen porciones injertadas que confieren especificidad.

Como se usa en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que es de menos que la longitud completa, que conserva al menos una porción de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, Fv de cadena sencilla (scFv), Fv, diacuerpo dsFv y Fd. El fragmento puede incluir múltiples cadenas unidas entre sí tal como por puentes disulfuro. Un fragmento de anticuerpo contiene generalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos y, típicamente, al menos 200 aminoácidos.

Como se usa en la presente memoria, un fragmento de anticuerpo Fv está compuesto por un dominio pesado variable (V<sub>H</sub>) y un dominio ligero variable unido por interacciones no covalentes.

Como se usa en la presente memoria, un dsFv se refiere a un Fv con un puente disulfuro intermolecular obtenido por ingeniería genética que estabiliza la pareja V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>.

Como se usa en la presente memoria, un fragmento F(ab)<sub>2</sub> es un fragmento de anticuerpo que se obtiene como resultado de la digestión de una inmunoglobulina con pepsina a pH 4,0-4,5; puede expresarse de forma recombinante para producir el fragmento equivalente.

Como se usa en la presente memoria, los fragmentos Fab son fragmentos de anticuerpo que se obtienen como resultado de la digestión de una inmunoglobulina con papaína; pueden expresarse de forma recombinante para producir el fragmento equivalente.

Como se usan en la presente memoria, los scFv se refieren a fragmentos de anticuerpo que contienen una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) conectadas covalentemente por un enlazador polipeptídico en cualquier orden. El enlazador es de una longitud tal que los dos dominios variables están unidos por un puente sin una interferencia sustancial. Son enlazadores incluidos restos (Gly-Ser)<sub>n</sub> con algunos restos Glu o Lys dispersados por los mimos para aumentar la solubilidad.

Como se usan en la presente memoria, los anticuerpos humanizados se refieren a anticuerpos que están modificados para incluir secuencias humanas de aminoácidos de modo que la administración a un ser humano no provoque una respuesta inmune. Se conocen métodos para la preparación de dichos anticuerpos. Por ejemplo, para producir dichos anticuerpos, el hibridoma u otras células procariontas o eucariotas tales como una célula de *E. coli* o CHO que expresa el anticuerpo monoclonal, se alteran por técnicas de ADN recombinante para expresar un anticuerpo en el que la composición de aminoácidos de la región no variable se basa en anticuerpos humanos. Se han diseñado programas informáticos para identificar dichas regiones.

Como se usan en la presente memoria, los diacuerpos son scFV diméricos; los diacuerpos tienen típicamente enlazadores peptídicos más cortos que los scFV y generalmente dimerizan.

5 Como se usa en la presente memoria, hsFV se refiere a fragmentos de anticuerpo en los que los dominios constantes normalmente presentes en un fragmento Fab se han sustituido con un dominio superenrollado heterodimérico (véase, por ejemplo, Arndt et al. (2001) *J Mol Biol.* 7: 312: 221-228).

10 Como se usa en la presente memoria, una muestra se refiere a cualquier cosa que pueda contener un analito para el que se desee un ensayo de analitos. La muestra puede ser una muestra biológica, tal como un fluido biológico o tejido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, esperma, líquido amniótico o similares. Los tejidos biológicos son agregados de células, habitualmente de una clase particular, junto con su sustancia intercelular que forma uno de los materiales estructurales de un ser humano, animal, planta, estructura bacteriana, fúngica o vírica, incluyendo tejidos conectivo, epitelial, muscular y nervioso. Los ejemplos de tejidos biológicos también incluyen, por ejemplo, 15 órganos, tumores, ganglios linfáticos, arterias y una célula o células individuales.

20 Como se usa en la presente memoria, una muestra biológica se refiere a cualquier muestra obtenida de una fuente viva o vírica e incluye cualquier tipo de célula o tejido de un sujeto a partir del cual puede obtenerse un ácido nucleico o proteína u otra macromolécula. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina, y sudor, muestras de tejidos y órganos de animales y plantas. También se incluyen muestras de suelo y agua y otras muestras ambientales, virus, bacterias, hongos, algas, protozoos y componentes de los mismos. Por lo tanto, pueden evaluarse contaminaciones bacterianas y virales y de otro tipo de productos alimenticios y entornos. Los métodos de la presente memoria se ponen en práctica usando muestras biológicas y, en algunas realizaciones, tal como para la generación de perfiles, 25 también pueden usarse para el ensayo de cualquier muestra.

30 Como se usa en la presente memoria, un fármaco identificado por los métodos de exploración proporcionados en la presente memoria se refiere a cualquier compuesto que es un candidato para su uso como agente terapéutico o como compuesto candidato para el diseño de un agente terapéutico. Dichos compuestos pueden ser moléculas pequeñas, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas antisentido o ARNbc, tal como iARN, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos recombinantes y otros compuestos de este tipo que pueden servir como candidatos a fármaco o compuestos candidato.

35 Como se usa en la presente memoria, un peptidomimético es un compuesto que mimetiza la conformación y ciertas características estereoquímicas de la forma biológicamente activa de un péptido particular. En general, los peptidomiméticos están diseñados para mimetizar ciertas propiedades deseables de un compuesto, pero no las propiedades indeseables, tales como la flexibilidad, que conduce a una pérdida de conformación biológicamente activa y rotura de enlaces. Los peptidomiméticos pueden prepararse a partir de compuestos biológicamente activos por sustitución de ciertos grupos o enlaces que contribuyen a las propiedades indeseables con bioisoésteres. Los expertos en la materia conocen los bioisoésteres. Por ejemplo, el bioisoéster de metileno CH<sub>2</sub>S se ha usado como una sustitución de amida en análogos de encefalina (véase, por ejemplo, Spatola (1983) págs. 267-357 en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, Weistein, Ed. volumen 7, Marcel Dekker, Nueva York). La morfina, que puede administrarse por vía oral, es un compuesto que es un peptidomimético del péptido endorfina. Para los fines de la presente memoria, se incluyen péptidos cíclicos entre los peptidomiméticos. 45

50 Como se usa en la presente memoria, una macromolécula se refiere a cualquier molécula que tiene un peso molecular de cientos a millones. Las macromoléculas incluyen péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos y otras moléculas de este tipo que se sintetizan generalmente por organismos biológicos, pero que pueden prepararse sintéticamente o usando métodos recombinantes de biología molecular.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "biopolímero" se usa para significar una molécula biológica, incluyendo macromoléculas, compuesta por dos o más subunidades monoméricas, o derivados de las mismas, que se unen por un enlace o una macromolécula. Un biopolímero puede ser, por ejemplo, un polinucleótido, un polipéptido, un carbohidrato o un lípido o derivados o combinaciones de los mismos, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una porción de ácido peptidonucleico o una glicoproteína, respectivamente. El biopolímero incluye, pero sin limitación, ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y otras macromoléculas. Los ácidos nucleicos incluyen ADN, ARN y fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden proceder de ADN genómico, ARN, ácido nucleico mitocondrial, ácido nucleico cloroplástico y otros orgánulos con material genético separado. 60

65 Como se usa en la presente memoria, una biomolécula es cualquier compuesto que se encuentra en la naturaleza, o derivados del mismo. Las biomoléculas incluyen, pero sin limitación: oligonucleótidos, oligonucleósidos, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos peptidonucleicos (PNA), oligosacáridos y monosacáridos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos monocatenarios y/o bicatenarios tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), así como a análogos o

derivados de ARN o ADN. También se incluyen en la expresión “ácido nucleico” análogos de ácidos nucleicos tales como ácido peptidonucleico (PNA), ADN de fosforotioato y otros análogos de este tipo y derivados o combinaciones de los mismos.

5 El término debería entenderse que incluye, como equivalentes, derivados, variantes y análogos de ARN o ADN generados a partir de análogos de nucleótidos, polinucleótidos monocatenarios (con sentido o antisentido) y bicatenarios. Los desoxirribonucleótidos incluyen desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina y desoxitimidina. Para el ARN, la base de uracilo es uridina.

10 Los análogos de nucleótidos contenidos en un polinucleótido pueden ser, por ejemplo, nucleótidos de masa modificada, que permiten la diferenciación por masa de polinucleótidos; nucleótidos que contienen un marcador detectable tal como un marcador fluorescente, radiactivo, luminiscente o quimioluminiscente, que permite la detección de un polinucleótido; o nucleótidos que contienen un grupo reactivo tal como biotina o un grupo tiol, que facilita la inmovilización de un polinucleótido en un soporte sólido. Un polinucleótido también puede contener uno o más enlaces de cadena principal que sean selectivamente escindibles, por ejemplo, químicamente, enzimáticamente o fotolíticamente. Por ejemplo, un polinucleótido puede incluir uno o más desoxirribonucleótidos, seguidos de uno o más ribonucleótidos, que pueden estar seguidos de uno o más desoxirribonucleótidos, tal como una secuencia que sea escindible en la secuencia de ribonucleótidos por hidrólisis de bases. Un polinucleótido también puede contener uno o más enlaces que sean relativamente resistentes a la escisión, por ejemplo, un cebador oligonucleotídico quimérico que puede incluir nucleótidos unidos por enlaces de ácido peptidonucleico y al menos un nucleótido en el extremo 3', que se une por un enlace fosfodiéster u otro enlace adecuado y es capaz de extenderse por una polimerasa. Las secuencias de ácido peptidonucleico pueden prepararse usando métodos bien conocidos (véase, por ejemplo, Weiler et al., *Nucleic acids Res.* 25: 2792-2799 (1997)).

25 Como se usan en la presente memoria, los oligonucleótidos se refieren a polímeros que incluyen ADN, ARN, análogos de ácido nucleico, tales como PNA y combinaciones de los mismos. Para los fines de la presente memoria, los cebadores y sondas son oligonucleótidos monocatenarios o son oligonucleótidos parcialmente monocatenarios. El término “polinucleótido” se refiere a un oligómero o polímero que contiene al menos dos nucleótidos o derivados de nucleótidos unidos, incluyendo un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN) y un derivado de ADN o ARN que contiene, por ejemplo, un análogo de nucleótido o un enlace de “cadena principal” distinto de un enlace fosfodiéster, por ejemplo, un enlace fosfotriéster, un enlace fosforamidato, un enlace fosforotioato, un enlace tioéster o un enlace peptídico (ácido peptidonucleico). El término “oligonucleótido” también se usa en la presente memoria esencialmente de forma sinónima con “polinucleótido”, aunque los expertos en la materia reconocen que los oligonucleótidos, por ejemplo, cebadores de PCR, tienen generalmente una longitud de menos de aproximadamente cincuenta a cien nucleótidos.

40 Como se usa en la presente memoria, una sustancia de ensayo (o compuesto de ensayo) se refiere a un compuesto químicamente definido (por ejemplo, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas/inorgánicas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, lípidos, polisacáridos, sacáridos o híbridos entre estas moléculas tales como glicoproteínas, etc.) o mezclas de compuestos (por ejemplo, una biblioteca de compuestos de ensayo, extractos naturales o sobrenadantes de cultivo, etc.) cuyo efecto sobre un SP, particularmente una forma de cadena sencilla que incluye el dominio de proteasa o una porción suficiente del mismo para la actividad, según se determina por un método *in vitro*, tal como los ensayos proporcionados en la presente memoria, se ensaya. Los compuestos de ensayo pueden proporcionarse como bibliotecas (colecciones) de dichos compuestos.

45 Como se usa en la presente memoria, la exploración de alto rendimiento (HTS) es un proceso de ensayo de un gran número de estructuras químicas diversas (bibliotecas de compuestos) contra dianas para identificar “coincidencias” (Sittampalam et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1: 384-91 (1997)). Las operaciones de HTS pueden automatizarse y computarizarse para manipular la preparación de muestras, los procedimientos de ensayo y el posterior procesamiento de grandes volúmenes de datos.

50 Como se usa en la presente memoria, la producción por medios recombinantes usando métodos de ADN recombinante significa el uso de los métodos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por ADN clonado.

55 Como se usa en la presente memoria, sustancialmente idéntico a un producto significa suficientemente similar de modo que la propiedad de interés permanece suficientemente sin cambios para que el producto sustancialmente idéntico pueda usarse en lugar del producto.

60 Como se usa en la presente memoria, el término equivalente, cuando se refiere a dos secuencias de ácidos nucleicos, significa que las dos secuencias en cuestión codifican la misma secuencia de aminoácidos o proteínas equivalentes. Cuando el término “equivalente” se usa en relación con dos proteínas o péptidos, significa que las dos proteínas o péptidos tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, con sólo sustituciones de aminoácidos conservativas (véase, por ejemplo, la Tabla 1 anterior) que no alteran sustancialmente la actividad o función de la proteína o péptido. Cuando el término “equivalente” se refiere a una propiedad, la propiedad no tiene que estar presente en la misma medida pero las actividades son sustancialmente las mismas en general. El término

“complementario”, cuando se refiere a dos secuencias de nucleótidos, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridar, generalmente con menos del 25%, con menos del 15% e incluso con menos del 5% o sin emparejamientos erróneos entre nucleótidos opuestos. En general para ser consideradas complementarias en la presente memoria las dos moléculas hibridan en condiciones de alta rigurosidad.

El término “sustancialmente” idéntico u homólogo o similar varía con el contexto según entienden los expertos en la materia pertinente y significa una identidad de al menos el 70%, típicamente significa una identidad de al menos el 80%, 90% y más generalmente de al menos el 95%. Cuando sea necesario se especificará el porcentaje de identidad.

Como se usa en la presente memoria, por homólogo se entiende una identidad de secuencia de ácido nucleico aproximadamente superior al 25%, tal como del 25%, 40%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. Si es necesario se especificará el porcentaje de homología. Los términos “homología” e “identidad” se usan con frecuencia indistintamente. En general, las secuencias se alinean de modo que se obtiene la coincidencia de mayor orden (véase, por ejemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073). Por identidad de secuencia se determina el número de aminoácidos conservados por programas de algoritmos de alineamiento convencionales y se usan con las penalizaciones por huecos por defecto establecidas por cada proveedor. Las moléculas de ácido nucleico sustancialmente homólogas hibridarían típicamente a una rigurosidad moderada o a alta rigurosidad a lo largo de toda la longitud del ácido nucleico o a lo largo de al menos aproximadamente el 70%, 80% o 90% de la molécula de ácido nucleico de longitud completa de interés. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que contienen codones degenerados en lugar de codones en la molécula de ácido nucleico que hibrida.

Puede determinarse si dos moléculas de ácido nucleico cualesquiera tienen secuencias de nucleótidos que tienen una “identidad” de al menos, por ejemplo, el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% usando algoritmos informáticos conocidos tales como el programa “FAST A” usando, por ejemplo, los parámetros por defecto como en Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (otros programas incluyen el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(l): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., et al., J Molec Biol 215: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994 y Carillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48:1073). Por Ejemplo, la función BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information puede usarse para determinar la identidad. Otros programas disponibles públicamente o en el mercado incluyen el programa DNASTar “MegAlign” (Madison, WI) y el programa “Gap” del University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWG) (Madison WI)). El porcentaje de homología o identidad de proteínas y/o moléculas de ácido nucleico puede determinarse, por ejemplo, por comparación de la información de secuencia usando un programa informático GAP (por ejemplo, Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, como se revisó por Smith y Waterman ((1981) Adv. Appl. Math. 2: 482). En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto para el programa GAP pueden incluir: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y de 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribskov et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE, National Biomedical Research Foundation, págs. 353-358 (1979); (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización por huecos terminales. Por lo tanto, como se usa en la presente memoria, el término “identidad” representa una comparación entre un polipéptido o polinucleótido de ensayo y uno de referencia.

Como se usa en la presente memoria, la expresión al menos un “90% idéntico a” se refiere a porcentajes de identidad del 90 al 99,99 respecto a los polipéptidos de referencia. Una identidad a un nivel del 90% o más es indicativa del hecho de que, asumiendo con fines de ejemplificación que se compara una longitud de polinucleótido de ensayo y de referencia de 100 aminoácidos, no más del 10% (es decir, 10 de cada 100) aminoácidos en el polipéptido de ensayo difieren de los de los polipéptidos de referencia. Pueden realizarse comparaciones similares entre polinucleótidos de ensayo y de referencia. Dichas diferencias pueden estar representadas como mutaciones puntuales distribuidas aleatoriamente a lo largo de toda la longitud de una secuencia de aminoácidos o pueden agruparse en una o más localizaciones de longitud variable hasta el máximo permisible, por ejemplo, una diferencia de 10/100 aminoácidos (una identidad de aproximadamente el 90%). Las diferencias se definen como sustituciones o deleciones de ácidos nucleicos o aminoácidos. A nivel de homología o identidades por encima de aproximadamente el 85-90%, el resultado debería ser independiente del programa y de los ajustes de los parámetros por huecos; dichos altos niveles de identidad pueden evaluarse fácilmente, a menudo sin depender del *software*.

Como se usa en la presente memoria, el término hibridar en condiciones de una rigurosidad especificada se usa para describir la estabilidad de híbridos formados entre dos fragmentos de ADN monocatenarios y se refiere a las

condiciones de fuerza iónica y temperatura a las que se lavan dichos híbridos, después de la hibridación en condiciones de rigurosidad inferiores a o iguales a las de la etapa de lavado. Típicamente, una rigurosidad elevada, media y reducida incluyen las condiciones siguientes o condiciones equivalentes a las mismas:

- 5           1) alta rigurosidad: SSPE o SSC 0,1x, SDS al 0,1%, 65°C  
           2) rigurosidad media: SSPE o SSC 0,2x, SDS al 0,1%, 50°C  
           3) rigurosidad reducida: SSPE o SSC 1,0x, SDS al 0,1%, 50°C

10 Las condiciones equivalentes se refieren a condiciones que se seleccionan para sustancialmente el mismo porcentaje de emparejamiento erróneo en los híbridos resultantes. Las adiciones de ingredientes, tales como formamida, Ficoll y solución de Denhardt afectan a parámetros tales como la temperatura en la que debería realizarse la hibridación y la velocidad de reacción. Por lo tanto, la hibridación en SSC 5X, en formamida al 20% a 42°C es sustancialmente la misma que en las condiciones de hibridación enumeradas anteriormente en condiciones de baja rigurosidad. Las recetas para SSPE, SSC y Denhardt y la preparación de formamida desionizada se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Capítulo 8; véase, Sambrook et al., vol. 3, pág. B.13, véanse también numerosos catálogos que describen soluciones de laboratorio usadas comúnmente. Se entiende que pueden conseguirse rigurosidades equivalentes usando tampones, sales y temperaturas alternativas.

20 Como se usa en la presente memoria, una composición se refiere a cualquier mezcla. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

25 Como se usa en la presente memoria, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más artículos. La combinación pueden ser dos o más artículos separados, tal como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de los mismos, tal como una sola mezcla de los dos o más artículos o cualquier variación de los mismos.

30 Como se usa en la presente memoria, un kit se refiere a una combinación envasada, que opcionalmente incluye instrucciones y/o reactivos para su uso.

35 Como se usa en la presente memoria, un "envase" se refiere a un material sólido tal como vidrio, plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno y policarbonato), papel, papel metalizado para contener dentro de límites fijados un reactivo. Por lo tanto, por ejemplo, un envase puede ser un frasco, vial, envuelta laminada de plástico y plástico-papel metalizado o el recipiente similar usado para contener un reactivo de diagnóstico contemplado, o puede ser un pocillo de placa de microtitulación al que se han fijado, es decir, unido, operativamente cantidades de microgramos de un reactivo de diagnóstico contemplado para poder unirse inmunológicamente por un polipéptido híbrido o un polipéptido diana.

40 Como se usa en la presente memoria, un fluido se refiere a cualquier composición que puede fluir. Los fluidos incluyen por lo tanto composiciones que están en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones de este tipo.

45 Como se usa en la presente memoria, los expertos en la materia conocen sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la materia reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4ª Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., pág. 224).

50 Dichas sustituciones pueden realizarse de acuerdo con lo expuesto en la TABLA 2 de la forma siguiente:

**TABLA 2**

Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser



Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

También pueden permitirse otras sustituciones y pueden determinarse empíricamente o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

- 5 Como se usan en la presente memoria, los aminoácidos que aparecen en las diversas secuencias de aminoácidos que aparecen en la presente memoria se identifican de acuerdo con sus abreviaturas de una letra o de tres letras bien conocidas. Los nucleótidos que aparecen en los diversos fragmentos de ADN se designan con las designaciones de una sola letra convencionales usadas rutinariamente en la técnica.
- 10 Como se usan en la presente memoria, las abreviaturas para cualquier grupo protector, aminoácido y otros compuestos están, a menos que se indique otra cosa, de acuerdo con su uso común, abreviaturas reconocidas o la IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (véase, (1972) Biochem. 11: 1726).

- 15 Otras abreviaturas usadas en la presente memoria incluyen, pero sin limitación: SNC para sistema nervioso central; BSE para encefalopatía espongiforme bovina; CJD para enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; FFI para insomnio familiar fatal; GSS para enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker; Hu para humano; HuPrP para una proteína priónica humana (SEC ID N°: 8); Mo para ratón; MoPrP para una proteína priónica de ratón (SEC ID N°: 9 y 10); SHa para hámster sirio; SHaPrP para una proteína priónica de hámster sirio (SEC ID N°: 5); Tg para transgénico; Tg(SHaPrP) para un ratón transgénico que contiene el gen de PrP de un hámster sirio; Tg(HuPrP) para ratones transgénicos que contienen un gen de PrP humana; Tg(ShePrP) para ratones transgénicos que contienen el gen de PrP de oveja completo (SEC ID N°: 11); Tg(BovPrP) para ratones transgénicos que contienen el gen de PrP de vaca completo (SEC ID N°: 13); PrP<sup>Sc</sup> para la isoforma de tembladera de la proteína priónica; PrP<sup>c</sup> para la isoforma normal celular de la proteína priónica; y MoPrP<sup>Sc</sup> para la isoforma de tembladera de la proteína priónica de ratón.
- 20

## 25 B. Moléculas híbridas

- Para una enfermedad de la conformación de proteínas la misma proteína (o una porción de la misma) presenta más de una isoforma (confórmero), de modo que al menos una forma es causante de una enfermedad, tal como la proteína priónica o una proteína amiloide, o está implicada en la enfermedad. Con fines de diagnóstico, pronóstico, terapia y/o exploración de fármacos es ventajoso tener moléculas que interactúan específicamente (es decir, reaccionen con mayor afinidad, típicamente al menos 2, 5, 10 veces, generalmente al menos aproximadamente 100 veces) con un confórmero asociado a enfermedad que con un confórmero benigno (no implicado en enfermedad) (o viceversa). Por lo tanto, se proporcionan en la presente memoria moléculas que reaccionan específicamente con un confórmero de una proteína que tiene una pluralidad de confórmeros. Típicamente, las moléculas interactúan con un confórmero asociado a enfermedad.
- 30
- 35

- En particular, se proporcionan en la presente memoria moléculas híbridas, tales como polipéptidos híbridos, que incluyen un motivo polipeptídico o polipéptido que incluye dicho motivo, y restos aminoacídicos adicionales (típicamente 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 o más) de modo que la molécula híbrida resultante interactúa específicamente con un confórmero. El polipéptido incluye generalmente una secuencia contigua de aminoácidos (un motivo) de la proteína que presenta las conformaciones. El motivo puede modificarse, tal como por sustitución de ciertos aminoácidos o por métodos de evolución dirigida y aleatoria, para producir motivos con mayor afinidad.
- 40

- Por lo tanto, entre las moléculas híbridas proporcionadas en la presente memoria están moléculas híbridas, particularmente polipéptidos híbridos, que se producen por injerto de un motivo de unión de una molécula en un armazón, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo o una enzima u otra molécula indicadora. Los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria, incluso las inmunoglobulinas híbridas, no son anticuerpos de por sí, sino que son polipéptidos que son moléculas híbridas que contienen un motivo seleccionado insertado en otro polipéptido de modo que el motivo conserva u obtiene la capacidad para unirse a una proteína implicada en una enfermedad de la agregación de proteínas. Los polipéptidos híbridos pueden incluir porciones de anticuerpos u otros armazones, pero también incluyen una porción distinta de inmunoglobulina o distinta de armazón injertada en los mismos. La porción distinta de inmunoglobulina se identifica por su capacidad para unirse específicamente a una isoforma polipeptídica diana. El polipéptido híbrido puede unirse específicamente a la isoforma infecciosa o relacionada con enfermedad o seleccionada diana de un polipéptido como un monómero con una afinidad suficiente para detectar el complejo resultante o para precipitar el polipéptido diana.
- 45
- 50
- 55

- El armazón se selecciona de modo que la inserción del motivo en el mismo no altere sustancialmente (es decir, conserve) la especificidad de unión deseada del motivo. El armazón puede seleccionarse además por sus propiedades, tal como su capacidad para actuar como un indicador. También puede modificarse por eliminación de porciones del mismo para eliminar una actividad o especificidad de unión del mismo. El armazón también puede servir para limitar al polipéptido en su estructura tridimensional apropiada para su reactividad con un polipéptido diana.
- 60

Se proporcionan métodos para la producción de moléculas híbridas que interactúan específicamente con una forma de un conformero de una proteína asociada con una enfermedad de la conformación de proteínas o que implica agregación de proteínas. En estos métodos, se inserta un motivo polipeptídico de la proteína en un armazón de modo que la molécula resultante presenta una unión específica a un conformero en comparación con otros conformeros. En particular, la molécula híbrida puede presentar una unión específica a un conformero asociado a enfermedad o a un conformero de agregación en comparación con un conformero benigno.

Los métodos para la producción de las moléculas híbridas, tales como polipéptidos híbridos, y las moléculas híbridas resultantes se ejemplifican usando la forma infecciosa del prión como diana y epítomos y regiones de la misma como motivos. En concreto, se ejemplifican varios polipéptidos híbridos que interactúan con una afinidad sustancialmente mayor (al menos 10 veces superior) con la forma infecciosa nativa (o núcleo infeccioso de la misma) de un polipéptido priónico que la forma no infecciosa. Se muestra en la presente memoria que al menos dos epítomos distintos en el polipéptido de PrP están reconocidos por los polipéptidos híbridos (también denominados en la presente memoria anticuerpos injertados).

### 1. Proteínas o polipéptidos relacionados con enfermedad

Como se ha señalado anteriormente, los métodos y moléculas híbridas de la presente memoria emplean proteínas que están implicadas en o que están asociadas con enfermedades de la agregación o conformación de proteínas. En tales enfermedades, al menos una forma de una proteína es benigna y otra está implicada en la enfermedad, tal como como un agente infeccioso de la enfermedad y/o en una reacción de agregación. Dichas enfermedades y proteínas asociadas que se ensamblan en dos o más conformaciones diferentes en las que al menos una conformación es una proteína conformacionalmente alterada incluyen las expuestas en la Tabla 1 anterior.

#### a. Priones

La PrP<sup>Sc</sup>, un conformero anormal de la proteína priónica celular ubicua (PrP<sup>C</sup>), es el único constituyente identificado de las partículas priónicas infecciosas. Durante la propagación de los priones, se cree que la formación de una infectividad por priones naciente se desarrolla a través de un proceso dependiente de molde en el que la PrP<sup>Sc</sup> se autorreplica dirigiendo la reorganización conformacional de la PrP<sup>C</sup>. Se desconoce exactamente cómo los distintos conformeros PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> interactúan entre sí, y posiblemente con otras moléculas auxiliares (Kaneko et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 10069-10074; Zulianello et al. (2000) J. Virol. 74: 4351-4360), en el complejo de replicación de priones. La observación de que diferentes cepas de priones conservan sus propiedades características a lo largo de múltiples pases indica que la propagación de priones es un proceso de alta fidelidad y sugiere que las interacciones moleculares entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> son extremadamente específicas (Prusiner et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 13363-13383; Caughey (2001) T.I.B.S. 26: 235-242).

#### 1) Priones y enfermedades por priones

Las enfermedades por priones tales como la tembladera y la encefalopatía espongiforme bovina están íntimamente relacionadas con la PrP<sup>Sc</sup>, un conformero anormal de la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>). Los anticuerpos monoclonales que se unen a la primera hélice  $\alpha$  de la PrP<sup>C</sup>, tales como el anticuerpo monoclonal D13 o D18, inhiben la propagación de priones impidiendo la asociación heterodimérica de la PrP y la PrP<sup>Sc</sup> (véase, Williamson et al. (1998) J. Virol. 72: 9413-9418; véase también la solicitud de Estados Unidos en trámite junto con la presente de N° de Serie 09/627.218; véanse las SEC ID N°: 29-36, que exponen las secuencias de ácido nucleico y proteína codificada de las cadenas pesada y ligera de cada uno de estos Fab). Los anticuerpos u otras moléculas de unión específicas que distinguen entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> pueden ser de valor en la resolución de este problema. La inmunización de animales normales o *knock out* para PrP con una amplia variedad de antígenos de PrP incluyendo priones infecciosos, PrP<sup>C</sup> y moléculas de PrP sintéticas y recombinantes replegadas en conformaciones ricas en hélices  $\alpha$  o láminas  $\beta$ , sin embargo, ha fracasado repetidamente en la generación de anticuerpos de alta afinidad que reconozcan exclusivamente formas asociadas a enfermedad de la PrP (Williamson et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 7279; Peretz et al. (1997) J. Mol. Biol. 273: 614; Williamson et al. (1998) J. Virol. 72: 9413). Un informe anterior (Korth et al. (1997) Nature 390: 74) de dicho anticuerpo ha demostrado ser prematuro (Fischer (2000) Nature 408: 479). La propagación de priones es un proceso dependiente de molde en el que la PrP<sup>Sc</sup> dirige la reorganización conformacional de la PrP<sup>C</sup> (Prusiner et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 13363-13383). Se desconoce exactamente cómo estos dos conformeros distintos de PrP interactúan en el complejo de replicación de priones.

Se describe que los anticuerpos monoclonales que reaccionen con diferentes epítomos de la PrP<sup>C</sup> inhiben eficazmente la propagación de priones en una línea de neuroblastoma infectada con prión de tembladera (Peretz et al. (2001) Nature 412: 739-743). El efecto inhibitorio observado parece ser el resultado de la unión del anticuerpo a la PrP<sup>C</sup> de superficie celular que obstaculiza el acoplamiento del molde de PrP<sup>Sc</sup> o un cofactor crítico para la conversión de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>. Uno de los anticuerpos usados en estos experimentos, Fab D18, posee un efecto inhibitorio particularmente potente (Williamson et al. (1998) J. Virol. 72: 9413-9418). Como se indica en la presente memoria, su epítomo de PrP<sup>C</sup> discontinuo, que abarca los restos 133-157, desempeña un papel importante en la unión directamente a PrP<sup>Sc</sup>. El Fab D13 también tiene un potente efecto inhibitorio.

## 2) Polipéptidos híbridos que contienen polipéptidos priónicos o motivos de los mismos

En la presente memoria se proporcionan polipéptidos que se unen específicamente a PrP<sup>Sc</sup> y métodos de preparación de dichos polipéptidos y otros polipéptidos híbridos que se unen a confórmersos infecciosos o causantes de enfermedad de enfermedades de proteínas conformacionalmente alteradas (enfermedades que implican agregación de proteínas). Por lo tanto, se proporcionan polipéptidos que se unen preferentemente (específicamente) a un confórmero (generalmente el confórmero asociado a enfermedad) con mayor afinidad, típicamente al menos 0,5, 1, 2, 3, 5, 10 veces o más, que al otro confórmero. También se contemplan péptidos que contienen deleciones de uno o más aminoácidos que dan como resultado la modificación de la estructura de la molécula resultante pero que no alteran significativamente su capacidad para unirse a un confórmero, tal como PrP<sup>Sc</sup>, para formar un complejo de proteína priónica o para inducir un cambio conformacional en un confórmero, tal como la inducción de un cambio conformacional en la PrP<sup>Sc</sup>.

En la presente memoria se proporcionan regiones de PrP<sup>C</sup> que son componentes críticos de la interfaz de replicación de PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>. De acuerdo con los métodos proporcionados en la presente memoria, el polipéptido de PrP que corresponde a esta región se injerta en una molécula transportadora o armazón adecuado, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, para producir una molécula con un reconocimiento específico de formas asociadas a enfermedad de la PrP. Las moléculas proporcionadas en la presente memoria son moléculas híbridas, tales como una inmunoglobulina o Fab u otro fragmento de anticuerpo con una región sustituida por secuencia priónica. La molécula resultante es una molécula multivalente, tal como divalente o monovalente, que se une específicamente a la PrP<sup>Sc</sup>. En realizaciones de la presente memoria, las moléculas de unión tienen un polipéptido distinto de inmunoglobulina injertado en regiones, particularmente regiones tales como la región CD3R, que conserva la conformación de PrP apropiada de la PrP injertada. Los métodos para generar las moléculas híbridas y las moléculas híbridas resultantes pueden usarse para unirse específicamente a la forma que está formando un complejo o conformacionalmente alterada de un polipéptido que participa en enfermedades de agregación. Las moléculas híbridas pueden usarse, por ejemplo, para el diagnóstico y exploración.

En la presente memoria se proporcionan moléculas que se unen específicamente a o interaccionan con PrP<sup>Sc</sup>. Los motivos de secuencia de PrP se injertaron en armazones de anticuerpo de destinatario (IgG y Fab) y se demostró (véanse los EJEMPLOS) que se unían a PrP<sup>Sc</sup> no desnaturalizada y a PrP 27-30. Los polipéptidos híbridos son específicos para la forma infecciosa y no la forma normal. Las moléculas interaccionan como moléculas divalentes o monoméricas y son capaces de unirse específicamente como un sitio de unión monomérico. Generalmente son polipéptidos híbridos que contienen una porción derivada de prión y un armazón, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo.

Cualquier prión o porción del mismo se injerta en un armazón destinatario seleccionado. La porción seleccionada puede determinarse empíricamente injertando sistemáticamente la molécula completa y porciones de la misma y ensayando para determinar la capacidad para unirse específicamente a PrP<sup>Sc</sup>. Pueden seleccionarse regiones más y más pequeñas hasta que la afinidad de unión disminuya hasta un nivel inaceptable (típicamente inferior a  $10^6$ - $10^7$  l/mol).

Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden usarse para producir una gran diversidad de polipéptidos híbridos con especificidad por una proteína diana, particularmente una implicada en enfermedades y trastornos que implican agregación de proteínas, tales como trastornos amiloides. La región de un polipéptido que se une a la forma relacionada con enfermedad del polipéptido diana se injerta sistemáticamente en un armazón adecuado, y los polipéptidos híbridos resultantes que se unen específicamente (es decir, con una afinidad de al menos aproximadamente  $10^7$  l/mol y/o 10 veces, 100 veces o más veces superior que a una isoforma no relacionada con enfermedad de la proteína) se identifican.

Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos híbridos que se unan solamente a una proteína priónica de origen natural dentro de una sola especie y no a una proteína priónica de origen natural dentro de otra especie. Además, el polipéptido híbrido puede diseñarse para unirse solamente a una forma infecciosa de una proteína priónica (por ejemplo, PrP<sup>Sc</sup>) y no unirse a una forma no infecciosa (por ejemplo, PrP<sup>C</sup>). Después puede usarse uno solo o una pluralidad en ensayos para identificar o detectar una proteína diana particular.

El polipéptido híbrido puede purificarse y aislarse usando técnicas conocidas y unidas a un soporte usando procedimientos conocidos. La superficie resultante puede usarse para ensayar muestras, tales como sangre u otros fluidos corporales o muestra de órganos y tejidos, *in vitro*, para determinar si la muestra contiene uno o más tipos de proteínas diana. Por ejemplo, pueden unirse polipéptidos híbridos que se unen específicamente solamente a PrP<sup>Sc</sup> humana a la superficie de un soporte y una muestra ponerse en contacto con los polipéptidos híbridos unidos a la superficie del material. Si no se produce unión puede deducirse que la muestra no contiene PrP<sup>Sc</sup> humana.

Los polipéptidos híbridos también pueden tener la capacidad de neutralizar priones (es decir, eliminar su infectividad). Por lo tanto, pueden añadirse composiciones que contienen los polipéptidos híbridos a un producto, tal como sangre o alimento, para neutralizar cualquier proteína priónica infecciosa dentro del producto. Por lo tanto, si un producto se produce a partir de una fuente natural que podría contener proteínas priónicas infecciosas, los

polipéptidos híbridos pueden añadirse como precaución eliminando de este modo cualquier infección potencial resultante de proteínas priónicas infecciosas. Por ejemplo, puede usarse como agente terapéutico para interrumpir la replicación y/o propagación de priones.

5 Los polipéptidos híbridos pueden usarse en relación con tecnología de cromatografía de inmovilización de afinidad. Más específicamente, los polipéptidos híbridos pueden ponerse en la superficie de un material dentro de una columna de cromatografía. Después de eso, una composición a purificar puede pasarse a través de la columna. Si la muestra a purificar incluye cualquier proteína, tal como PrP<sup>Sc</sup> en la realización ejemplificada, que se une a los polipéptidos híbridos, dichas proteínas se eliminarán de la muestra y de este modo se purificarán o eliminarán de una muestra.

10 Los polipéptidos híbridos pueden usarse para tratar a un mamífero. Pueden administrarse profilácticamente o administrarse a un animal infectado. La cantidad exacta de anticuerpo a administrar variará dependiendo de varios factores tales como la edad, sexo, peso y estado del animal objeto. Los expertos en la materia pueden determinar la cantidad exacta empíricamente, tal como por administración de polipéptidos híbridos en pequeñas cantidades y determinar el efecto y después de eso ajustar la dosificación. Se sugiere que la dosificación puede variar de 0,01 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, típicamente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días. Generalmente la administración del anticuerpo durante 2 a 5 a 10 o más días consecutivos para evitar la "reunión" de la proteína diana.

### 3) Fuentes de priones

Se han identificado y secuenciado priones de muchos animales; se exponen priones ejemplares en las SEC ID N°: 5-13. Se contempla en la presente memoria cualquier proteína priónica conocida; están disponibles secuencias para dichos priones en bases de datos públicas y en publicaciones. Por ejemplo, se describen genes de PrP de pollo, 25 bovino, oveja, rata y ratón y están publicados en Gabriel et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 9097-9101; una secuencia para el hámster sirio está publicada en Basler et al. (1986) Cell 46:417-428; el gen de PrP de oveja está publicado en Goldmann et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2476-2480; la secuencia del gen de la PrP bovina está publicada en Goldmann et al. (1991) J. Gen. Virol. 72: 201-204; un gen de PrP de pollo está publicado en Harris et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7664-7668; una secuencia de gen de PrP para ratón está publicada en Loch et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 6372-6376; una secuencia de gen de PrP para visón está publicada en Kretzschmar et al. (1992) J. Gen. Virol. 73: 2757-2761 y una secuencia de gen de PrP humana está publicada en Kretzschmar et al. (1986) DNA 5: 315-324. También se conocen mutaciones y formas variantes de los genes y proteínas codificadas (véase, por ejemplo, el documento 5.908.969).

### 4) Mutaciones

Además de los priones animales, también se contemplan formas mutadas de los mismos como fuente del motivo polipeptídico. Se conocen numerosas formas mutantes y se han caracterizado en seres humanos. Estas incluyen una mutación de prolina (P) a leucina (L) en el codón 102 que se demostró que estaba relacionada genéticamente con el desarrollo de GSS con una puntuación de LOD que supera el tres. Esta mutación puede deberse a la desaminación de una desoxicitosina metilada (C) acoplada a desoxiguanosina (G) a través de un enlace fosfodiéster (CpG) en el ADN de línea germinal que codifica la PrP, dando como resultado la sustitución de desoxicitosina por deoxitimina (T). En el codón 178 se ha identificado una mutación que implica la sustitución de ácido aspártico (D) a asparagina (N) en muchas familias con CJD. La mutación D178N se ha relacionado con varias familias italianas con casos de insomnio, aunque la mutación parecía ser incompletamente penetrante. La misma mutación se describió también en varias familias afectadas por una enfermedad fenotípicamente diferente del FFI y similar al CJD, excepto por la mayor duración y la ausencia de una actividad electroencefalográfica de ondas agudas en la mayoría de los casos. Este descubrimiento de que la misma mutación proporciona dos fenotipos diferentes impulsó una serie de estudios para descubrir la base molecular de esta heterogeneidad fenotípica. Un análisis detallado del genotipo de la PRNP en 15 pacientes con FFI y 15 con CJD mostró que, además de la mutación D178N, todos los sujetos con FFI tenían una metionina en la posición 129 del alelo mutante mientras que todos los sujetos con CJD tenían valina en esta misma posición. Estos resultados se han confirmado en todos los casos de FFI y CJD. Por lo tanto, esto proporciona dos haplotipos distintos, el haplotipo 129M, D178N en FFI y el haplotipo 129V, D178N en CJD. Como uno de los emparentados con FFI tiene una delección de la repetición octapeptídica en el alelo mutante, es muy poco probable que todos los emparentados con FFI conocidos se originasen a partir de un fundador común. Este descubrimiento se muestra claramente en contra de la posibilidad de que las diferencias fenotípicas estén causadas por influencias genéticas distintas del codón 129 de la PRNP. Aunque la metionina o valina en el codón 129 en el alelo mutante es obligatoria en pacientes con FFI y CJD 178 respectivamente, el codón 129 en el alelo normal puede ser metionina o valina. Por lo tanto, los fenotipos de FFI y CJD están determinados por el codón 129 del alelo mutante, que en asociación con la mutación D178N da como resultado la expresión de dos tipos diferentes de PrPres. Además, como el FFI se expresa habitualmente en el fenotipo antes que el CJD, el codón 129 también modula la duración del fenotipo.

65 Los estudios sobre los fragmentos de PrPres asociados con las dos proteínas difieren tanto en tamaño como en la proporción de las tres isoformas de PrPres glicosiladas de forma diferente. La variación de tamaño es el resultado de

la digestión N-terminal diferencial por proteasas y la diferencia indican que la PrPres tiene diferentes conformaciones, o interacciones específicas de ligando. La diferencia de proporción indica sin embargo un procesamiento post-traducciona l diferente de la PrP en las dos enfermedades para dar en última instancia dos fenotipos diferentes. También se señalaron en estos casos los diferentes tiempos de incubación en relación con la heterocigosidad y homocigosidad del alelo mutante. La duración de la enfermedad del homocigoto era significativamente más corta que la de los heterocigotos. La edad media de aparición del CJD en homocigotos era de 39 +/- 8 años y en los heterocigotos era de 49 +/- 4 años.

Una sustitución de valina (V) a isoleucina (I) en el codón 210 produce CJD con síntomas y signos clásicos y, como la mutación D178N, parece mostrar una penetración incompleta. El GSS se ha asociado con mutaciones en los codones 105 y 114. Se han demostrado otras mutaciones puntuales en los codones 145, 198, 217 y posiblemente 232 que segregan con enfermedades priónicas hereditarias. Curiosamente, los péptidos sintéticos adyacentes a y que incluyen los restos 109 a 122 respectivamente se han polimerizado rápidamente en las estructuras en forma de bacilo que tienen las propiedades de tinción del amiloide. Aparte de las sustituciones de bases, los insertos de octarrepeticiones también pueden causar mutaciones. Un inserto de 144 pb en el codón 53 que contiene 6 octarrepeticiones se describió inicialmente en pacientes con CJD de cuatro familias que residían todas en el sur de Inglaterra. Como el gen de la PrP humana contiene solamente 5 octarrepeticiones, un solo acontecimiento de recombinación genética no podía haber creado este inserto extra. Aunque como las cuatro familias estaban relacionadas de forma lejana, una sola persona nacida hace más de dos siglos podía ser el fundador (puntuación de LOD superior a 11). Los estudios de varios laboratorios han demostrado que dos, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve octarrepeticiones además de las cinco normales se muestran en individuos con CJD hereditaria. La delección de una octarrepetic ión también se ha identificado pero sin ninguna enfermedad neurológica.

La mutación de tres restos K (restos 101, 104 y 106 usando la nomenclatura del hámster sirio, correspondientes a 100, 103 y 105 en la SEC ID N°: 7) presentes en el injerto de 89-112 suprime la reactividad con PrP<sup>Sc</sup> de los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria. Por lo tanto, estos restos están entre los que son restos clave en la interacción de PrPC-PrP<sup>Sc</sup>.

#### **b. Otras proteínas ejemplares implicadas en enfermedades de la agregación o conformación de proteínas**

Se proporcionan en la presente memoria métodos para producir polipéptidos híbridos que interaccionen específicamente con isoformas relacionadas con enfermedad de polipéptidos diana de cualquier enfermedad de la agregación de proteínas, particularmente enfermedades amiloides. Los polipéptidos diana son las isoformas relacionadas con enfermedad o causantes de enfermedad del polipéptido que se convierten de una forma benigna a una isoforma agregante o productora de enfermedad o maligna.

Los polipéptidos diana incluye, pero sin limitación, APP, A $\beta$ ,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, tau, componente no A $\beta$ , presenilina 1, presenilina 2, apoE, superóxido dismutasa (SOD) y neurofilamento, cuerpo de Pick,  $\alpha$ -sinucleína, tau en fibrillas, amilina, cadena de IgGL, transtiretina, procalcitonina,  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulina, factor natriurético auricular, amiloide A del suero, ApoAI, gelsolina, proteína de Huntington y otras proteínas diana de este tipo. Las porciones, motivos de una forma benigna (o productora de enfermedad) del polipéptido diana se incluyen en el polipéptido híbrido.

#### **c. Preparación de polipéptidos híbridos**

Para preparar moléculas híbridas específicas para la enfermedad se identifica una porción de una conformación del polipéptido que interacciona con la conformación asociada a enfermedad, tal como ensayando sistemáticamente fragmentos del polipéptido para determinar su capacidad para participar en un cambio conformacional, tal como por ensayo de la capacidad del fragmento para interaccionar con confórmeros anormales (es decir, productores de enfermedad). Pueden emplearse fragmentos de polipéptidos con la capacidad deseada como un reactivo específico o introducirse en un armazón, tal como un Fab o enzima u otra molécula, de modo que conserve la capacidad para interaccionar específicamente con el confórmero patológico.

Una porción o región responsable de la interacción con otras isoformas de cada una de las proteínas se identifica empíricamente ensayando sistemáticamente cada proteína, comenzando con la molécula completa y eliminando sistemáticamente porciones y/o explorando a lo largo de la longitud por selección de polipéptidos. Las regiones identificadas se insertan después en un armazón seleccionado y la molécula resultante se ensaya para determinar la capacidad para unirse a la proteína diana de interés. Los polipéptidos híbridos resultantes sirven como reactivos de diagnóstico, reactivos para su uso en ensayos de exploración de fármacos y como agentes terapéuticos potenciales.

## **2. Armazones**

Cualquier molécula, tal como un polipéptido, en la que el motivo polipeptídico seleccionado se inserta (o une) de modo que el polipéptido híbrido resultante tiene la especificidad de unión deseada se contempla para su uso como parte de las moléculas híbridas de la presente memoria. Los polipéptidos pueden insertarse en cualquier secuencia de aminoácidos que contenga al menos un número suficiente (10, 20, 30, 50, 100 o más aminoácidos) para presentar apropiadamente el motivo para su unión al polipéptido diana. El propósito del armazón es presentar el

motivo al polipéptido diana de forma que se una al mismo. El armazón puede diseñarse o seleccionarse para que tenga propiedades adicionales, tales como la capacidad de servir como marcador o indicador detectable o de tener una especificidad de unión adicional para permitir o contribuir a su uso en ensayos para detectar isoformas particulares de una proteína diana, o para explorar para agentes terapéuticos u otros ensayos y métodos.

5 Los armazones incluyen moléculas indicadoras, tales como proteínas fluorescentes y enzimas o fragmentos de las mismas, y moléculas de unión, tal como anticuerpos o fragmentos de los mismos. El armazón sirve a la función de limitar o restringir o presentar un motivo polipeptídico seleccionado, tal como una porción polipeptídica de PrP, para conservar o conferir las propiedades de unión específicas. Los armazones seleccionados incluyen todos o porciones  
10 de anticuerpos, enzimas tales como luciferasas, fosfatasas alcalinas,  $\beta$ -galactosidasa y otras enzimas generadoras de señal, generadores de quimioluminiscencia tales como peroxidasa de rábano picante; proteínas fluorescentes tales como proteínas fluorescentes rojas, verdes y azules que son bien conocidas; y proteínas cromogénicas.

15 El motivo polipeptídico se inserta en el armazón en una región que no altera ninguna actividad deseada. Los armazones pueden incluir otros dominios funcionales, tales como un sitio de unión adicional, tal como uno específico para un segundo resto para la detección.

#### a. Anticuerpos

20 Los anticuerpos son ejemplares de armazones o polipéptidos destinatarios contemplados en la presente memoria. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden servir como armazones para producir polipéptidos híbridos que contienen un motivo polipeptídico de interés. El motivo polipeptídico puede insertarse en cualquier región adecuada, tal como el bucle de CDR3 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.583.202 y la Patente de Estados Unidos N° 5.568.762), que permite la retención de la conformación del motivo polipeptídico y lo presenta en la  
25 superficie del polipéptido híbrido resultante. El motivo polipeptídico se inserta en un dominio variable de cadena pesada o ligera de una molécula de inmunoglobulina para producir inmunoglobulinas híbridas con especificidad por un polipéptido diana.

30 La unidad estructural básica de inmunoglobulina o anticuerpo se comprende bien. La molécula contiene cadenas pesadas y ligeras unidas entre sí covalentemente a través de enlaces disulfuro. Las cadenas pesadas también están unidas covalentemente en una porción de base mediante enlaces disulfuro y esta porción, denominada región constante, permite el reconocimiento mutuo con moléculas de superficie celular. Hay cinco clases principales conocidas de regiones constantes que determinan la clase de la molécula de inmunoglobulina y se denominan IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las regiones N-terminales de las cadenas pesadas se bifurcan hacia fuera, lo que se representa  
35 esquemáticamente como una estructura en forma de Y. Las cadenas ligeras se unen covalentemente a las ramificaciones en Y de las dos cadenas pesadas. En las regiones de las ramificaciones en Y de las cadenas pesadas se encuentra un dominio de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud que es variable y, por lo tanto, específico para epítomos antigénicos particulares secundarios para esa molécula de inmunoglobulina particular. Es esa región, por ejemplo, la que puede sustituirse completamente o en parte con un motivo polipeptídico para la unión  
40 a un polipéptido diana tal como la isoforma infecciosa o implicada en enfermedad de un polipéptido implicado en enfermedades de la agregación de proteínas, tales como enfermedades amiloides. En otras realizaciones, el motivo polipeptídico se introduce en un extremo N-terminal o extremos N-terminales de la región variable (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.583.202 para métodos para preparar moléculas con dichas alteraciones). La región, denominada CDR3, es responsable del contacto de unión entre una cadena pesada y un  
45 antígeno. Como tal es una buena región para sustituir cuando se producen los reactivos polipeptídicos híbridos proporcionados en la presente memoria para la detección de polipéptidos diana para su uso en los métodos de la presente memoria. Las moléculas resultantes son generalmente mono- o divalentes con respecto al polipéptido diana. Pueden modificarse por ingeniería genética para incluir diferentes especificidades para contribuir, por ejemplo, a la detección en ensayos proporcionados en la presente memoria:

#### b. Otras moléculas

50 Como se ha señalado, pueden usarse otras moléculas tales como enzimas y moléculas luminiscentes como armazones. Estas incluyen todas o porciones de enzimas suficientes para la actividad catalítica y/o de unión, o de moléculas luminiscentes suficientes para proporcionar luminiscencia. Las moléculas para su uso como armazones  
55 incluyen, pero sin limitación, luciferasa (incluyendo fotoproteínas), fosfatasas alcalinas,  $\beta$ -galactosidasa y otras enzimas generadoras de señal, generadoras de quimioluminiscencia tales como peroxidasa de rábano picante; proteínas fluorescentes tales como proteínas fluorescentes rojas, verdes y azules que son bien conocidas; y moléculas cromogénicas incluyendo proteínas cromogénicas.

### 3. Híbridos ejemplares

60 Como se ha señalado, las proteínas priónicas y las moléculas híbridas que contienen motivos de las mismas son ejemplares de moléculas híbridas proporcionadas en la presente memoria. Se contempla cualquier motivo de  
65 proteína priónica que incluya al menos una secuencia de aminoácidos suficiente para conferir una unión específica en una molécula híbrida. El motivo incluye desde al menos cinco aminoácidos hasta la molécula completa, y también

incluye variantes de las mismas que conservan propiedades de unión.

Como se muestra en la presente memoria, las proteínas priónicas incluyen al menos dos motivos distintos, uno de la región de aproximadamente 89-112 (usando la nomenclatura del hámster sirio) de un polipéptido priónico y el otro de la región de aproximadamente 136-141. Se ejemplifican polipéptidos híbridos que incluyen una o ambas de estas regiones.

Por ejemplo, los restos 89-112, 136-158 y 121-158 (véase la Figura 1, SEC ID N°: 5; y los restos correspondientes en otros polipéptidos priónicos, por ejemplo, las SEC ID N°: 5-13) se han injertado en armazones. En particular, se ejemplifican híbridos de Fab, F(ab')<sub>2</sub> e IgG (también denominados anticuerpos injertados). También se proporcionan polipéptidos híbridos que incluyen al menos los restos 101-106 o los restos de aproximadamente 136-150. Cualquier armazón o secuencias de aminoácidos u otras moléculas adecuadas que presenten el motivo injertado para la interacción con una PrP<sup>Sc</sup> con gran afinidad (K<sub>a</sub> típicamente superior a aproximadamente 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> mol/l, generalmente superior a 10<sup>7</sup> mol/l). Se incluyen entre los armazones enzimas, moléculas indicadoras, anticuerpos, inmunoglobulinas y fragmentos de los mismos.

Por ejemplo, se han injertado previamente secuencias de reconocimiento relativamente largas en la región HCDR3 de las moléculas de anticuerpo para generar las propiedades de unión deseadas (McLane et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 5214-5218). Las secuencias de PrP de ratón correspondientes a los aminoácidos 89-112, 119-136, 136-158, 121-144 y 121-158 se injertaron en la HCDR3 de IgG Fab b12 (Burton et al. (1994) Science 266: 1024-1027; véase la Patente de Estados Unidos N° 5.652.138; b12 procede de un anticuerpo producido por la línea celular denominada MT12 que tiene el Número de Acceso de la A.T.C.C. 69079), un anticuerpo recombinante humano específico para la gp120 del VIH-1, por uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solapante. Las células depositadas denominadas células de *E. coli* MT12 contienen el vector de expresión pComb2-3 para la expresión de los Fab denominados b12 (clon b12) (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.639.581, que proporciona las secuencias completas de la cadena pesada y ligera de este clon; véanse también las SEC ID N°: 1-4 de la presente memoria).

El Fab b12 se seleccionó como un armazón ejemplar (molécula destinataria) para la secuencia de PrP injertada porque el anticuerpo precursor posee una HCDR3 relativamente larga (18 aminoácidos) que se proyecta verticalmente desde la superficie del sitio de unión a antígeno (Ollmann Saphire et al. (2001) Science 293:1155). Para distanciar lo máximo la secuencia de PrP de la superficie del anticuerpo, cada injerto se puso entre el primer resto N-terminal y cuatro restos C-terminales de la HCDR3 precursora (Fig. 1). Además, se incorporaron dos restos de glicina en cada flanco de la secuencia de PrP. Los PrP-Fab resultantes (119-136, 121-144 y 121-158) se expresaron en *E. coli* y se purificaron hasta la homogeneidad (Williamson et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 4141-4145).

En las realizaciones ejemplificadas en la presente memoria, una porción del bucle de CDR3 de un anticuerpo denominado b12 (producido por una línea celular denominada MT12 que tiene el Número de Acceso de la A.T.C.C. 69079) se sustituye con el motivo polipeptídico injertado. El polipéptido híbrido resultante, una inmunoglobulina híbrida, conserva la estructura tridimensional del motivo insertado, que es un motivo polipeptídico de PrP en la realización ejemplificada. La inmunoglobulina híbrida no tiene la especificidad de unión a antígeno de la inmunoglobulina precursora.

Los Ejemplos a continuación describen la preparación de polipéptidos híbridos de ratón (véase la Figura 1). Para preparar un polipéptido híbrido ejemplar para PrP bovina, la región CDR3 del anticuerpo b12 (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.652.138 para la secuencia de aminoácidos completa y una descripción de la misma; véanse también las SEC ID N°: 1-4) expuesta como aminoácidos 119-131 (Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr de la SEC ID N°: 4) se eliminó y una porción de una PrP diana que se une específicamente a PrP<sup>Sc</sup>, tal como los restos aminoácidos 121-158, 89-112 ó 136-158 usando la nomenclatura del hámster sirio (véanse, por ejemplo, los aminoácidos 132-169 de la SEC ID N°: 13 para las secuencias bovinas correspondientes; véase también la Fig. 1), incluyendo Gly Gly en cualquier extremo, se insertó en la IgG y/o Fab. (Como se señala en la presente memoria toda la nomenclatura aquí corresponde a la secuencia de la PrP de hámster sirio que se usa comúnmente como referencia). Las secuencias se insertaron en lugar de Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr (véase la SEC ID N°: 4 y la FIG. 1).

También se prepararon una serie de insertos de PrP de 15-35 monómeros que abarcan la longitud de una secuencia primaria de PrP, desplazándose secuencialmente 10 aminoácidos desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal para identificar adicionalmente porciones de PrP necesarias para la interacción con conformaciones de tipo PrP<sup>Sc</sup> de la proteína.

La evaluación de la importancia relativa de restos de PrP<sup>C</sup> individuales en la interacción de PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup> implicaba la producción de Fab adicionales que contenían secuencia de PrP truncada y mutada. La aleatorización *in situ* de secuencias de PrP injertadas en armazón, seguida de la selección frente a partículas priónicas infecciosas, puede usarse para evolucionar moléculas de Fab para producir moléculas que posean una afinidad ultraelevada por PrP<sup>Sc</sup>. Los datos resultantes se usan experimentalmente para determinar directamente, a través del uso de nuevos

- transgenes de PrP, cómo las propiedades cinéticas de las interacciones de PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>Sc</sup> modulan la patogénesis de priones *in vivo*. Por último, la exploración para moléculas pequeñas que compitan con polipéptidos híbridos, tales como IgG o Fab híbridas 121-158, 136-158 ó 89-112, por la unión a PrP<sup>Sc</sup> producirá fármacos candidatos capaces de inhibir la replicación de priones y/o de neutralizar un inóculo de priones o fluido o tejido (incluyendo carne) que contenga priones. Dichos fármacos candidatos son agentes terapéuticos y/o profilácticos potenciales.
- 5
- Para estudiar la reactividad de las moléculas de PrP-Fab contra PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>Sc</sup> y PrP27-30, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando homogeneizado de cerebro preparado a partir de ratones normales y de ratones infectados con la cepa 79A de priones de tembladera. La PrP precipitada se detectó por transferencia de western.
- 10 Como controles positivos, se usaron el anticuerpo 6H4 (Korth et al. (1997) Nature 390: 74-77) y el anticuerpo D13 para precipitar la PrP<sup>c</sup> de homogeneizados de cerebro de ratón normal y plasminógeno (Fischer et al. (2000) Nature 408: 479-483)) para precipitar la PrP<sup>Sc</sup> a partir de muestras de cerebros infectados por priones. La reacción de PrP-Fab con PrP<sup>c</sup> en cerebro de ratón normal estaba ausente o era extremadamente débil.
- 15 Cada uno de estos Fab inmunoprecipitaban tres bandas de PrP a partir de un homogeneizado de cerebro infectado por priones digerido con pK. Estas bandas corresponden en tamaño a las formas di-, mono- y no glicosiladas de la PrP27-30, el núcleo resistente a proteinasa de la PrP<sup>Sc</sup> en el que la porción N-terminal de la proteína entre los restos 23-90 se ha degradado enzimáticamente.
- 20 El Fab 121-158 (Fig. 1b) que precipitaba la PrP27-30 con gran eficacia se evaluó a continuación para determinar su reactividad con PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa. También se evaluaron las IgG y Fab 80-112 y 136-158. Usando el Fab 121-158, por ejemplo, se precipitaron tres bandas de peso molecular de 33-35 K correspondientes a la PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa a partir de homogeneizado sin digerir de tejido de cerebro infectado por priones. En condiciones experimentales idénticas, el Fab b12 precursor no reaccionaba con PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>Sc</sup> o PrP27-30.
- 25 Se obtuvieron resultados similares con las IgG y Fab 89-112 y 136-158. Además, los Fab que contenían una secuencia de PrP ya no reconocían la gp120, el antígeno diana del anticuerpo b12 precursor, no se unían a ninguna otra proteína cuando se usaban para sondar transferencias de western de homogeneizado de cerebro de ratón y eran completamente no reactivos con la PrP<sup>Sc</sup> después de su desnaturalización a una conformación de tipo PrP<sup>c</sup> por calentamiento en presencia de SDS (no se muestran los datos). Por lo tanto, la secuencia de PrP injertada compuesta por los restos 121-158, 136-158 ó 89-112 dota de un reconocimiento de anticuerpo específico de PrP<sup>Sc</sup> y este epítipo asociado a enfermedad está conservado en la PrP27-30. Los restos injertados 136-158 conservan estas propiedades de unión y reconocimiento.
- 30
- 35 A continuación se usaron una serie de experimentos de inmunoprecipitación en los que se usó Fab o IgG 121-158 para inmunoprecipitar PrP a partir de lisados de células SMB infectadas por prión de tembladera (Chandler (1961) Lancet i: 1378-1379; Clarke et al. (1970) Nature 225:100-101). De nuevo, el Fab 121-158 no se unía a la PrP<sup>c</sup> en un lisado de SMB sin tratar pero era capaz de reconocer la PrP27-30 en estas muestras después de la digestión con pK. A diferencia de los experimentos anteriores en los que el Fab 121-158 precipitaba eficazmente la PrP<sup>Sc</sup> de homogeneizados de cerebro infectados por priones, no se inmunoprecipitaba la PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa a partir de células SMB usando este anticuerpo. Puesto que la proporción de PrP<sup>c</sup>:PrP<sup>Sc</sup> es de aproximadamente 4:1 en células SMB, pero puede ser considerablemente inferior a 1 en los cerebros de ratones infectados por priones con enfermedad avanzada (Safar et al. (1998) Nature Med. 4: 1157-1165), parece que en los lisados de SMB la PrP<sup>Sc</sup> está formando un complejo con la PrP<sup>c</sup> antes de la adición del anticuerpo. En estas circunstancias, la unión del Fab-IgG 121-158 que estaba diseñado originariamente para reconocer el epítipo de PrP<sup>Sc</sup> unido por PrP<sup>c</sup> se impediría. Por el contrario, en tejidos de cerebro enfermos una proporción de moléculas de PrP<sup>Sc</sup> permanecería sin formar complejos debido al exceso estequiométrico de PrP<sup>Sc</sup> sobre PrP<sup>c</sup> que se encuentra en estas preparaciones. Se realizaron experimentos similares (véanse, los EJEMPLOS) con los polipéptidos híbridos de IgG o Fab 136-158 u 89-112. En estos experimentos, las IgG, Fab 121-158, IgG o Fab 136-158 u 89-112 poseen la alta afinidad por
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El polipéptido de IgG o Fab 121-158 ó 136-158 contiene secuencias compuestas por la primera hélice  $\alpha$  de la PrP<sup>c</sup> (restos 145-155) (Fig. 1b). El Fab 119-136 y en menor medida el Fab 121-144 también se unían a formas asociadas a enfermedad de la PrP, indicando que la hélice  $\alpha$  no es necesaria para el reconocimiento específico de PrP<sup>Sc</sup> o PrP27-30. Resultados adicionales indican que el 89-112 se une a formas asociadas a enfermedad de la PrP. Otros resultados indican que la porción de restos de aproximadamente 100-106 de la región 89-112 es importante. De forma similar, los experimentos indican que los 136-141 son importantes para la unión. Las regiones 89-112 y 136-158 (y las porciones de las mismas) se unen a distintos epítipos.
- Los datos anteriores concuerdan con estudios en los que ratones transgénicos que carecen de la secuencia de PrP entre los restos 140 y 175 son susceptibles a infección con priones de ratón nativos, aunque con tiempos de incubación significativamente prolongados (Supattapone et al. (1999) Cell 96: 869-878). *In vivo*, la afinidad intrínseca del molde de PrP<sup>Sc</sup> por el "sustrato" de PrP<sup>c</sup> endógena puede ser un parámetro que gobierne la eficacia de la replicación de priones y por implicación, el transcurso patológico de la enfermedad por priones.
- La evaluación de la importancia relativa de los restos de PrP<sup>c</sup> individuales en la interacción de PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>Sc</sup> requiere la producción de Fab o Ig adicionales que contienen una secuencia de PrP truncada y mutada. Además, la



aleatorización *in situ* de secuencias de PrP con anticuerpos injertados, seguida de selección contra partículas priónicas infecciosas puede usarse para producir polipéptidos híbridos que posean una afinidad incluso mayor ( $K_a > 10^9$  mol/l para PrP<sup>Sc</sup>). Además, pueden usarse experimentalmente datos de estudios de la importancia de los restos particulares para determinar directamente, a través del uso de transgenes de PrP, cómo las propiedades cinéticas de las interacciones de PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>Sc</sup> modulan la patogénesis de los priones *in vivo*. Además, la exploración para moléculas pequeñas que compitan con IgG o Fab 121-158, 89-112 ó 136-158 por la unión a PrP<sup>Sc</sup> produce fármacos candidatos capaces de inhibir con gran potencia la replicación de priones y/o de neutralizar inóculos de priones.

Se obtienen resultados similares con Ig correspondientes tales como IgG (analizadas a continuación y en los EJEMPLOS). Como se analiza a continuación, también se prepararon PrP-IgG híbridas. Entre estas se incluyen IgG 121-158, IgG 89-112 e IgG 136-158 y fragmentos de las mismas. La IgG 121-158, IgG 89-112 e IgG 136-158 y ciertos fragmentos de las mismas poseen una alta afinidad por conformeros de PrP. Estos resultados indican de forma similar que la hélice  $\alpha$  no es imprescindible para el reconocimiento específico de la PrP<sup>Sc</sup> o PrP27-30.

Se han preparado polipéptidos híbridos adicionales usando el armazón de b12. Los aminoácidos 86-111 (basándose en la numeración del hámster sirio; véase la SEC ID N°: 9) N-terminal ... GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV ... C-terminal y las posiciones 86-117 N-terminal ... GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAA ... C-terminal (véase la SEC ID N°: 9) del prión de ratón se han insertado y han dado como resultado una molécula híbrida que se une específicamente a la forma infecciosa del prión. Otros incluyen los aminoácidos 89-112. Como se muestra en los ejemplos, son particularmente potentes los polipéptidos híbridos (también denominados en la presente memoria "anticuerpos" porque se insertan en un armazón de anticuerpo) que reconocen los restos 133-157, particularmente 136-158 y 96-104, particularmente 89-112.

#### IgG híbridas

Secuencias de PrP de ratón correspondientes a los aminoácidos 89-112 y 136-158 se injertaron en la HCDR3 de IgG1 b12 (Burton et al. (1994) Science 266: 1024-1207; véanse las SEC ID N°: 1-4), un anticuerpo recombinante humano específico para la gp120 del VIH-1, mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solapante. El anticuerpo b12 se seleccionó como la molécula destinataria para la secuencia de PrP trasplantada porque el anticuerpo precursor posee una HCDR3 relativamente larga (18 aminoácidos) que se proyecta verticalmente desde la superficie del sitio de unión a antígeno (Ollmann et al. (2001) Science 293: 1155-1159). Para distanciar lo máximo la secuencia de PrP de la superficie del anticuerpo, cada injerto se puso entre el primer resto N-terminal y cuatro restos C-terminales de la HCDR3 precursora (véanse las Figs. 1). Además, se incorporaron dos restos de glicina en cada flanco de la secuencia de PrP. Las PrP-IgG resultantes (89-112 y 136-158) se expresaron en células CHO y se purificaron hasta la homogeneidad (Maruyama et al. (1999) J. Virol. 73: 6024-6030).

Para estudiar la reactividad de las moléculas de PrP-IgG contra PrP<sup>c</sup> y PrP<sup>Sc</sup> y PrP27-30, se realizaron experimentos (descritos en el EJEMPLO 4) usando homogeneizados de cerebro preparados a partir de ratones normales y a partir de ratones infectados con las cepas en RML o 79A de priones de tembladera. La PrP precipitada se detectó por transferencia de western. Como controles positivos, se usó el Fab D13 y la IgG 6H4 (Korth et al. (1997) Nature 390: 74-77) para precipitar la PrP<sup>c</sup> de homogeneizados de cerebro de ratón normal y se usó plasminógeno para precipitar la PrP<sup>Sc</sup> de las muestras de cerebro infectadas por priones. La reacción de la PrP-IgG 89-112 ó 136-158 con la PrP<sup>c</sup> en el cerebro de ratón normal no se detectó cuando los anticuerpos se usaron a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml. La misma o menores concentraciones, cada una de estas IgG inmunoprecipitaba tres bandas de PrP a partir de homogeneizados de cerebro infectados por priones sin digerir y digeridos con pK. Estas bandas corresponden en tamaño a las formas di-, mono- y no glicosilada de la PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30, el núcleo resistente a proteinasa de la PrP<sup>Sc</sup>, en el que la porción N-terminal de la proteína entre los restos 23-90 se ha degradado enzimáticamente.

En condiciones experimentales idénticas, la IgG b12 precursora no reaccionaba con PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>Sc</sup> o PrP 27-30. Además, las IgG que contienen una secuencia de PrP ya no reconocían la gp120, el antígeno diana del anticuerpo b12 precursor, no se unían a ninguna otra proteína cuando se usaban para sondar transferencias de western de homogeneizado de cerebro de ratón y eran completamente no reactivas con PrP<sup>Sc</sup> después de su desnaturalización a una conformación de tipo PrP<sup>c</sup> por calentamiento en presencia de SDS (no se muestran los datos). Por lo tanto, la secuencia de PrP injertada compuesta por los restos 89-112 ó 136-158 dota de un reconocimiento de anticuerpo específico de PrP<sup>Sc</sup>, y estos epítomos asociados a enfermedad están conservados en la PrP 27-30.

Para demostrar adicionalmente que los injertos de PrP conferían especificidad por conformaciones de PrP asociadas a enfermedad, se construyó una molécula en la que los aminoácidos que comprendían el injerto 136-158 se desordenaron. El anticuerpo resultante, denominado PrP 136-158 aleatoria, mostraba solamente una reactividad vestigial con PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30 cuando se usaba en un ensayo de inmunoprecipitación a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml y ninguna reactividad cuando se empleaba una concentración de 3  $\mu$ g/ml. La especificidad por PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30 se perdía cuando el injerto de PrP 136-158 se truncaba N-terminalmente a restos 141-158k, indicando que la secuencia de PrP entre los restos 136 y 140 (ambos inclusive) es de importancia en las interacciones de PrP<sup>c</sup>-PrP<sup>Sc</sup>. De hecho, se ha demostrado previamente que una sola sustitución específica de hámster sirio en la posición 138 de la PrP de ratón inhibe significativamente la producción de PrP resistente a proteinasa K (Priola et al. (1995) J. Virol. 69: 7754-7758). Además, un dimorfismo natural en la posición equivalente de la PrP de cabra está vinculado con

una resistencia aumentada del hospedador a la infección con priones de oveja y bovino (Goldmann et al. (1996) J. Gen. Virol. 77: 2885-2891).

5 La interacción específica entre plasminógeno y PrP<sup>Sc</sup> depende de la presencia de detergente que altere las balsas lipídicas de membrana (Shaked et al. (2002) J. Neurochem. 82:1-5). Para determinar si las interacciones de unión entre las IgG 89-112 y 136-158 y la PrP<sup>Sc</sup> y la PrP 27-30 se veían afectadas por las condiciones de detergente, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación en paralelo en los que se preparó homogeneizado de cerebro de ratón infectado por priones usando NP-40 y desoxicolato sódico (DOC) (reactivos que alteran las balsas lipídicas de membrana) o Triton X-100 (un detergente que conserva la arquitectura de las balsas lipídicas). Los resultados  
10 indican que la reactividad de los anticuerpos injertados con PrP con PrP<sup>Sc</sup> no se ve afectada por las condiciones de detergente, y que la unión a PrP 27-30 se aumenta significativamente en presencia de Triton X-100. En condiciones equivalentes, la IgG b12 no se unía a PrP<sup>Sc</sup> ni a PrP 27-30. De forma similar, las IgG 89-112 y 136-158 no reconocían la PrP<sup>C</sup> en cerebro de ratón normal extraído en presencia de Triton X-100.

15 De estos anticuerpos con PrP injertada, la IgG 89-112 posee la mayor afinidad por confórmeros de PrP asociados a enfermedad. Para estimar la afinidad de esta molécula por PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30 se realizaron una serie de experimentos de inmunoprecipitación usando concentraciones decrecientes de anticuerpo. Las cantidades relativas de PrP precipitada a cada concentración de anticuerpo se visualizaron por inmunotransferencia y se cuantificaron por análisis densitométrico. La representación de los valores de densitometría frente a la concentración de anticuerpo produjo una curva de valoración a partir de la cual podían determinarse las concentraciones de anticuerpo que producían el 50% de las señales de unión máximas contra PrP<sup>Sc</sup> y PrP 27-30 y usarse para estimar las constantes de unión para estos antígenos. Los resultados indican que IgG 89-112 posee afinidades aparentes de aproximadamente 2 nM para PrP 27-30 y 7 nM para PrP<sup>Sc</sup> (véase la Fig. 3).

25 Estos datos ilustran que la estrategia de injertado de motivos ha identificado al menos dos regiones independientes de la secuencia de PrP que poseen una especificidad y afinidad intrínsecas notablemente elevadas por epítomos que se encuentran exclusivamente en la PrP<sup>Sc</sup> y la PrP 27-30. Usando experimentos similares con polipéptidos híbridos adicionales que contienen diferentes secuencias de PrP, puede evaluarse la importancia relativa de restos de PrP<sup>C</sup> individuales en la interacción de PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>. La aleatorización *in situ* de secuencias de PrP injertadas en anticuerpos  
30 (u otros protocolos de evolución) seguida de la selección frente a partículas priónicas infecciosas puede producir moléculas que posean una afinidad ultraelevada por PrP<sup>Sc</sup>.

Los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria pueden usarse para explorar para moléculas pequeñas que compitan con las IgG (o Fab) 89-112 y 136-158 por la unión a PrP<sup>Sc</sup> para producir fármacos  
35 candidatos capaces de inhibir con gran potencia la replicación de priones.

### **C. Moléculas de ácido nucleico, vectores, plásmidos, células y métodos para la preparación de los polipéptidos híbridos**

40 Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria. Dichas moléculas pueden introducirse en plásmidos y vectores para su expresión en células hospedadoras adecuadas.

#### **Plásmidos, vectores y células**

45 También se proporcionan plásmidos y vectores que contienen las moléculas de ácido nucleico. Se proporcionan células que contienen los vectores, incluyendo células que expresan las proteínas codificadas. La célula puede ser una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula animal. Se proporcionan en la presente memoria métodos para producir un polipéptido híbrido, por ejemplo,  
50 cultivando la célula en condiciones por las que el polipéptido codificado se exprese por la célula, y recuperando la proteína expresada. Las células se usan para la expresión de la proteína, que puede secretarse o expresarse en el citoplasma. Los polipéptidos híbridos también pueden sintetizarse químicamente usando métodos convencionales de síntesis de proteínas.

55 Cualquier método conocido por los expertos en la materia para la inserción de fragmentos de ácido nucleico en un vector puede usarse para construir vectores de expresión que contienen un gen quimérico que contiene señales de control de la transcripción/traducción apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas sintéticas y de ADN recombinante *in vitro* y recombinantes *in vivo* (recombinación genética). La expresión de ácido nucleico que codifica el polipéptido híbrido puede regularse por una segunda secuencia de ácido  
60 nucleico de modo que los genes o fragmentos de los mismos se expresen en un hospedador transformado con la molécula o moléculas de ADN recombinantes. Por ejemplo, la expresión de las proteínas se puede controlar por cualquier promotor/potenciador conocido en la técnica. Los promotores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, Nature 290: 304-310 (1981)), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., Cell 22: 787-797 (1980)), el promotor de timidina quinasa de herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445 (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster et al., Nature 296: 39-42 (1982)); vectores de expresión  
65

procariotas tales como el promotor de  $\beta$ -lactamasa (Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731 1978)) o el promotor *tac* (DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983)); véase también "Useful Proteins from Recombinant Bacteria": en Scientific American 242: 79-94 (1980)); vectores de expresión de plantas que contienen el promotor de la nopalina sintetasa (Herrar-Estrella et al., Nature 303: 209-213(1984)) o el promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner et al., Nucleic Acids Res. 9: 2871 (1981)), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifsosfato carboxilasa (Herrera-Estrella et al., Nature 310: 115-120 (1984)); elementos promotores de levaduras y otros hongos tales como el promotor Gal4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina, y las regiones de control de la transcripción animales siguientes que presentan especificidad de tejido y se han usado en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., Cell 38: 639-646 (1984); Ornitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409 (1986); MacDonald, Hepatology 7: 425-515 (1987)); región de control del gen de la insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan et al., Nature 315: 115-122 (1985)), región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., Cell 38: 647-658 (1984); Adams et al., Nature 318: 533-538 (1985); Alexander et al., Mol. Cell Biol. 7: 1436-1444 (1987)), región de control del gen del tumor mamario de ratón, que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., Cell 45: 485-495 (1986)), región de control del gen de albúmina, que es activa en hígado (Pinckert et al., Genes and Devel. 1: 268-276 (1987)), región de control del gen de la alfa-fetoproteína, que es activa en hígado (Krumlauf et al., Mol. Cell Biol. 5: 1639-1648 (1985); Hammer et al., Science 235: 53-58 (1987)), región de control del gen de la alfa-1 antitripsina, que es activa en hígado (Kelsey et al., Genes and Devel. 1: 161-171 (1987)), región de control del gen de beta globina, que es activa en células mieloides (Mogram et al., Nature 315: 338-340 (1985); Kollias et al., Cell 46:89-94 (1986)), región de control del gen de la proteína básica de mielina, que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead et al., Cell 48: 703-712 (1987)), región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina, que es activa en músculo esquelético (Sani, Nature 314: 283-286 (1985)) y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrófica, que es activa en los gonadotrofos del hipotálamo (Mason et al., Science 234: 1372-1378 (1986)).

En una realización específica, se usa un vector que contiene un promotor unido operativamente a ácido nucleico que codifica un polipéptido híbrido, o un dominio, fragmento, derivado u homólogo del mismo, uno o más orígenes de replicación y, opcionalmente, uno o más marcadores de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico). Los vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes o porciones de las mismas del polipéptido híbrido se generan, por ejemplo, por subclonación de las porciones codificantes en el sitio de restricción EcoRI de cada uno de los tres vectores pGEX (vectores de expresión con glutatión S-transferasa (Smith y Johnson, Gene 7: 31-40 (1988)). Esto permite la expresión de productos en la fase de lectura correcta. Los vectores y sistemas ejemplares para la expresión de polipéptidos híbridos incluyen los vectores de *Pichia* bien conocidos (disponibles, por ejemplo, en Invitrogen, San Diego, CA), particularmente los diseñados para la secreción de las proteínas codificadas. La proteína también puede expresarse citoplasmáticamente, tal como en los cuerpos de inclusión.

Los plásmidos para la transformación de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, los vectores de expresión pET (véase la Patente de Estados Unidos 4.952.496; disponibles en NOVAGEN, Madison, WI; véase también la bibliografía publicada por Novagen que describe el sistema). Dichos plásmidos incluyen pET 11 a, que contiene el promotor lac de T7, el terminador de T7, el operador lac de *E. coli* inducible y el gen represor de lac; pET 12a-c, que contiene el promotor de T7, el terminador de T7 y la señal de secreción ompT de *E. coli*; y pET 15b y pET19b (NOVAGEN, Madison, WI) que contienen una secuencia líder His-Tag™ para su uso en la purificación con una columna de His y un sitio de escisión por trombina que permite la escisión después de la purificación sobre la columna; la región promotora lac de T7 y el terminador de T7.

Los vectores se introducen en células hospedadoras, tales como células de *Pichia* y células bacterianas, tales como *E. coli*, y las proteínas se expresan en las mismas. Las cepas de *Pichia* ejemplares incluyen, por ejemplo, GS115. Los hospedadores bacterianos ejemplares contienen copias cromosómicas de ADN que codifica la ARN polimerasa de T7 unida operativamente a un promotor inducible, tal como el promotor lacUV (véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.952.496). Dichos hospedadores incluyen, pero sin limitación, la cepa de *E. coli* lisogénica BL21 (DE3).

#### D. Peptidomiméticos

Comúnmente se usan análogos de péptidos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido de molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "péptido miméticos" o "peptidomiméticos" (Luthman et al., A Textbook of Drug Design and Development, 14: 386-406, 2ª Ed., Harwood Academic Publishers (1996); Joachim Grante (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33: 1699-1720; Fauchere (1986) J. Adv. Drug Res., 15:29; Veber y Freidinger (1985) TINS, pág. 392; y Evans et al. (1987) J. Med. Chem. 30: 1229). Los peptidomiméticos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o aumentado. Los expertos en la materia conocen la preparación de peptidomiméticos y estructuras de los mismos. Se proporcionan en la presente memoria peptidomiméticos de los polipéptidos híbridos.

La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar péptidos más estables. Además,

pueden generarse péptidos limitados que contienen una secuencia de consenso o una variación de secuencia de consenso sustancialmente idéntica por métodos conocidos en la técnica (Rizo et al. (1992) An. Rev. Biochem., 61: 387, incorporada en la presente memoria por referencia); por ejemplo, por adición de restos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

Los expertos en la materia aprecian que pueden realizarse modificaciones en los péptidos y miméticos sin afectar perjudicialmente a la actividad biológica o funcional del péptido. Además, el experto en la materia sabría cómo diseñar estructuras no peptídicas en términos tridimensionales que mimeticen los polipéptidos híbridos (véase, por ejemplo, Eck y Sprang (1989) J. Biol. Chem., 26: 17605-18795).

Cuando se usan con fines de diagnóstico, los péptidos y peptidomiméticos pueden marcarse con un marcador detectable y, por consiguiente, los péptidos y peptidomiméticos sin dicho marcador pueden servir como intermedios en la preparación de péptidos y peptidomiméticos marcados. Los marcadores detectables pueden ser moléculas o compuestos que, cuando se unen covalentemente a los péptidos y peptidomiméticos, permiten la detección de los péptidos y peptidomiméticos *in vivo*, por ejemplo, en un paciente al que se ha administrado el péptido o peptidomimético, o *in vitro*, por ejemplo, en una muestra o células. Los marcadores detectables adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo, radioisótopos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína) y similares. El marcador detectable particular empleado no es crítico y se selecciona para que sea detectable a niveles no tóxicos. La selección de dichos marcadores está bien dentro de la especialidad en la técnica.

La unión covalente de un marcador detectable al péptido o peptidomimético se logra por métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el radioisótopo <sup>125</sup>I se emplea como marcador detectable, la unión covalente de <sup>125</sup>I al péptido o peptidomimético puede conseguirse incorporando el aminoácido tirosina en el péptido o peptidomimético y yodando después el péptido (véase, por ejemplo, Weaner et al. (1994) Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, págs. 137-140). Si no está presente tirosina en el péptido o peptidomimético, la incorporación de tirosina al extremo N- o C-terminal del péptido o peptidomimético puede conseguirse por química bien conocida. Asimismo, puede incorporarse <sup>32</sup>P en el péptido o peptidomimético como un resto fosfato a través de, por ejemplo, un grupo hidroxilo en el péptido o peptidomimético usando química convencional.

El marcaje de peptidomiméticos implica habitualmente la unión covalente de uno o más marcadores directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida) a una posición o posiciones no interferentes en el peptidomimético que se predicen por datos de estructura-actividad cuantitativos y/o modelado molecular. Dichas posiciones no interferentes son generalmente posiciones que no forman contactos directos con la macromolécula o macromoléculas con las que se une el peptidomimético para producir el efecto terapéutico. La derivatización (por ejemplo, marcaje) de peptidomiméticos no debería interferir sustancialmente con la actividad biológica o farmacológica deseada del peptidomimético.

## **E. Agentes de diagnóstico, terapéuticos, ensayos y otros usos de los polipéptidos híbridos**

Las moléculas híbridas proporcionadas en la presente memoria tienen una diversidad de usos. Pueden usarse en ensayos para detectar la presencia de un confórmero en una muestra, tal como un fluido corporal o muestra de tejido o una muestra de alimento o muestra de suelo u otra muestra de este tipo. Pueden usarse como agentes terapéuticos para tratar enfermedades; pueden usarse para explorar para fármacos candidatos y/o en el diseño de fármacos y agentes terapéuticos o de diagnóstico.

### **1. Agentes de diagnóstico y terapéuticos**

En virtud de la interacción específica de los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria y una forma causante de enfermedad (o implicada en enfermedad) o infecciosa de un polipéptido implicado en una enfermedad de la agregación (o conformación) de proteínas, dichos polipéptidos pueden usarse para detectar la presencia de la forma causante de enfermedad o infecciosa del polipéptido diana en una muestra, tal como en alimento o fluido corporal o muestra de tejido. Por ejemplo, los polipéptidos híbridos que interaccionan específicamente con PrP<sup>Sc</sup> pueden usarse para explorar sangre y otros tejidos.

Los polipéptidos híbridos proporcionados en la presente memoria pueden emplearse para fines de diagnóstico y terapéuticos. Como agentes de diagnóstico pueden usarse para ensayar y proteger el suministro de sangre y tejido y destinatarios de transplantes; para ensayar animales usados para alimentos. Los polipéptidos también pueden usarse en ensayos para identificar agentes terapéuticos candidatos.

En realizaciones particulares, se proporcionan reactivos y ensayos para detectar priones infecciosos en tejidos, órganos y muestras de fluido corporal de cualquier animal. Los reactivos pueden ponerse en un sustrato o en solución y una muestra ensayarse para determinar si la muestra contiene una forma patógena de una proteína priónica. Los reactivos se preparan para unirse a formas de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico sin ningún tratamiento, tal como desnaturalización de la proteína priónica. También pueden prepararse reactivos específicos de especie mediante los métodos de la presente memoria. Se proporcionan ensayos en fase homogénea y heterogénea.

Se proporcionan métodos para detectar una isoforma de polipéptido asociada con una enfermedad de la agregación de proteínas. Los métodos incluyen las etapas de poner en contacto una muestra sospechosa de contener la isoforma con un polipéptido híbrido que se une específicamente a la isoforma y detectar la unión del polipéptido. La detección puede efectuarse por cualquier método conocido por los expertos en la materia, incluyendo detección de radiomarcador, color o fluorescencia, espectrometría de masas y otros métodos de detección. Por ejemplo, el polipéptido híbrido puede marcarse de forma detectable o puede contener un resto o restos fluorescentes o cromogénicos, o puede ser un péptido fluorescente o cromogénico u otro indicador, tal como una enzima, incluyendo una luciferasa (de Renilla, Aequora y de otras criaturas de las profundidades del mar, de bacterias o insectos) u otro marcador enzimático. Como alternativa, dicho marcador, tal como una proteína o enzima fluorescente, puede servir como armazón en el que se inserta el motivo, de modo que se conserve la actividad enzimática o fluorescencia. Además, el polipéptido híbrido puede incluir sitios de unión adicionales para capturar anticuerpos o ácidos nucleicos u otros restos detectables.

En una realización, se proporciona un método para identificar la forma infecciosa o causante de enfermedad de un polipéptido diana en células. El polipéptido híbrido específico para la diana está marcado de forma detectable, tal como marcado fluorescentemente o insertado en una proteína fluorescente o una luciferasa, y se pone en contacto con una muestra, tal como una muestra de sangre. Se identifican las células marcadas, tal como por citometría de flujo y citometría de barrido. Están disponibles métodos e instrumentos para identificar concentraciones muy bajas de células marcadas entre células no marcadas (véase, por ejemplo, Bajaj et al. (2000) *Cytometry* 39: 285-294, Solicitud de Estados Unidos publicada de N° de Serie 09/123564, publicada como documento US2002018674, e instrumentos comercializados por Q3DM, LLC, San Diego). En una realización alternativa, se marcan los polipéptidos híbridos que interactúan con distintos epítopos, tales como polipéptidos híbridos que contienen restos de 136-158 y 89-112 con diferentes colorantes de color. Los polipéptidos híbridos marcados resultantes, tales como dos polipéptidos, se mezclan con las células a ensayar simultáneamente o de forma secuencial. La asociación de ambos colores con una sola célula proporciona un ensayo autoconfirmatorio. Por ejemplo, los motivos de PrP 136-158 y 89-112 (o porciones de los mismos suficientes para interactuar con un epítipo, tales como al menos los aminoácidos 100-106 ó 136-141) se injertan en una proteína fluorescente diferente, de modo que proteínas verdes fluorescentes con distintos espectros de emisión conseguirán el mismo doble marcaje de células individuales.

Los ensayos pueden realizarse en solución o en fase sólida. Los polipéptidos híbridos pueden proporcionarse en un soporte sólido, tal como una microplaca o placa de micropocillos, y ponerse en contacto con una muestra. En otras realizaciones pueden emplearse una pluralidad de polipéptidos híbridos diferentes, cada uno abordable, para permitir la identificación y/o detección de una pluralidad de polipéptidos diferentes indicativos de la presencia de un polipéptido asociado con una enfermedad de la agregación de proteínas.

Los ensayos pueden usarse para el diagnóstico de estas enfermedades por detección de la presencia de un polipéptido asociado con una enfermedad de la agregación de proteínas en una muestra biológica, o para controlar el suministro de fluidos corporales tales como sangre y órganos y tejidos para el trasplante, o para controlar el suministro de alimento para asegurar que no esté contaminado con estos polipéptidos.

En realizaciones particulares, se proporcionan métodos de detección de una forma de PrP<sup>Sc</sup> o PrP 27-30 de un polipéptido priónico. Una muestra sospechosa de contener una isoforma infecciosa de un polipéptido priónico se pone en contacto con un polipéptido híbrido que contiene una forma de PrP<sup>C</sup> de un polipéptido priónico o una porción de la misma o con un polipéptido priónico o porción del mismo; y se detectan los complejos del polipéptido híbrido y cualquier PrP<sup>Sc</sup> en la muestra. El polipéptido híbrido puede contener o puede tener desde todos o desde al menos aproximadamente 20, 25, 30, 35, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más restos aminoácidos contiguos hasta la longitud completa de una forma de PrP<sup>C</sup> de un polipéptido priónico. El prión puede ser un prión animal tal como un prión que se encuentre en seres humanos y otros primates, hámsteres, llamas, marsupiales, ratones, ratas, ciervos, ovejas, cabras, alces, kudú, caballos, perros, gatos, camellos, cerdos y otros animales domesticados comunes o de zoo.

Las muestras pueden ser muestras biológicas o cualquier otra muestra sospechosa de contener una proteína asociada con una enfermedad de la agregación de proteínas. Las muestras incluyen fluidos corporales, tejidos y órganos. Los fluidos corporales incluyen, pero sin limitación, sangre, orina, sudor, saliva, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, muestras de esperma y líquido sinovial, alimentos y otros productos derivados de tejidos animales, fluidos corporales y órganos, incluyendo fármacos y moléculas bioactivas tales como hormonas, citocinas y factores de crecimiento, anticuerpos y fracciones de la sangre.

Las enfermedades diagnosticadas o detectadas incluyen enfermedades amiloides, tales como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, incluyendo variante, esporádica y yatrogénica, tembladera y encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Alzheimer, Diabetes Tipo II, enfermedad de Huntington, amiloidosis por inmunoglobulinas, amiloidosis reactiva asociada con enfermedad inflamatoria crónica, por ejemplo, artritis inflamatoria, enfermedad granulomatosa del intestino, tuberculosis y lepra, amiloidosis sistémica hereditaria asociada con herencia autosómica dominante del gen de transtiretina variante, ALS, enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal, Diabetes Tipo II, mieloma múltiple, discrasias de células plasmáticas, polineuropatía amiloidótica familiar, carcinoma medular de tiroides; insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardíaca congestiva,

amiloidosis cardiaca y sistémica senil, inflamación crónica, aterosclerosis y amiloidosis familiar.

En una realización ejemplar, se realiza un ensayo por adición de un fluido corporal, tal como sangre o una muestra de tejido, tal como una biopsia de cerebro o una muestra de músculo con células opcionalmente retiradas a una solución que contiene uno o una pluralidad de polipéptidos híbridos. Separar opcionalmente los complejos del material que no esté formando complejos tal como por captura de los polipéptidos híbridos, que puede incluir un segundo sitio de unión específico para un agente de captura seleccionado, tal como un anticuerpo. Los complejos pueden identificarse después.

Para una superficie de ensayo en fase sólida puede recubrirse con PrP<sup>c</sup> o un polipéptido híbrido y después ponerse en contacto con una muestra, de modo que cualquier PrP<sup>Sc</sup> en la muestra se una a la PrP<sup>c</sup>. La detección puede efectuarse usando un reactivo específico de PrP<sup>Sc</sup> diferente que se une a diferentes complejos de sitio; o la PrP<sup>Sc</sup> capturada puede desnaturizarse, después de lo cual se repliega en PrP y se usan reactivos convencionales para detectarla.

## 2. Ensayos de exploración de fármacos

Un compuesto de ensayo capaz de prevenir o disminuir la cantidad de PrP<sup>Sc</sup> unida a un polipéptido híbrido es un candidato para su uso en la prevención o tratamiento *in vivo* de una enfermedad mediada por PrP<sup>Sc</sup>, tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), incluyendo variante, esporádica y/o yatrogénica, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar fatal (FFI), kuru, tembladera, encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) y cualquier otra enfermedad que implique la formación de PrP<sup>Sc</sup>. Un compuesto de ensayo identificado por dicho método como capaz de inhibir o disminuir la interacción *in vitro* de un polipéptido híbrido con PrP<sup>Sc</sup> puede ensayarse en un modelo *in vivo* de enfermedad por PrP<sup>Sc</sup> para determinar su capacidad para prevenir el desarrollo de o tratar una enfermedad por PrP<sup>Sc</sup>.

También se proporcionan exploraciones competitivas en bibliotecas, de modo que se identifican bibliotecas de moléculas pequeñas, que inhiben la unión de un polipéptido híbrido a su polipéptido diana. Por ejemplo, se identifican miembros de bibliotecas de moléculas pequeñas que modulan, particularmente disminuyen o inhiben competitivamente, la unión de polipéptidos híbridos específicos de PrP<sup>Sc</sup> a PrP<sup>Sc</sup> no desnaturizada o PrP 27-30. Dichos miembros de biblioteca identificados son compuestos candidatos para una exploración adicional.

De forma similar, pueden usarse polipéptidos híbridos específicos para otros polipéptidos diana implicados en enfermedades de la agregación de proteínas, tales como otras enfermedades amiloides, para identificar agentes terapéuticos candidatos para dichas enfermedades. Las bibliotecas pueden diseñarse basándose en farmacóforos u otras estructuras que sean específicas para una enfermedad particular.

## 3. Inmovilización y soportes o sustratos para la misma

En ciertas realizaciones, cuando los ensayos se realizan en soportes sólidos tales como perlas paramagnéticas, los polipéptidos de una muestra o, en general, los polipéptidos híbridos pueden unirse por enlace tal como iónico o covalente, no covalente u otra interacción química, a una superficie de un material de soporte o matriz. La inmovilización puede efectuarse directamente o mediante un enlazador. La inmovilización puede efectuarse sobre cualquier soporte adecuado, incluyendo, pero sin limitación, microplacas de silicio y otros soportes descritos en la presente memoria y conocidos por los expertos en la materia. Una pluralidad de polipéptidos pueden unirse a un soporte, tal como una matriz (es decir, un patrón de dos o más) en la superficie de una microplaca de silicio u otra microplaca para su uso en los ensayos, incluyendo en protocolos y formatos de alto rendimiento.

El material de matriz o los soportes sólidos contemplados en la presente memoria son generalmente cualquiera de los materiales insolubles conocidos por los expertos en la materia para inmovilizar ligandos y otras moléculas, y son los que se usan en muchas síntesis y separaciones químicas. Dichos soportes se usan, por ejemplo, en cromatografía de afinidad, en la inmovilización de materiales biológicamente activos, y durante síntesis químicas de biomoléculas, incluyendo proteínas, aminoácidos y otras moléculas orgánicas y polímeros. La preparación de y el uso de soportes es bien conocido por los expertos en la materia; se conocen muchos materiales de este tipo y preparaciones de los mismos. Por ejemplo, pueden aislarse materiales de soporte de origen natural, tales como agarosa y celulosa, a partir de sus fuentes respectivas, y procesarse de acuerdo con protocolos conocidos, y pueden prepararse materiales sintéticos de acuerdo con protocolos conocidos.

Los soportes son típicamente materiales insolubles que son sólidos, porosos, deformables o duros y tienen cualquier estructura y geometría necesarias incluyendo, pero sin limitación: perlas, gránulos, discos, capilares, fibras huecas, agujas, perlas paramagnéticas, fibras sólidas, formas aleatorias, películas finas y membranas. Por lo tanto, el artículo puede fabricarse a partir del material de matriz o combinarse con el mismo, tal como por recubrimiento de toda o parte de la superficie o impregnación de las partículas.

Típicamente, cuando la matriz está particulada, las partículas son de al menos aproximadamente 10-2000  $\mu\text{m}$ , pero pueden ser más pequeñas o más grandes dependiendo de la aplicación seleccionada. La selección de las matrices

está dirigida, al menos en parte, por sus propiedades físicas y químicas, tales como solubilidad, grupos funcionales, estabilidad mecánica, tendencia a hinchazón del área superficial, propiedades hidrófobas o hidrófilas y uso deseado.

5 Si es necesario, el material de matriz del soporte puede tratarse para contener un resto reactivo apropiado. En algunos casos, puede obtenerse en el mercado el material de matriz de soporte que ya contiene el resto reactivo. El material de matriz de soporte que contiene el resto reactivo puede servir por lo tanto como el soporte de matriz en el que se unen moléculas. Pueden producirse materiales que contienen restos de superficie reactivos tales como enlaces de aminosilano, enlaces hidroxilo o enlaces de carboxisilano por técnicas de química superficial bien establecidas que implican reacciones de silanización o similares. Los ejemplos de estos materiales son los que  
10 tienen restos de óxido de silicio superficiales unidos covalentemente a gamma-aminopropilsilano y otros restos orgánicos; ácido N-[3-(trietoxisilil)propil]ftelámico; y bis-(2-hidroxietil)aminopropiltrietoxisilano. Los ejemplares de materiales fácilmente disponibles que contienen funcionalidades reactivas con grupos amino incluyen, pero sin limitación, para-aminofeniltrietoxisilano. También son bien conocidos poliestirenos derivatizados y otros polímeros de este tipo y están disponibles fácilmente para los expertos en la materia (por ejemplo, las Resinas Tentagel®  
15 están disponibles con una multitud de grupos funcionales y se comercializan por Rapp Polymere, Tubingen, Alemania; véase la Patente de Estados Unidos N° 4.908.405 y la Patente de Estados Unidos N° 5.292.814; véase también Butz et al., *Peptide Res.*, 7: 20-23 (1994); y Kleine et al., *Immunobiol.*, 190: 53-66 (1994)).

20 Este material de matriz incluye cualquier material que pueda actuar como una matriz de soporte para la unión de las moléculas de interés. Dichos materiales son conocidos por los expertos en la materia e incluyen aquellos que se usan como matriz de soporte. Estos materiales incluyen, pero sin limitación, inorgánicos, polímeros naturales y polímeros sintéticos, incluyendo, pero sin limitación: celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, geles de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno reticulado con divinilbenceno y otros (véase, Merrifield, *Biochemistry*, 3: 1385-1390 (1964)), poliacrilamidas, geles de látex, poliestireno, dextrano, poliacrilamidas, goma, silicio, plásticos, nitrocelulosa, celulosas, esponjas naturales. Son de un interés particular en la presente memoria vidrios altamente porosos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.244.721) y otros preparados por mezcla de un borosilicato, alcohol y agua.

30 Los soportes sintéticos incluyen, pero sin limitación: acrilamidas, derivados de dextrano y copolímeros de dextrano, mezclas de agarosa-poliacrilamida, otros polímeros y copolímeros con diversos grupos funcionales, derivados y copolímeros de metacrilato, poliestireno y copolímeros de poliestireno (véase, por ejemplo, Merrifield, *Biochemistry*, 3: 1385-1390 (1964); Berg et al., en *Innovation Perspect. Solid Phase Synth. Collect. Pap., Int. Symp.*, 1 st, Epton, Roger (Ed), págs. 453-459 (1990); Berg et al., *Pept., Proc. Eur. Pept. Symp.*, 20th, Jung, G. et al. (Eds), págs. 196-198 (1989); Berg et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8024-8026 (1989); Kent et al., *Isr. J. Chem.*, 17: 243-247 (1979);  
35 Kent et al., *J. Org. Chem.*, 43: 2845-2852 (1978); Mitchell et al., *Tetrahedron Lett.*, 42: 3795-3798 (1976); Patente de Estados Unidos N° 4.507.230; Patente de Estados Unidos N° 4.006.117; y Patente de Estados Unidos N° 5.389.449). Dichos materiales incluyen los fabricados a partir de polímeros y copolímeros tales como alcoholes polivinílicos, acrilatos y ácidos acrílicos tales como polietileno-co-ácido acrílico, polietileno-co-ácido metacrílico, polietileno-co-etilacrilato, polietileno-co-metilacrilato, polipropileno-co-ácido acrílico, polipropileno-co-ácido metilacrílico, polipropileno-co-etilacrilato, polipropileno-co-metilacrilato, polietileno-co-acetato de vinilo, polipropileno-co-acetato de vinilo, y los que contienen grupos de anhídrido de ácido tales como polietileno-co-anhídrido maleico y polipropileno-co-anhídrido maleico. También se han usado liposomas como soportes sólidos para purificaciones por afinidad (Powell et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 33: 173 (1989)).

45 Se han desarrollado numerosos métodos para la inmovilización de proteínas y otras biomoléculas sobre soportes sólidos o líquidos (véase, por ejemplo Mosbach, *Methods in Enzymology*, 44 (1976); Weetall, *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*, (1975); Kennedy et al., *Solid Phase Biochemistry, Analytical and Synthetic Aspects*, Scouten, ed., págs. 253-391 (1983); véase, en general, *Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology*, Vol. 34, ed. W. B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, N.Y. (1974); y *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography, Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 42, ed. R. Dunlap, Plenum Press, N.Y. (1974)).

55 Entre los métodos usados más comúnmente están la absorción y la adsorción o la unión covalente al soporte, directamente o mediante un enlazador, tal como los numerosos enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces disulfuro obstaculizados y enlaces covalentes entre grupos reactivos libres, tales como grupos amina y tiol, conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, el PIERCE CATALOG, *ImmunoTechnology Catalog & Handbook*, 1992-1993, que describe la preparación de y el uso de dichos reactivos y proporciona una fuente comercial de dichos reactivos; Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking*, CRC Press (1993); véase también DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 6909 (1993); Zuckermann et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 10646 (1992); Kurth et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994); Ellman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 4708 (1994); Sucholeiki, *Tetrahedron Ltrs.*, 35: 7307 (1994); Su-Sun Wang, *J. Org. Chem.*, 41: 3258 (1976); Padwa et al., *J. Org. Chem.*, 41:3550 (1971); y Vedejs et al., *J. Org. Chem.*, 49:575 (1984), que describen enlazadores fotosensibles).

65 Para efectuar la inmovilización, una composición que contiene la proteína u otra biomolécula se pone en contacto con un material de soporte tal como alúmina, carbono, una resina de intercambio iónico, celulosa, vidrio o un cerámico. Se han usado polímeros de fluorocarbono como soportes a los que se han unidos biomoléculas por

adsorción (véase la Patente de Estados Unidos N° 3.843.443; Solicitud PCT Internacional Publicada WO/86 03840).

#### 4. Preparación de priones normalizada

5 Pueden producirse preparaciones de priones normalizadas para probar ensayos para mejorar de este modo la fiabilidad del ensayo. Se conocen detalles respecto a la generación de preparaciones de priones normalizadas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.639.581, la Patente de Estados Unidos N° 5.908.969 y la Patente de Estados Unidos N° 5.792.901). La preparación puede obtenerse a partir de cualquier animal, tal como un animal hospedador que tenga material cerebral que contenga priones de un animal de ensayo. Por ejemplo, un ratón transgénico que contiene un gen de proteína priónica humana puede producir priones humanos y el cerebro de dicho ratón puede usarse para crear una preparación de priones humanos normalizada. Además, en el sentido de que la preparación va a ser un "patrón", se obtiene generalmente de una batería (por ejemplo, 100, 1.000 o más animales) de animales sustancialmente idénticos. Por ejemplo, 100 ratones que contienen todos un número de copias muy elevado de genes de PrP humana (todos los polimorfismos y mutaciones) desarrollan espontáneamente la enfermedad y el tejido cerebral de cada uno puede combinarse para generar una preparación de priones normalizada.

20 Las preparaciones de priones normalizadas pueden producirse usando cualquiera de los mamíferos hospedadores modificados. Por ejemplo, pueden producirse preparaciones de priones normalizadas usando ratones, ratas, hámsteres o cobayas que estén modificados genéticamente para que sean susceptibles a la infección con priones que generalmente solo infectan a una especie genéticamente diversa tal como un ser humano, vaca, oveja o caballo, y dichos mamíferos hospedadores modificados desarrollarán signos clínicos de disfunción del SNC dentro de un periodo de tiempo de 350 días o menos después de la inoculación con priones. Un mamífero hospedador ejemplar es un ratón.

25 Una vez que se selecciona un tipo de hospedador apropiado, tal como un ratón, se selecciona un tipo apropiado de manipulación genética para producir una formulación de priones normalizada. Por ejemplo, los ratones pueden modificarse genéticamente por la inserción de un gen quimérico. Dentro de este grupo, los ratones pueden modificarse por inclusión de un elevado número de copias del gen quimérico y/o por inclusión de múltiples promotores para aumentar el nivel de expresión del gen quimérico. Como alternativa, ratones híbridos que tienen el gen de PrP endógena suprimido se cruzan con ratones que tienen un gen de PrP humana insertado en su genoma. Existen diversas subcategorías de dichos ratones híbridos. Por ejemplo, el gen de PrP humana puede insertarse en un elevado número de copias y/o usarse con múltiples promotores para aumentar la expresión. Como otra alternativa, los ratones pueden producirse por inserción de múltiples genes de PrP diferentes en el genoma para crear ratones que sean susceptibles a la infección con una diversidad de priones diferentes, es decir, que generalmente infectan a dos o más tipos de animales de ensayo. Por ejemplo, puede crearse un ratón que incluya un gen quimérico que incluya parte de la secuencia de un ser humano, un gen quimérico separado que incluya parte de la secuencia de una vaca y otro gen quimérico que incluya parte de la secuencia de una oveja. Si los tres tipos diferentes de genes quiméricos se insertan en el genoma del ratón, el ratón resultante es susceptible a la infección con priones que generalmente solamente infectan a seres humanos, vacas y ovejas.

45 Después de seleccionar el mamífero apropiado, tal como un ratón, y un modo adecuado de modificación genética, tal como inserción de un gen de PrP quimérico, se producen un gran número de dichos mamíferos que tienen un material genético sustancialmente idéntico relacionado con priones. Cada uno de los ratones producidos incluye un gen quimérico idéntico presente en el genoma en sustancialmente el mismo número de copias. Los ratones deberían ser suficientemente idénticos genéticamente en términos del material genético relacionado con priones para que el 95% o más de los ratones desarrollen signos clínicos de disfunción del SNC en los 350 días siguientes o menos después de la inoculación, y que todos los ratones desarrollen dicha disfunción del SNC aproximadamente a la vez, tal como, por ejemplo, separados por un intervalo de 30 días entre sí.

50 Una vez que se produce un grupo grande, por ejemplo, de 50, 100, 500 o más de dichos ratones, los ratones se inoculan con priones que generalmente sólo infectan a un mamífero genéticamente diverso, por ejemplo, priones de un ser humano, oveja, vaca o caballo. Las cantidades administradas a diferentes grupos de mamíferos pueden variarse. Después de la inoculación de los mamíferos con los priones, los mamíferos se observan hasta que los mamíferos presentan síntomas de infección por priones, por ejemplo, signos clínicos de disfunción del SNC.

55 Después de presentar los síntomas de infección por priones el cerebro, o al menos una porción del tejido cerebral de cada uno de los mamíferos, se extrae. El tejido cerebral extraído se homogeneiza para proporcionar la preparación de priones normalizada.

60 Como una alternativa a inocular el grupo de ratones transgénicos con priones a partir de un animal genéticamente diverso, es posible producir ratones que desarrollen espontáneamente enfermedades relacionadas con priones. Esto puede realizarse, por ejemplo, incluyendo un número de copias extremadamente elevado de un gen de PrP humana en un genoma de ratón. Cuando el número de copias se aumenta, por ejemplo, 100 o más copias, los ratones desarrollan espontáneamente signos clínicos de disfunción del SNC y tienen, dentro del tejido cerebral, priones que pueden infectar a seres humanos. Los cerebros de estos animales o porciones del tejido cerebral de estos animales pueden extraerse y homogeneizarse para producir una preparación de priones normalizada.



Las preparaciones de priones normalizadas pueden usarse directamente o pueden diluirse y titularse de una forma que proporcione una diversidad de diferentes controles positivos. Usando preparaciones de priones normalizadas es posible crear composiciones extremadamente diluidas que contienen los priones. Por ejemplo, puede crearse una composición que contiene una parte por millón o menos o incluso una parte por mil millones o menos. Dicha composición puede usarse para ensayar la sensibilidad de las proteínas híbridas, ensayos y métodos proporcionados en la presente memoria. Las preparaciones de priones son deseables en el sentido de que incluirán una cantidad constante de priones y se extraen de un fondo isogénico. Por consiguiente, los contaminantes en las preparaciones son constantes y controlables. Las preparaciones de priones normalizadas serán útiles para llevar a cabo bioensayos para determinar la presencia, si existe, de priones en diversos agentes farmacéuticos, sangre completa, fracciones sanguíneas, alimentos, cosméticos, órganos y, en particular, cualquier material que proceda de un animal (vivo o muerto) tal como órganos, sangre y productos de los mismos derivados de seres humanos vivos o muertos. Por lo tanto, las preparaciones de priones normalizadas son valiosas para validar protocolos de purificación en los que se adicionan preparaciones y se miden las reducciones en el título para un proceso particular.

## 15 F. Combinaciones y kits

Las moléculas híbridas, tales como los polipéptidos híbridos y cualquier otro reactivo y material para realizar los ensayos, se proporcionan como combinaciones que pueden envasarse como kits que contienen opcionalmente una etiqueta con instrucciones para realizar el ensayo. Por ejemplo, puede proporcionarse un polipéptido híbrido en solución, como una dispersión líquida o como un polvo sustancialmente seco, por ejemplo, en forma liofilizada. También puede incluirse un soporte sólido tal como las placas de soporte descritas anteriormente y uno o más tampones como elementos envasados por separado en un kit.

Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos solamente y no pretenden limitar el alcance de la invención.

## G. Ejemplos

### EJEMPLO 1

#### Materiales y métodos

**Inmunoprecipitación.** Cerebros completos de ratones normales o infectados con prión de tembladera 79A (sacrificados a los 130-150 días post-inoculación intracerebral) se homogeneizaron al 10% (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se diluyeron en un volumen equivalente de NaCl 200 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NP40 al 1% (o Triton X-100) y desoxicolato al 1%, después se volvieron a homogeneizar y se sonicaron. Los homogeneizados de cerebro normal o infectado con priones se aclararon a 500 g durante 15 min y los sobrenadantes se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C.

Una proporción del homogeneizado infectado con priones se digirió con proteinasa K (40 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Se añadió PMSF a estas muestras a una concentración final de 1 mM antes del almacenamiento a -20°C. Para cada inmunoprecipitación, se incubó polipéptido híbrido a una concentración final de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml con un volumen de homogeneizado de cerebro que contenía 1 mg o menos de proteína total durante 2 h a 4°C. Perlas paramagnéticas activadas con tosilo (Dynal) acopladas a F(ab')<sub>2</sub> policlonal de cabra anti-IgG humana (para la detección de Fab humanos) o a F(ab')<sub>2</sub> policlonal de cabra anti-IgG de ratón (para la detección de anticuerpo 6H4) se lavaron 3 veces en tampón de lavado (Tris 0,05 M, NaCl 0,2 M, que contenía Nonidet P40 al 2% y Tween 20 al 2% o TritonX-100), se incubaron después durante una noche a 4°C con la mezcla de polipéptido híbrido-homogeneizado. Las perlas se lavaron después 3 veces en tampón de lavado y una vez con TBS antes de la sedimentación por centrifugación.

Las perlas sedimentadas se resuspendieron en 20 µl de tampón de carga (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, dodecil sulfato sódico al 6% (SDS), azul de bromofenol al 0,3%, glicerol al 30%) y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Después las muestras se procesaron en geles de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en TBS que contenía Tween 20 al 0,1% (TBST) durante 10 min a temperatura ambiente y la PrP inmunotransferida se detectó con anticuerpo 6H4 o anticuerpo D13, que reconoce la PrP bovina normal (Korth et al. (1997) Nature 390: 74-77). La proteína PrP inmunotransferida se detectó por incubación durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Dako) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo. Después las membranas se lavaron 5 veces en TBST y se revelaron con reactivo de quimioluminiscencia aumentada (Amersham) sobre una película. Para los estudios de unión a plasminógeno, se incubaron 80 µg de plasminógeno humano biotinilado (Enzyme Research Laboratories) con 1 mg de homogeneizado de cerebro, después se capturó sobre perlas de agarosa recubiertas con estreptavidina. Las perlas se centrifugaron brevemente, se lavaron, se resuspendieron en tampón de carga, se calentaron, se volvieron a sedimentar y el eluido de perlas se recogió y se examinó para determinar la presencia de PrP precipitada por transferencia de western. **Células SMB.** Se cultivaron células SMB hasta la confluencia en matraces de cultivo de tejidos de 162 cm<sup>2</sup>, se lavaron dos veces con PBS, después se lisaron usando 1 ml por matraz de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, Nonidet P40 al 0,5% p/v, desoxicolato sódico al 0,5% p/v). El lisado celular se aclaró de residuos por

centrifugación a 1000 g durante 5 min a 4°C. Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación como se han descrito anteriormente usando 3 mg de proteína de lisado total y 10 µg de anticuerpo en un volumen final de 1 ml.

## EJEMPLO 2

5

### Preparación de polipéptidos híbridos con motivos injertados

Secuencias de PrP de ratón correspondientes a los restos aminoacídicos 119-136, 121-144 y 121-158 (o 136-158 y 89-112, véase el EJEMPLO 4) se injertaron independientemente para sustituir el dominio HCDR3 de Fab b12 (Burton et al. (1994) Science 266: 1024) usando una PCR de extensión por solapamiento de dos etapas (McLane et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 5214-5218; véase la Figura 1) o IgG b12 (véase el EJEMPLO 4).

Los cebadores oligonucleotídicos se sometieron a una purificación por electroforesis en gel de poli(acrilamida de dos veces (Operon Technologies) y contenían las secuencias siguientes: PelSeq (5'-ACCTATTGCCTAGGGCAGCCG-3'; SEC ID Nº: 14); CG1d (5'-GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGG-3'; SEC ID Nº: 15); MoPrP121-144 5' (5'-GGTGGCTACATGCTGGGGAGCGCCATGAGCAGGCCCATGATCCATTTGGCAACGACGGCGTTATATGGACG TCTGGGGCAAAGGGAC-3'; SEC ID Nº: 16); MoPrP121-144 3' (5'-CCTGCTCATGGCGCTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACTACCCCGCCACTCTCGACAATAATAAAA CAGCCGTGTCTGC-3'; SEC ID Nº: 17); MoPrP119-136 5' (5'-GTGGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGGAGCGCCATGAGCAGGGGCGTTATATGGACGTCTGGGGCAA GGGAC-3'; SEC ID Nº: 18); MoPrP119-136 3' (5'-CATGGCGCTCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCTACTGCCCCGCCACTCTCGACAATAATAAACAG C-3'; SEC ID Nº: 19); MoPrP121-158 5' (5'-GACCGTACTACCGTGAAAACATGTACCGTACCCTGGCGTTATATG GACGTCTGGGGCAAAGGG-3' SEC ID Nº: 20); MoPrP121-158 3' (5'-GCGGTACATGTTTTCACGGTAGTAGCGGTCCTCCAGTCGTTGCC AAAATGGATCATGGGCCTG-3'; SEC ID Nº: 21). Todas las regiones de PCR se realizaron con ADN Polimerasa Pfu (Stratagene) usando las condiciones siguientes: Etapa 1 (94°C, 30 s; 52°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 s; 35 ciclos); Etapa 2, (94°C, 30 s; 50°C, 1 min; 72°C, 2 min; 10 ciclos en ausencia de los cebadores flanqueantes PelSeq y CG1d, seguido de 30 ciclos adicionales después de la adición de los cebadores flanqueantes). Los fragmentos de cadena pesada de Fab b12 PrP resultantes se insertaron entre los sitios XhoI y SpeI de pComb3H (Burton et al. (1994) Science 266: 1024) que contenía el ADN de la cadena ligera del Fab b12 precursor. Para una descripción de la expresión en células CHO y de la preparación de polipéptidos híbridos de IgG véase el EJEMPLO 4.

## EJEMPLO 3

35

### Ensayo para la unión específica a formas patológicas de la PrP

Los ensayos están diseñados para identificar reactivos que se unan específicamente a PrP<sup>Sc</sup> y PrP27-30 (que es el núcleo resistente a proteasas infeccioso de la PrP<sup>Sc</sup>), pero no a PrP<sup>c</sup>, o con una afinidad sustancialmente inferior a PrP<sup>c</sup>.

Para estudiar la reactividad de las moléculas de PrP-Fab contra PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>Sc</sup> y PrP27-30, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando homogeneizado de cerebro preparado a partir de ratones normales y de ratones infectados con la cepa 79A de priones de tembladera. Se realizó la inmunoprecipitación como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se incubaron Fab b12 y los PrP-Fab 119-136, 121-144 y 121-158 con sobrenadante a partir de un homogeneizado centrifugado preparado a partir de cerebros completos de ratones normales. Los anticuerpos se precipitaron con F(ab')<sub>2</sub> policlonal de cabra anti-IgG humana unido a perlas paramagnéticas. Los precipitados se analizaron en transferencia de western para determinar la presencia de PrP. La reacción cruzada del anticuerpo secundario con los PrP-Fab que precipitaban produce bandas a aproximadamente 50 kDa. La PrP<sup>c</sup> se detectó en una muestra de homogeneizado de cerebro normal y se precipitaba específicamente por el anticuerpo de control 6H4. No se detectó PrP<sup>c</sup> después de la inmunoprecipitación con Fab b12 o con cualquiera de los PrP-Fab.

La PrP27-30 inmunoprecipitaba a partir de un homogeneizado centrifugado de cerebro de ratón infectado con prion 79A digerido con PK. La PrP 27-30 estaba presente en el homogeneizado bruto. Las bandas de PrP equivalentes estaban presentes después de la inmunoprecipitación con los PrP-Fab 119-136, 121-144 y 121-158. No era evidente PrP en los homogeneizados incubados con Fab b12, indicando que la especificidad de PrP 27-30 depende de las secuencias de PrP injertadas. Se detectó la inmunoprecipitación de PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa a partir de un homogeneizado centrifugado de cerebro de ratón infectado por priones sin digerir. La PrP<sup>Sc</sup> se precipitaba eficazmente por Fab 121-158, pero no por el Fab b12. También se observó PrP<sup>Sc</sup> precipitada por plasminógeno.

Como controles positivos, se usó el anticuerpo 6H4 para precipitar la PrP<sup>c</sup> a partir de homogeneizados de cerebro de ratón normal y plasminógeno (Fischer (2000) Nature 408: 479) para precipitar la PrP<sup>Sc</sup> a partir de muestras de cerebro infectadas por priones. La reacción de los PrP Fab con la PrP<sup>c</sup> en cerebro de ratón normal estaba ausente o era extremadamente débil. Cada uno de estos Fab inmunoprecipitaba tres bandas de PrP a partir de homogeneizado de cerebro infectado por priones digerido con pK. Estas bandas correspondían en tamaño a las formas di-, mono- y no glicosilada de la PrP27-30, el núcleo resistente a proteasas de la PrP<sup>Sc</sup>, en el que la porción N-terminal de la

proteína entre los restos 23-90 se ha degradado enzimáticamente. El Fab 121-158 (Fig. 1 B) que precipitaba la PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa. Usando este Fab, se precipitaron tres bandas de peso molecular de 33-35 K correspondientes a la PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa a partir de homogeneizado sin digerir de tejido de cerebro infectado por priones. En condiciones experimentales idénticas, el Fab b12 precursor no reaccionaba con PrP<sup>c</sup>, PrP<sup>Sc</sup> o PrP27-30. Además, los Fab que contenían una secuencia de PrP ya no reconocían la gp120, el antígeno diana del anticuerpo b12 precursor, no se unían a ninguna otra proteína cuando se usaban para sondar transferencias de western de homogeneizado de cerebro de ratón y eran completamente no reactivos con la PrP<sup>Sc</sup> después de su desnaturalización a una conformación de tipo PrP<sup>c</sup> por calentamiento en presencia de SDS. La secuencia de PrP injertada compuesta por los restos 121-158 dota de un reconocimiento de anticuerpo específico de PrP<sup>Sc</sup> y este epítipo asociado a enfermedad está conservado en la PrP27-30.

Se realizaron experimentos de inmunoprecipitación en los que se usó el Fab 121-158 para inmunoprecipitar la PrP a partir de lisados de células SMB infectadas con priones de tembladera. Se incubó Fab b12 y Fab 121-158 con lisados de células SMB que propagaban la cepa de prión de ratón Chandler. En ausencia de tratamiento con pK ni el Fab b12 ni el Fab 121-158 reconocían la PrP<sup>c</sup> o la PrP<sup>Sc</sup>. Después de la eliminación de la PrP<sup>c</sup> por digestión con pK, el Fab 121-158 precipitaba dos bandas claras de un tamaño por debajo de 30 kDa y una banda más difusa a aproximadamente 30 kDa. Este patrón de bandas se ha observado previamente para PrP<sup>Sc</sup> tratada con pK (PrP27-30) derivada de células SMB. La reacción cruzada del anticuerpo secundario con los PrP-Fab que precipitaban produce una banda a aproximadamente 50 kDa.

De nuevo, el Fab 121-158 no se unía a PrP<sup>c</sup> en el lisado de SMB sin tratar pero era capaz de reconocer la PrP27-30 en estas muestras después de la digestión con pK. A diferencia de los experimentos anteriores en los que el Fab 121-158 precipitaba eficazmente la PrP<sup>Sc</sup> a partir de homogeneizados de cerebro infectados por priones, no se inmunoprecipitaba PrP<sup>Sc</sup> de longitud completa a partir de células SMB usando este anticuerpo. Puesto que la proporción de PrP<sup>c</sup>:PrP<sup>Sc</sup> es de aproximadamente 4:1 en células SMB, pero puede ser considerablemente inferior a 1 en los cerebros de ratones infectados por priones con enfermedad avanzada, estas observaciones pueden explicarse mejor si, en los lisados de SMB, la PrP<sup>Sc</sup> está formando un complejo con la PrP<sup>c</sup> antes de la adición del anticuerpo. En estas circunstancias, la unión del Fab 121-158, que estaba originariamente diseñado para reconocer el epítipo de PrP<sup>Sc</sup> unido por la PrP<sup>c</sup>, podía impedirse. Por el contrario, en tejidos de cerebro enfermos una proporción de moléculas de PrP<sup>Sc</sup> permanecería probablemente sin formar complejos debido al exceso estequiométrico de PrP<sup>Sc</sup> sobre PrP<sup>c</sup> que se encuentra en estas preparaciones.

De las tres preparaciones de PrP Fab ensayadas en este Ejemplo, el Fab 121-158: posee la mayor afinidad por conformeros de PrP asociados a enfermedad. Este polipéptido híbrido era el único que contenía una secuencia que componía la primera hélice  $\alpha$  de la PrP<sup>c</sup> (restos 145-155). El Fab 119-136 y en menor medida el Fab 121-144, sin embargo, también se unían a formas asociadas a enfermedad de la PrP, indicando que la hélice A no es imprescindible para el reconocimiento específico de la PrP<sup>Sc</sup> o PrP27-30. Estos datos concuerdan con estudios en los que ratones transgénicos que carecen de la secuencia de PrP entre los restos 140 y 175 son susceptibles a la infección con priones de ratón nativos, aunque con tiempos de incubación significativamente prolongados. *In vivo*, la afinidad intrínseca del molde de PrP<sup>Sc</sup> por el "sustrato" de PrP<sup>c</sup> endógeno puede ser un parámetro clave que dirija la eficacia de la replicación de priones y, por implicación, el transcurso patológico de la enfermedad por priones.

Las moléculas de anticuerpo b12 con las secuencias de PrP siguientes injertadas en la CDR3 de cadena pesada (metodologías idénticas a las descritas para la construcción del 121-158 en el Ejemplo) también se han preparado (números de restos correspondientes a los números del hámster sirio) y han demostrado que reconocen específicamente la PrP<sup>Sc</sup>.

PrP de ratón: 87-112, 87-118, 87-130, 126-158, 131-158, 136-158, 141-158  
 PrP humana: 121-158 (129 M), 121-158 (129 V)  
 PrP bovina: 121-158, véanse los aminoácidos 132-169 de la SEC ID N°: 13

#### EJEMPLO 4

##### Preparación y ensayo de polipéptidos híbridos de IgG

Preparación de anticuerpos con motivos injertados. Secuencias de PrP de ratón correspondientes a los restos aminoácidos 89-112, 136-158 y 141-158 se injertaron independientemente para sustituir el dominio HCDR3 del anticuerpo b12 usando una PCR 19 de extensión por solapamiento de dos etapas. Los cebadores oligonucleotídicos se sometieron a purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida de dos veces (Operon Technologies) y contenían las secuencias siguientes: Pe1Seq (5'-ACCTATTGCCTACGGCAGCCG-3'; SEC ID N°: 14); CG1d (5'-GCATGTACTAGTTTTGTACACAAGATTTGG-3'; SEC ID N°: 15); MoPrP 89-112 (5'-CATAATCAGTGGAAACAAGCCCAGCAAACCAAAAACCAACCTCAAGCATGTGGCGGTTATATGGACGTCTGGGGCAAAGG-3' SEC ID N°: 22); MoPrP 89-112 3' (5'-GGGCTTGTTCCACTGATTATGGGTACCCCTCCTTGCCCATCCACCCAC TCTCGACAATAATAACAGC-3', SEC ID N°: 23); MoPrP136-158 5' (5'-

GTTTATTATTGTGCGAGAGTGGGCGGGAGGCCCATGATCCATTTTGGCAACGAC-3', SEC ID N°: 24); MoPrP136-158 3' (5'-GCGGTACATGTTTTACGGTAGTAGCGGTCTCCAGTCGTTGCCAAAATG GATCATGGGCCTG-3', SEC ID N°: 25); MoPrP141-158 5' (5'-GTTTATTATTGTGCGAGAGTGGGCGGGTTTGGCAACGACTGGGAGGACCGCTAC-3', SEC ID N°: 26).

5 Se introdujo un injerto de MoPrP 136-158 desordenada en el anticuerpo b12 usando los cebadores MoPrP 136-158 RAN 5' (5'-ATCTACCATATGTTTAACGGCGAAAACCGTGACTACTGGTACGAGCGCGACGGCGGTTATATGGACGTCTGGGG C-3', SEC ID N°: 27) y MoPrP 136-158 RAN 3' (5'-TTCGCCGTTAAACATATGGTAGATGCGCATGTAGGGAGGCCTCCCGCCCACTCTCGACAATAATAACAGT-3', SEC ID N°: 28).

15 Todas las reacciones de PCR se realizaron con ADN Polimerasa Pfu (Stratagene) usando las condiciones siguientes: Etapa 1, (94°C, 30 s; 52°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 s; 35 ciclos más una incubación de 10 min a 72°C); Etapa 2, (94°C, 30 s; 50°C, 1 min; 72°C, 2 min; 10 ciclos en ausencia de los cebadores flanqueantes PeISeq y CG1d, seguidos de 30 ciclos adicionales después de la adición de los cebadores flanqueantes, más una incubación de 10 min a 72°C). Los fragmentos de cadena pesada de b12 PrP resultantes se insertaron entre los sitios XhoI y SpeI del vector de presentación de Fab de fagémido pComb3H (disponible en New England Biolabs; véase también Barbas, III et al. (1995) *Methods: Comp. Meth. Enzymol* 8: 94-103), después se subclonaron en el vector pDR12 que contenía el gen de cadena ligera del b12 precursor para la expresión como IgG1 humana en células CHO (Maruyama et al. (1999) *J. Virol.* 73: 6024-6030).

### Inmunoprecipitación

25 Cerebros completos de ratones normales o infectados por priones de tembladera RML o 79A (sacrificados 130-150 días post-inoculación intracerebral) se homogeneizaron al 10% (p/v) en solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris 0,05 M, NaCl 0,2 M, pH 7,4 que contenía NP-40 al 1% y DOC al 1%), se diluyeron en un volumen equivalente de TBS, después se volvieron a homogeneizar y se sonicaron. Los homogeneizados de cerebro normal o infectado con priones se aclararon a 500 g durante 15 min a 4°C. Una proporción del homogeneizado infectado con priones aclarado se digirió con proteinasa K (50 µg/ml) durante 1 h a 37°C. Se añadió PMSF a todas las muestras a una concentración final de 2 mM. Para cada inmunoprecipitación, se incubó el anticuerpo a una concentración final de 0,3 µg/ml a 10 µg/ml durante 2 h a temperatura ambiente con una alícuota de homogeneizado de cerebro que contenía aproximadamente 1 mg de proteína total, en una mezcla de reacción ajustada a un volumen final de 500 µl con tampón de ensayo (TBS que contenía NP-40 al 3% y Tween 20 al 3%). Perlas paramagnéticas activadas con tosilo (Dynal) acopladas a F(ab')<sub>2</sub> policlonal de cabra anti-IgG humana (para la detección de polipéptidos híbridos con PrP humana injertada) o a F(ab')<sub>2</sub> policlonal de cabra anti-IgG de ratón (para la detección de Fab D13 e IgG 6H4) se añadieron a la mezcla de polipéptido híbrido-homogeneizado y se incubaron durante una noche a 4°C. Después, las perlas se lavaron cuatro veces en tampón de lavado (TBS que contenía NP-40 al 2% y Tween 20 al 2%) y una vez con TBS antes de la separación por un imán. Las perlas sedimentadas se resuspendieron en 20 µl de tampón de carga (Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, dodecil sulfato sódico (SDS) al 6%, azul de bromofenol al 0,3%, glicerol al 30%) y se calentaron a 100°C durante 5 min. Las muestras se procesaron después en geles de SDS-PAGE al 12% y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en TBS que contenía Tween 20 al 0,1% (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente y la PrP inmunotransferida se detectó con los anticuerpos Fab D13 o IgG 6H4 a 1 µg/ml. Después de 5 lavados en TBST, la proteína PrP inmunotransferida se detectó por incubación durante 30 min a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce), diluido 1:10.000 en tampón de bloqueo. Después, las membranas se lavaron 5 veces en TBST y se revelaron con reactivo de quimioluminiscencia aumentada (Amersham) sobre una película.

50 Para los estudios de unión a plasminógeno, se incubó plasminógeno humano biotinilado 100 µg/ml (Enzyme Research Laboratories) con 1 mg de homogeneizado de cerebro, después se capturó sobre perlas de agarosa recubiertas con estreptavidina. Las perlas se centrifugaron brevemente, se lavaron, se resuspendieron en tampón de carga, se calentaron, se volvieron a sedimentar y el eluido de perlas se examinó para determinar la presencia de PrP por transferencia de western como se ha descrito anteriormente. La inmunoprecipitación en presencia de Triton X-100 se realizó exactamente como se ha descrito anteriormente, excepto por que la homogeneización de cerebro y los tampones de reacción contenían Triton X-100 al 1% en lugar de detergentes NP-40/DOC.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The Scripps Research Institute  
Dennis R. Burton  
R. Anthony Williamson  
Gianluca Moroncini

10 <120> POLIPÉPTIDOS HÍBRIDOS CON MOTIVOS INJERTADOS Y USOS DE LOS MISMOS  
<130> 22908-1229PC

15 <140> No asignado todavía  
<141> 08-04-2003  
<150> 60/371.610  
<151> 09-04-2002

20 <160> 36  
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1  
<211> 729  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (9)...(715)  
<223> IgG Fab b12- Cadena ligera

<400> 1

ES 2 380 925 T3

```

agcttacc atg ggt gtg ccc act cag gtc ctg ggg ttg ctg ctg ctg tgg      50
      Met Gly Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
          1                    5                    10

ctt aca gat gcc aga tgt gag atc gtt ctc acg cag tct cca ggc acc      98
Leu Thr Asp Ala Arg Cys Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
  15                    20                    25                    30

ctg tct ctg tct cca ggg gaa aga gcc acc ttc tcc tgt agg tcc agt      146
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser
                    35                    40                    45

cac agc att cgc agc cgc cgc gta gcc tgg tac cag cac aaa cct ggc      194
His Ser Ile Arg Ser Arg Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly
                    50                    55                    60

cag gct cca agg ctg gtc ata cat ggt gtt tcc aat agg gcc tct ggc      242
Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly
          65                    70                    75

atc tca gac agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc      290
Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
  80                    85                    90

acc atc acc aga gtg gag cct gaa gac ttt gca ctg tac tac tgt cag      338
Thr Ile Thr Arg Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln
  95                    100                    105                    110

gtc tat ggt gcc tcc tgg tac act ttt ggc cag ggg acc aaa ctg gag      386

Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
          115                    120                    125

agg aaa cga act gtg cct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct      434
Arg Lys Arg Thr Val Pro Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
          130                    135                    140

gat gag cag ttg aaa tct ggg act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat      482
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
          145                    150                    155

aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc      530
Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
          160                    165                    170

ctc caa tgg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag      578
Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
          175                    180                    185                    190

gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac      626
Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
          195                    200                    205

tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg      674
Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
          210                    215                    220

agt tgg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt ta attctagaga      725
Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          225                    230                    235

atcc                                          729

```

<210> 2  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

```

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

```

```

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
      180      185      190
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
      195      200      205
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
      210      215      220
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      225      230      235

```

5 <210> 3  
 <211> 3282  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (15)...(452)  
 <223> IgG Fab b12- Cadena pesada

15 <400> 3

ES 2 380 925 T3

aattcgccgc cacc atg gaa tgg agc tgg gtc ttt ctc ttc ttc ctg tca	50
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser	
1 5 10	
gta act aca ggt gtc cac tcc cag gtt cag ctg gtt cag tcc ggg gct	98
Val Thr Thr Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala	
15 20 25	
gag gtg aag aag cct ggg gcc tca gtg aag gtt tet tgt cag gct tet	146
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser	
30 35 40	
gga tac aga ttc agt aac ttt gtt att cat tgg gtg cgc cag gcc ccc	194
Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro	
45 50 55 60	
gga cag agg ttt gag tgg atg gga tgg atc aat cct tac aac gga aac	242
Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn	
65 70 75	
aaa gaa ttt tca gcg aag ttc cag gac aga gtc acc ttt acc gcg gac	290
Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp	
80 85 90	
aca tcc gcg aac aca gcc tac atg gag ttg agg agc ctc agg tct gca	338
Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala	
95 100 105	
gac acg gct gtt tat tat tgt gcg aga gtg ggg cca tat agt tgg gat	386
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp	
110 115 120	
gat tct ccc cag gac aat tat tat atg gac gtc tgg ggc aaa gga acc	434
Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr	
125 130 135 140	
acg gtc atc gtg agc tca gcttcacca agggcccatc ggtcttcccc	482
Thr Val Ile Val Ser Ser	
145	
ctggcaccct cctccaagag cacctctggg ggacacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag	542



```

gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg 602
cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc 662
gtgccctcca gcagcttggg caccagacc tacatctgca acgtgaatca caagcccagc 722
aacaccaagg tggacaagaa agttggtgag aggccagcac agggaggag ggtgtctgct 782
ggaagccagg ctcagcgtc ctgctggac gcatcccggc tatgcagccc cagtccaggg 842
cagcaaggca ggccccgtct gcctcttcac ccggaggcct ctgcccgcc cactcatgct 902
cagggagagg gtctttctggc tttttcccca ggctctgggc aggcacaggc taggtgcccc 962
taaccagggc cctgcacaca aaggggcagg tgctgggctc agacctgcca agagccatat 1022
ccgggaggac cctgcccctg acctaagccc accocaaagg ccaaactctc cactccctca 1082
gctcggacac cttctctcct ccagattcg agtaactccc aatcttctct ctgcagagcc 1142
caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccc ggtaagccag cccaggcctc 1202
gcctccagc tcaaggcggg acaggtgccc tagagtagcc tgcatccagg gacaggcccc 1262
agccgggtgc tgacacgtcc acctccatct ctccctcagc acctgaggcc gcgggaggac 1322
catcagcttt cctcttcccc caaaaccca agggacacct catgatctcc cctgacctg 1382
aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag tccaactggt 1442
acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 1502
gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg 1562
agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 1622
aagccaaagg tgggaccctg ggggtgagag gggccacatgg acagaggccg gctcggccca 1682
ccctctggcc tgagagtgac cgtgtacca acctctgtcc ctacagggca cccccgagaa 1742
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg 1802
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1862
cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc 1922
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaaactt cttctcatgc 1982
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 2042
ggtaaatgag tgcgacggcc ggcaagcccc cgtctcccgg gctctcggc tcgcaagagg 2102
atgcttgga cgtacccctt gtacatactt cccgggcgcc cagcatggaa ataaagcaac 2162
cagcgtgccc ctgggcccct gcgagactgt gatggttctt tccacgggtc aggccgagte 2222
tgaggcctga gtggcatgag ggaggcagag cgggtcccac tgtcccaca ctggcccagg 2282
ctgtgcaggt gtgcctgggc cgcctagggg ggggctcagc caggggctgc cctcggcagg 2342
gtgggggatt tgccagcgtt gccctccctc cagcagcacc tgccctgggc tgggcccagg 2402
gaagccctag gagcccctgg ggacagacac acagcccctg cctctgtagg agactgtcct 2462
gttctgtgag cgcctgtccc tccgacctcc atgcccactc gggggcatgc ctagtccatg 2522
tgcgtaggga caggccctcc ctacccctc taccccacag gcactaaccc ctgggtgtcc 2582
tgcccaggct cgcaccgcga tggggacaca accgactccg gggacatgca ctctcgggcc 2642
ctgtggaggg actggtgcag atgcccacac acacactcag tccagaccg tccaacaaaa 2702
ccccgcact gaggttggcc ggccacacgg ccaccacaca cacacgtgca cgcctcacac 2762
acggagcctc acccggggca actgcacagc acccagacca gagcaaggtc ctgcacacg 2822
tgaacactcc tcggacacag gcccccacga gccccacgcg gcacctcaag gccacagagc 2882
ctctcggcag cttctccaca tgetgacctg ctcagacaaa cccagcccctc ctctcacaag 2942
ggtgcccctg cagccgccac acacacacag gggatcacac accacgtcac gtccttgccc 3002
ctggcccact tcccagtgcc gcccttccct gcagggcggg tcataatcag ccataccaca 3062
tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat 3122
aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3182
agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcatte tagttgtggt 3242
ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctagatcc 3282

```

<210> 4  
 <211> 146  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1           5           10           15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20           25           30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe
          35           40           45
Ser Asn Phe Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe
          50           55           60

```

10

ES 2 380 925 T3

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Ala Lys Phe Gln Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln  
 115 120 125  
 Asp Asn Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val  
 130 135 140  
 Ser Ser  
 145

<210> 5  
 <211> 254  
 5 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus (hámster sirio)

<400> 5

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

10 <210> 6  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 15 <213> Mesocricetus auratus (hámster armenio)

<400> 6

```

Met Ala Asn Leu Ser Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Ala Thr 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 Asn Lys Pro Lys Thr Ser 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 Leu 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 Val Lys Met Met Glu Arg
 195     200     205
Val Val Glu Gln Met Cys Val 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 Ile Val Gly
 245     250

```

- <210> 7
- <211> 254
- <212> PRT
- <213> Cricetulus griseus (hámster chino)
  
- <400> 7

5

ES 2 380 925 T3

```

Met Ala Asn Leu Ser Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Ala Thr 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 Val
      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 Leu 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 Val Lys Met Met Glu Arg

      195      200      205
Val Val Glu Gln Met Cys Val 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 Ile Val Gly
      245      250

```

<210> 8  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp  
 1 5 10 15'  
 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 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  
 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  
 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  
 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  
 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

<210> 9  
 <211> 254  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus (tipo A)

<400> 9

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  
 50 55 60

10

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> 10  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus (tipo B)

5

<400> 10

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  
 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 Phe 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 Val 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

10

<210> 11

ES 2 380 925 T3

<211> 256  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries (oveja)

5 <400> 11

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	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	

10 <210> 12  
 <211> 256  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries (oveja)

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 171  
 <223> R a Q

20 <400> 12

ES 2 380 925 T3

```

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 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 Gln 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

```

<210> 13  
 <211> 264  
 5 <212> PRT  
 <213> Bos taurus (bovino)  
 <400> 13



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	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			
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	
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			
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	
Phe	Leu	Ile	Phe	Leu	Ile	Val	Gly								
			260												

5 <210> 14  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador pelseq

<400> 14  
 acctattgcc tacggcagcc g 11

15 <210> 15  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador Cg1d

<400> 15  
 gcatgtacta gttttgtcac aagattgg 29

25 <210> 16  
 <211> 89  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Cebador Mopr121-144 5'

ES 2 380 925 T3

<400> 16

**ggtggctaca tgctggggag cgccatgagc aggcccatga tccattttgg caacgacggc 60**  
**ggttatatgg acgtctgggg caaagggac 89**

5 <210> 17  
 <211> 87  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador Mopr121-144 3'

<400> 17

**cctgctcatg gcgctcccca gcatgtagcc accaaggccc cccactaccc cgcccactct 60**  
**cgcacataa taaacagccg tgtctgc 87**

15 <210> 18  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador Mopr119-136 5'

25 <400> 18

**gtggggggcc ttggtggcta catgctgggg agcgccatga gcaggggagg ttatatggac 60**

**gtctggggca aagggac 77**

30 <210> 19  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador

<400> 19 Mopr119-136 3'

**catggcgctc cccagcatgt agccaccaag gccccccact actgccccgc ccaactctgc 60**  
**acaataataa acagc 75**

40 <210> 20  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador Mopr121-158 5'

50 <400> 20

**gaccgctact accgtgaaaa catgtaccgc taccctggcg gttatatgga cgtctggggc 60**  
**aaaggg 66**

<210> 21

ES 2 380 925 T3

<211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cebador Mopr121-158 3'  
  
 <400> 21

10

**gcggtacatg ttttcacggt agtagcggtc ctcccagtcg ttgccaaaat ggatcatggg 60**  
**cctg 64**

<210> 22  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cebador MoPrP 89-112 5'  
  
 <400> 22

20

**cataatcagt ggaacaagcc cagcaaacca aaaaccaacc tcaagcatgt gggcggttat 60**  
**atggacgtct ggggcaagg 80**

<210> 23  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Cebador MoPrP 89-112 3'  
  
 <400> 23

30

**gggcttgttc cactgattat ggtaccccc tccttggccc catccacca ctctgcaca 60**  
**ataataaaca gc 72**

35

<210> 24  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Cebador MoPrP136-158 5'  
  
 <400> 24

45

gtttattatt gtgcgagagt gggcgggagg cccatgatcc atttggcaa cgac 54

<210> 25  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Cebador MoPrP136-158 3'  
  
 <400> 25

55

ES 2 380 925 T3

```

    gcggtacatg tttcacggt agtagcggtc ctcccagtcg ttgccaaaat ggatcatggg 60
    cctg 64

5    <210> 26
    <211> 54
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> MoPrP141-158 5'

10   <400> 26

    gttattatt gtgcgagagt gggcggggtt ggcaacgact gggaggaccg ctac 54

15   <210> 27
    <211> 75
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

20   <220>
    <223> Cebador MoPrP 136-158 RAN 5'

    <400> 27

    atctaccata tgtttaacgg cgaaaaccgt gactactggt acgagcgcga cggcgggttat 60
    atggacgtct ggggc 75

25   <210> 28
    <211> 72
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

30   <220>
    <223> Cebador MoPrP 136-158 RAN 3'

35   <400> 28

    ttgcgcggtta aacatatggt agatgcgcat gtagggaggc ctcccgccca ctctcgcaca 60
    ataataaaca gt 72

40   <210> 29
    <211> 486
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Cadena ligera de D13

    <221> CDS
    <222> (1)... (486)

50   <400> 29

```

ES 2 380 925 T3

atg gcc gag ctc cag atg acc cag tct cca ctc act ttg tgg gtt gcc	48
Met Ala Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Val Ala	
1 5 10 15	
att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta	96
Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu	
20 25 30	
gtt agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag agg cca ggc	144
Val Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly	
35 40 45	
cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga	192
Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly	
50 55 60	
gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg	240
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu	
65 70 75 80	
aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tat tgc tgg	288
Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp	
85 90 95	
caa ggt aca cat ttt cct cag acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa	336
Gln Gly Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu	
100 105 110	
atc aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc	384
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser	
115 120 125	
agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg aac	432
Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn	
130 135 140	
aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc agt	480
Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser	
145 150 155 160	
gaa cga	486
Glu Arg	

<210> 30  
 <211> 162  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera de D13

10

<400> 30

ES 2 380 925 T3

```

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

<210> 31  
 <211> 372  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena pesada de D13

<221> CDS  
 <222> (1)...(372)

<400> 31

ES 2 380 925 T3

```

atg gcc gag gtg cag ctg ctc gag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
1 5 10 15

cca ggg gcc tca gtc aaa ttg tcc tgc aca acc tca ggc tta aac att 96
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asn Ile
20 25 30

gaa gac tac tat att cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg 144
Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
35 40 45

gag tgg att gga agg att gat cct gag aat ggt gaa act tta tat gcc 192
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Leu Tyr Ala
50 55 60

ccg gaa ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tca tcc aac 240
Pro Glu Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
65 70 75 80

aca gtc tac cta cag ctc aga agc ctg aca tct gag gac act gcc atc 288
Thr Val Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile
85 90 95

tat tac tgt ggg aga ttt gat ggc aac ggc tgg tac ctc gat gtc tgg 336
Tyr Tyr Cys Gly Arg Phe Asp Gly Asn Gly Trp Tyr Leu Asp Val Trp

```

100

105

110

```

ggc gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc aaa 372
Gly Ala Gly Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys
115 120

```

<210> 32  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena pesada de D13

10

<400> 32

```

Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
1 5 10 15
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asn Ile
20 25 30
Glu Asp Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Glu Asn Gly Glu Thr Leu Tyr Ala
50 55 60
Pro Glu Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
65 70 75 80
Thr Val Tyr Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile
85 90 95
Tyr Tyr Cys Gly Arg Phe Asp Gly Asn Gly Trp Tyr Leu Asp Val Trp
100 105 110
Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys
115 120

```

15 <210> 33  
 <211> 648

ES 2 380 925 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena ligera de D18

5

<221> CDS  
<222> (1)...(648)

10

<400> 33

```

atg gcc gag ctc gtg ctc acc cag tct cca gca ttc atg tct gca tct 48
Met Ala Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Ser
  1                    5                    10                    15

cca ggg gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gta aat 96
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn
  20                    25

tac atg cac tgg tac cag cag aag tca ggc acc tcc ccc aaa aga tgg 144
Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
  35                    40                    45

att tat gac aca tcc aaa ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt 192
Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
  50                    55                    60

ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
  65                    70                    75                    80

gct gaa gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg agt agt aac ccg 288
Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
  85                    90                    95

tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg gct gat gct 336
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
  100                    105                    110

gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt gag cag tta aca tct 384
Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
  115                    120                    125

gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg aac aac ttc tac ccc aaa gac 432
Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
  130                    135                    140

atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc agg gaa cga caa aat ggc gtc 480
Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Arg Glu Arg Gln Asn Gly Val
  145                    150                    155                    160

ctg aac agt tgg act gat cag gac agc aaa gac agc acc tac agc atg 528
Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
  165                    170                    175

agc agc acc ctc acg ttg acc gag gac gag tat gaa cga cat aac agc 576
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Glu Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
  180                    185                    190

tat acc tgt gag gcc act cac aag aca tca act tca ccc att gtc aag 624
Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
  195                    200                    205

agc ttc aac agg aat gag tgt taa 648
Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys *
  210                    215

```



ES 2 380 925 T3

<210> 34  
 <211> 215  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera de D18

<400> 34

10

```

Met Ala Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Ser
 1           5           10           15
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn
           20           25           30
Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp
           35           40           45
Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
           50           55           60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
           65           70           75           80
Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
           85           90           95
    
```

```

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala
           100           105           110
Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser
           115           120           125
Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp
           130           135           140
Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Arg Glu Arg Gln Asn Gly Val
           145           150           155           160
Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
           165           170           175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Glu Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
           180           185           190
Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
           195           200           205
Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
           210           215
    
```

<210> 35  
 <211> 672  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cadena pesada de D18

20

<221> CDS  
 <222> (1)... (672)

<400> 35

25

ES 2 380 925 T3

```

atg gcc gag gtg cag ctg ctc gag cag tca gga cct gag ctg gtg aag 48
Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
1 5 10 15

cct ggg tct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct aga tac aca ttc 96
Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Arg Tyr Thr Phe
20 25 30

act gac tac aac atg gac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aga ctt 144
Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu
35 40 45

gag tgg att gga tat att tat cct aac act ggt gtt act ggc tac aac 192
Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Thr Gly Val Thr Gly Tyr Asn
50 55 60

cag agg ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aag tcc tcc agc 240
Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
65 70 75 80

aca gcc tac atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 288
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
85 90 95

tat tac tgt gca gga ttt tac tac ggt atg gac tat tgg ggt caa gga 336
Tyr Tyr Cys Ala Gly Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat 384
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
115 120 125

cca ctg gcc cct gga tct gct gcc caa act aac tcc atg gtg acc ctg 432
Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
130 135 140

gga tgc ctg gtc aag ggc tat ttc cct gag cca gtg aca gtg acc tgg 480
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
145 150 155 160

aac tct gga tcc ctg tcc agc ggt gtg cac acc ttc cca gct gtc ctg 528
Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

cag tat gac ctc tac act atg agc agc tca gtg act gtc ccc tcc agc 576
Gln Tyr Asp Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

acc tgg ccc agc gag acc gtc acc tgc aac gtt gcc cac ccg gcc agc 624
Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

agc acc aag gtg gac aag aaa att gtg ccc agg gat tgt act agc taa 672
Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Thr Ser *
210 215 220

```

5 <210> 36  
 <211> 223  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cadena pesada de D18

<400> 36

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido híbrido que comprende:

5 un motivo polipeptídico de una proteína priónica; y  
un armazón que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que conserva al menos una porción de la  
unión específica del anticuerpo de longitud completa, en el que:

10 el motivo polipeptídico comprende al menos los restos 89-105, 89-112, 95-112, 121-131, 121-141, 121-  
136, 121-144, 121-158, 87-112, 87-118, 87-130, 119-136, 126-158, 131-158, 136-158 ó 141-158 de un  
polipéptido priónico de hámster sirio que tiene una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 5, o los restos  
correspondientes de un prión de otra especie;  
el armazón contiene al menos 10 restos aminoácidos; y  
15 el polipéptido híbrido se une a la forma de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico.

2. El polipéptido híbrido de la reivindicación 1, que es multimérico.

3. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que es un dímero.

20 4. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es un trímero.

5. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el motivo polipeptídico se inserta dentro  
del armazón.

25 6. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el armazón es una inmunoglobulina o un  
fragmento de la misma.

7. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el armazón incluye una región constante  
de una inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD o IgE.

30 8. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el armazón es un Fab, F(ab)2 o Fv de  
cadena sencilla.

35 9. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el prión es de un animal seleccionado  
del grupo que consiste en seres humanos, hámsteres, ratones, ratas, ciervos, ovejas, cabras, alces, kudú, caballos,  
perros, gatos, camellos y cerdos.

10. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el prión está codificado por una forma  
mutante de un alelo codificante de prión.

40 11. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la porción priónica del polipéptido  
consiste esencialmente en los restos 121-131, 121-141, 121-136, 121-144, 121-158, 87-112, 87-118, 87-130, 126-  
158, 131-158, 136-158 ó 141-158 de un polipéptido priónico de hámster sirio que tiene una secuencia expuesta en la  
SEC ID N°: 5, o los restos correspondientes de un prión de otra especie.

45 12. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la porción priónica del polipéptido  
consiste esencialmente en los restos 136-158, 89-105, 89-112 ó 95-112 de un polipéptido priónico de un polipéptido  
priónico de hámster sirio que tiene una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 5, o los restos correspondientes de un  
prión de otra especie.

50 13. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende los restos que incluyen al  
menos una hélice alfa de la forma de PrPc del prión.

14. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el armazón comprende el anticuerpo  
55 b12 (Número de Acceso de la ATCC 69079) o un fragmento del mismo.

15. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el armazón comprende el anticuerpo  
b12 (Número de Acceso de la ATCC 69079) o un fragmento en el mismo, en el que el motivo polipeptídico se inserta  
60 en lugar de los restos 119-131 de la SEC ID N°: 4.

16. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que:

el armazón comprende las cadenas pesada y ligera del anticuerpo b12 (Número de Acceso de la ATCC  
69079);  
65 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4; y  
la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

17. El polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que:  
 el armazón es un polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo; y  
 el motivo polipeptídico se inserta dentro de la tercera región determinante de complementariedad (CDR) de la  
 5 molécula de inmunoglobulina.
18. El polipéptido híbrido de la reivindicación 17, que es un fragmento Fab.
19. El polipéptido híbrido de la reivindicación 17, que es una inmunoglobulina.
- 10 20. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-19.
21. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 20.
- 15 22. El vector de la reivindicación 21, que es un vector de expresión.
23. El vector de la reivindicación 21, que es un vector eucariota.
24. El vector de la reivindicación 21, que incluye una secuencia de nucleótidos que dirige la secreción de cualquier  
 20 polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos unida operativamente a la misma.
25. El vector de la reivindicación 21, que es un vector de mamífero, un vector de levadura o un vector bacteriano.
26. El vector de la reivindicación 21, que es un vector viral, un vector de *Pichia* o un vector de *E. coli*.
- 25 27. Una célula, que comprende un vector de la reivindicación 21.
28. La célula de la reivindicación 27, que es una célula procariota.
- 30 29. La célula de la reivindicación 27, que es una célula eucariota.
30. La célula de la reivindicación 27, que se selecciona de entre una célula bacteriana, una célula de levadura, una  
 célula vegetal, una célula de insecto y una célula de animal.
- 35 31. La célula de la reivindicación 27, que es una célula de mamífero.
32. Un método de detección de una forma de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico, que comprende:  
 poner en contacto una muestra sospechosa de contener una isoforma infecciosa de un polipéptido priónico con  
 40 un polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1-19;  
 detectar la unión a cualquier PrP<sup>Sc</sup> en la muestra.
33. El método de la reivindicación 32, en el que la muestra es un fluido corporal, un tejido u órgano.
- 45 34. El método de la reivindicación 32, en el que el prión es un prión de animal seleccionado del grupo que consiste  
 en seres humanos, hámsteres, ratones, ratas, ciervos, ovejas, cabras, alces, kudú, caballos, perros, gatos, camellos  
 y cerdos.
35. El método de la reivindicación 32, en el que la muestra es un fluido corporal que se selecciona del grupo que  
 50 consiste en sangre, orina, sudor, saliva, líquido cefalorraquídeo, muestras de esperma, suero, plasma y líquido  
 sinovial.
36. El método de la reivindicación 32, en el que el polipéptido híbrido está marcado de forma detectable.
- 55 37. El método de la reivindicación 32, en el que el armazón comprende toda o una porción de una enzima, un  
 anticuerpo o una molécula fluorescente o cromogénica.
38. Un soporte sólido que comprende una pluralidad de polipéptidos híbridos de cualquiera de las reivindicaciones 1-  
 19.
- 60 39. Un método de detección de células que contienen una forma de PrP<sup>Sc</sup> de un polipéptido priónico, que  
 comprende:  
 poner en contacto células de un animal o tejido con un polipéptido híbrido de cualquiera de las reivindicaciones  
 1-19, en el que el polipéptido híbrido está marcado de forma detectable o comprende un armazón detectable; y  
 65 detectar las células marcadas *in vitro*.

40. El método de la reivindicación 39, en el que el marcador es un marcador fluorescente.
41. El método de la reivindicación 40, en el que la detección se efectúa por citometría de flujo o citometría de barrido.
- 5 42. El método de la reivindicación 39, en el que las células se ponen en contacto con una pluralidad de polipéptidos híbridos diferentes.
- 10 43. El método de la reivindicación 42, en el que los polipéptidos híbridos se unen a distintos epítomos en un polipéptido diana.
44. El método de la reivindicación 39, en el que el polipéptido híbrido comprende un armazón detectable.
- 15 45. El método de la reivindicación 44, en el que el armazón detectable comprende una proteína luminiscente o una porción luminiscente de la misma.
46. El método de la reivindicación 45, en el que la proteína luminiscente es una proteína fluorescente (FP).
- 20 47. El método de la reivindicación 46, en el que la FP se selecciona del grupo que consiste en una FP verde, una FP roja, una FP azul y variantes de las mismas que tienen espectros de emisión distintos.
48. El método de la reivindicación 39, en el que las células son células infectadas por priones.

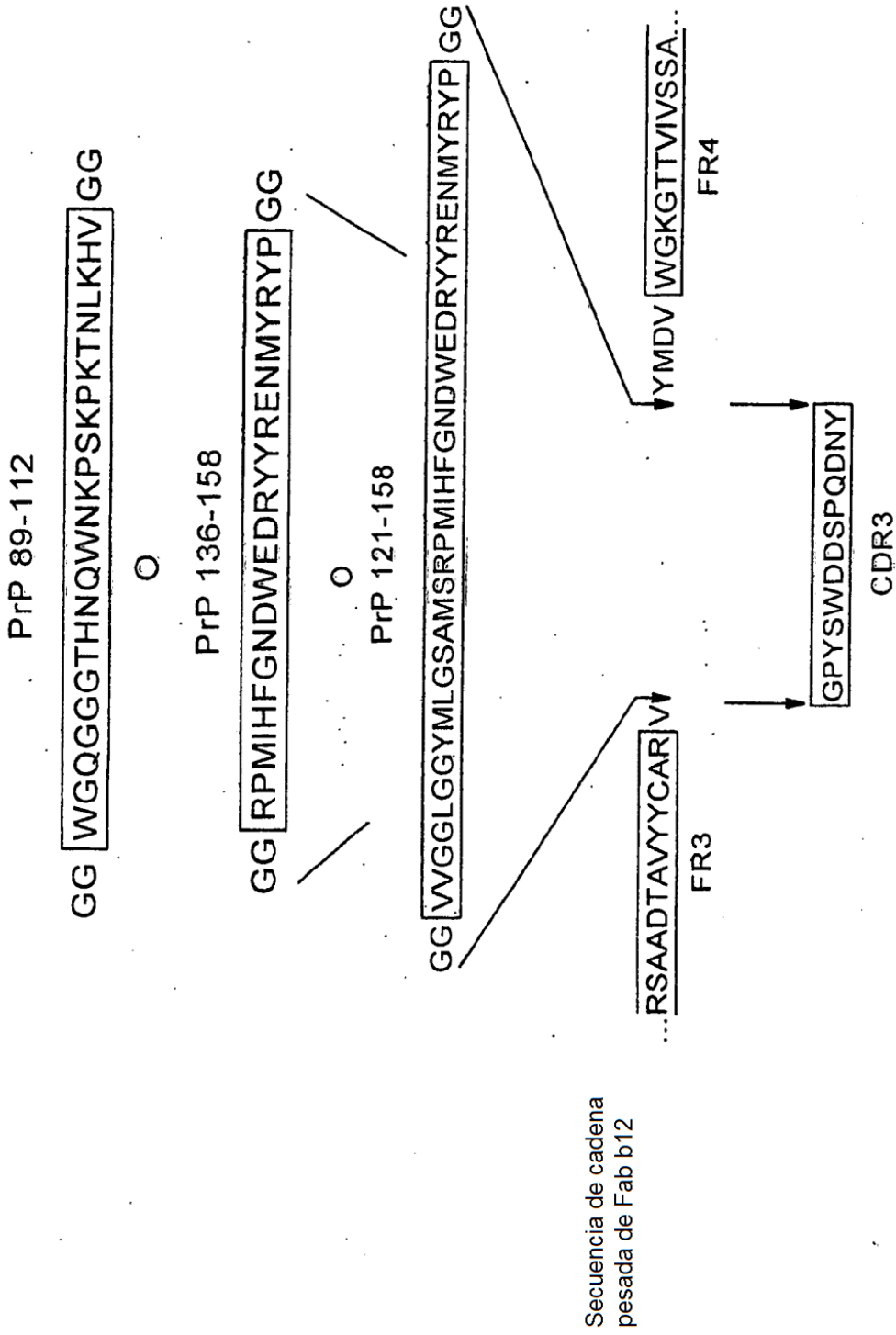
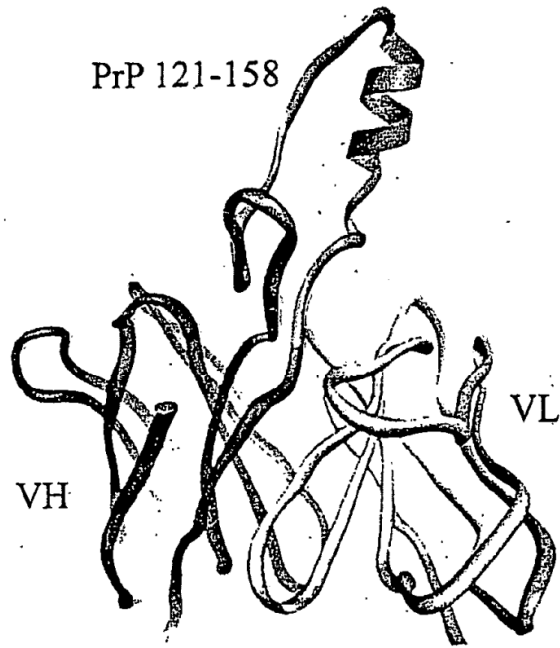


FIG. 1A



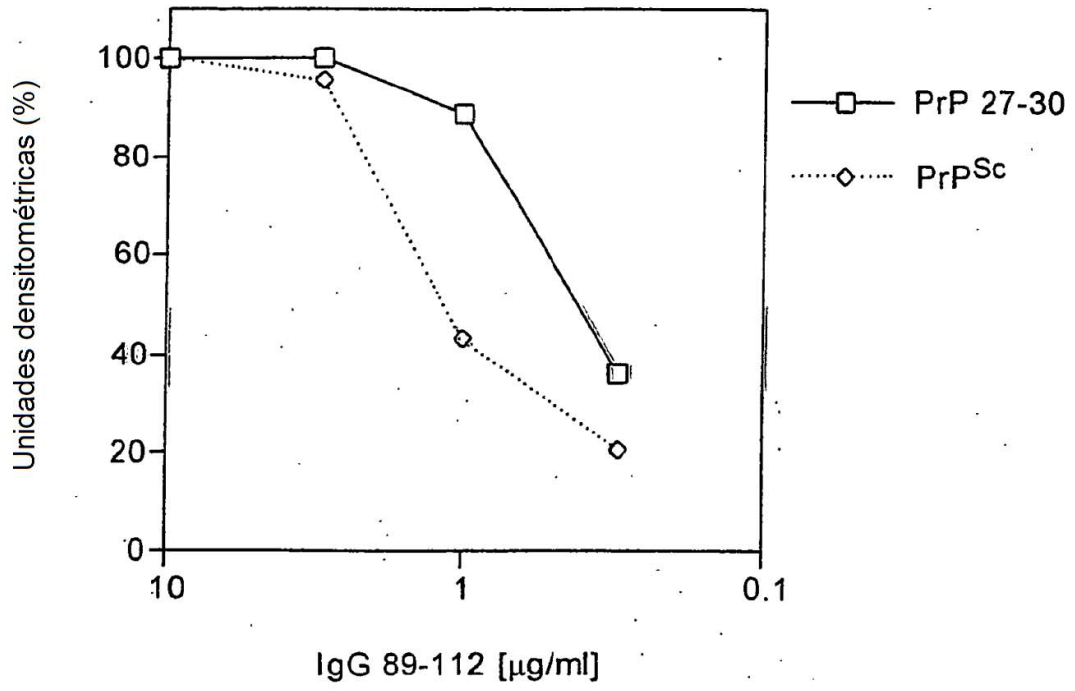
**FIG. 1B**



1	11	21	31	41	51	61	71	81		
Hámster sirio	MANL--SYWLLA	LFVAMWTDVG	LCKRKP-KG	WNTGSRYPG	QGSFGRNRP	PQGGTGWQP	HGGGWGQ-----PHG	GGWQPHGGG	WGQPHGG-GWG	
Hámster armenio	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
Hámster chino	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....		
Humano	---GC.M.V	.....T.S.L.	.....	.....	.....G.....	.....	.....	.....S.....		
Ratón tipo A	.....G.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....S.....		
Ratón tipo B	---G.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....S.....		
Oveja	.VKSHIGS.I.V	.....S.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....	.....G.....		
Bovino	MYKSHIGSWILV	LFVAMWSDVG	LCKRKP-KG	WNTGSRYPG	QGSFGRNRP	PQGGGWSQP	HGGGWQPHGGG	GGWQPHGGG	WGQPHGGGGWG	
Hámster sirio	91	101	111	121	131	141	151	161	171	181
Hámster armenio	QGGGTHNQMN	KPSKPKTNMK	HMAGAAAGA	VVGLGGYML	GSAMSREPMH	FGNQWEDRY	RENMRYPNQ	VYRYPVDQYN	NONNFVHDCV	NITIKQHTV
Hámster chino	.....	.....N.....S.....	.....	.....	.....	.....L.....	.....	.....	.....	.....
Humano	.....S.....	.....	.....V.....	.....	.....	.....L.....	.....	.....	.....	.....
Ratón tipo A	.....	.....L.....	.....	.....	.....	.....I.....	.....	.....	.....	.....M.E.S.....
Ratón tipo B	.....	.....F.....	.....	.....	.....	.....I.....	.....	.....	.....	.....S.....
Oveja	.....S.S.....	.....	.....V.....	.....	.....	.....I.....	.....	.....	.....	.....S.....
Bovino	QGG-THGQWN	KPSKPKTNMK	HVAGAAAGA	VVGLGGYML	GSAMSRELIH	FGSDYEDRY	RENMRYPNQ	VYRYPVDQYS	NONNFVHDCV	NITVREHTVT
Hámster sirio	191	201	211	221	231	241	251			
Hámster armenio	TTTTKGENFTE	TDIKIMERVV	EQMCTTQYOK	ESQAYDQRR	SS-AVLFSSPP	VILLISFLIF	LMVG			
Hámster chino	.....	.....V.M.....	.....V.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Humano	.....	.....V.M.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ratón tipo A	.....	.....V.M.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Ratón tipo B	.....	.....V.M.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Oveja	.....	.....V.M.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Bovino	TTTTKGENFTE	TDIKIMERVV	EQMCTTQYOR	ESQAYQ-RG	AS-VILFSSPP	VILLISFLIF	LIVG			

- Como se presentan aquí, todas las secuencias se alinearon con la secuencia de SHa. Sólo para los hámsteres los números son correctos a lo largo de toda la secuencia.
- La secuencia humana tiene una delección en el aminoácido 228. La numeración proporcionada aquí está aumentada en 1 a partir de este punto.
- Las secuencias de ratón tienen una delección en el aminoácido 55 y una inserción en 232/3. La numeración proporcionada aquí está aumentada en 1 entre estos puntos.
- Las secuencias de oveja y bovino tienen varias inserciones y delecciones; en la región central equivalente a SHa 94-228, la numeración proporcionada aquí está disminuida en 3 (11 para la secuencia bovina con la octarrepeticion adicional).
- La octarrepeticion adicional en la secuencia bovina (SUBRAYADA) es un polimorfismo no patógeno que no siempre aparece.

**FIG. 2**



**FIG. 3**