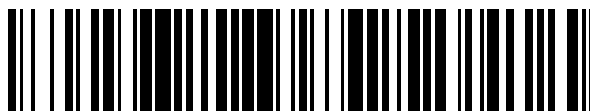


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 394**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2004 E 04781105 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1653844**

54 Título: **Reactivos peptídicos específicos de prión**

30 Prioridad:

13.08.2003 US 494962 P

12.05.2004 US 570368 P

09.07.2004 US 586509 P

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

15.03.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)

4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US

72 Inventor/es:

MICHELITSCH, MELISSA D.;
HU, CELINE;
ZUCKERMANN, ROLAND N. y
CONNOLLY, MICHAEL D.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 394 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

Reactivos peptídicos específicos de prión

Campo de la invención

La invención se refiere a reactivos peptídicos que interaccionan con proteínas priónicas, polinucleótidos que codifican estos reactivos peptídicos, procedimientos para generar anticuerpos usando tales reactivos peptídicos y polinucleótidos, y a anticuerpos generados usando estos procedimientos. La invención se refiere además a procedimientos para usar estos reactivos peptídicos para detectar la presencia de priones patógenos en una muestra y a procedimientos para usar estos reactivos peptídicos como componentes en una composición terapéutica o profiláctica.

Antecedentes

Las enfermedades conformacionales proteicas incluyen una diversidad de enfermedades no relacionadas, incluyendo encefalopatías espongiformes transmisibles, que surgen de transición conformacional aberrante de una proteína (una proteína de enfermedad conformacional) que a su vez conduce a auto-asociación de las formas de proteína aberrantes, con deposición de tejido y daño posterior. Estas enfermedades también comparten similitudes sorprendentes en presentaciones clínicas, típicamente una progresión rápida de diagnóstico a enfermedad después de diversos tiempos de incubación.

Un grupo de enfermedades conformacionales se denomina "enfermedades priónicas" o "encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE)". En seres humanos estas enfermedades incluyen enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), Insomnio Familiar Letal y Kuru (véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, Isselbacher y col., eds., McGraw-Hill, Inc. Nueva York, (1994); Medori y col. (1992) N. Engl. J. Med. 326: 444-9.). En animales las TSE incluyen tembladera de ovejas, encefalopatía espongiforme bovina (BSE), encefalopatía transmisible del visón y enfermedad de debilitamiento crónico de ciervo mulo y alce en cautividad (Gajdusek, (1990) Subacute Spongiform Encephalopathies: Transmissible Cerebral Amyloidoses Caused by Unconventional Viruses. pág. 2289-2324 en: Virology, Fields, ed. Nueva York: Raven Press, Ltd.). Las encefalopatías espongiformes transmisibles se caracterizan por las mismas evidencias: la presencia de la conformación anómala (resistente a proteinasa K, rica en beta) de la proteína priónica que transmite la enfermedad cuando se inocula de forma experimental a animales de laboratorio incluyendo primates, roedores y ratones transgénicos.

Recientemente, la rápida propagación de encefalopatía espongiforme bovina y su correlación con la elevada aparición de encefalopatías espongiformes en seres humanos ha conducido a un aumento significativo del interés en la detección de encefalopatías espongiformes transmisibles en mamíferos no humanos. Las trágicas consecuencias de la transmisión accidental de estas enfermedades, (véase, por ejemplo, Gajdusek, Infectious Amyloids, y Prusiner Prions en Fields Virology. Fields, y col., eds. Lippincott-Ravin, Pub. Philadelphia (1996); Brown y col. (1992) Lancet, 340: 24-27), dificultades de descontaminación (Asher y col. (1986) páginas 59-71 E: Laboratory Safety: Principles and Practices, Miller ed. Am. Soc. Microb.), y la reciente preocupación acerca de la encefalopatía espongiforme bovina (British Med. J. (1995) 311: 1415-1421) subrayan la urgencia para tener tanto un ensayo de diagnóstico que identificaría seres humanos y animales con encefalopatías espongiformes transmisibles como terapias para sujetos infectados.

Los priones son el patógeno infeccioso que provoca encefalopatías espongiformes (enfermedades priónicas). Los priones difieren significativamente de bacterias, virus y viroides. La hipótesis dominante es que, a diferencia de todos los demás patógenos infecciosos, la infección está provocada por una conformación anómala de la proteína priónica, que actúa como un molde y convierte las conformaciones priónicas normales en conformaciones anómalas. Se caracterizó por primera vez una proteína priónica a principios de los años 80 (véase, por ejemplo, Bolton, McKinley y col. (1982) Science 218: 309-1311; Prusiner, Bolton y col. (1982) Biochemistry 21: 942-6950; McKinley, Bolton y col. (1983) Cell 35: 57-62). Desde entonces los genes que codifican la proteína priónica completa se han clonado, secuenciado y expresado en animales transgénicos. Véase, por ejemplo, Basler, Oesch y col. (1986) Cell 46: 417-428.

La característica clave de las enfermedades priónicas es la formación de una proteína de forma anómala (PrP^{Sc}), también denominada proteína de tembladera, a partir de la forma normal (celular o no patógena) de proteína priónica (PrP^C). Véase, por ejemplo, Zhang y col. (1997) Biochem. 36(12): 3543-3553; Cohen y Prusiner (1998) Ann Rev. Biochem. 67: 793-819; Pan y col. (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 10962-10966; Safar y col. (1993) J Biol Chem 268: 20276-20284. Los estudios de espectroscopía óptica y cristalografía han revelado que las formas relacionadas con enfermedad de priones están sustancialmente enriquecidas en estructura de lámina beta en comparación con las formas no de enfermedad plegadas predominantemente de forma alfa-helicoidal. Véase, por ejemplo, Wille y col. (2001) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99: 3563-3568; Peretz y col. (1997) J. Mol. Biol. 273: 614-622; Cohen y Prusiner, Capítulo 5: Structural Studies of Prion Proteins en PRION BIOLOGY AND DISEASES, ed. S. Prusiner, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, pág. 191-228). Los cambios estructurales parecen seguirse de alteraciones en las propiedades bioquímicas: PrP^C es soluble en detergentes no desnaturizantes, PrP^{Sc} es insoluble; PrP^C se digiere

fácilmente por proteasas, mientras que PrP^{DSc} es parcialmente resistente, lo que da como resultado la formación de un fragmento truncado en el extremo N terminal conocido como "PrPres" (Baldwin y col. (1995); Cohen y Prusiner (1995)), "PrP 27-30" (27-30 kDa) o forma "resistente a PK" (resistente a proteinasa K). Además, PrP^{Sc} puede convertir PrP^C a la conformación patógena. Véase, por ejemplo, Kaneko y col. (1995) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 92: 11160-11164; Caughey (2003) Br Med Bull. 66: 109-20.

La detección de las isoformas patógenas de proteínas de enfermedad conformacional en sujetos vivos y muestras obtenidas de sujetos vivos ha resultado difícil. Por lo tanto, el diagnóstico definitivo y los tratamientos paliativos para estas afecciones transmisibles y que contienen amiloide antes de la muerte del sujeto siguen siendo un reto sustancialmente no superado. El examen histopatológico de biopsias del cerebro es arriesgado para el sujeto y pueden pasarse por alto lesiones y depósitos amiloides dependiendo de donde se tome la muestra de biopsia. Sin embargo, aún existen riesgos implicados en las biopsias para animales, pacientes y personal de cuidados sanitarios. Además, los resultados de ensayos cerebrales en animales habitualmente no se obtienen hasta que el animal ha entrado en el suministro alimentario. Además, los anticuerpos generados contra péptidos priónicos reconocen tanto PrP^{Sc} desnaturalizado como PrP^C pero son incapaces de reconocer de forma selectiva PrP^{Sc} infeccioso (desnaturalizado). (Véase, por ejemplo, Matsunaga y col. (2001) PROTEINS: Structure, Function and Genetics 44: 110-118).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones y procedimientos para detectar la presencia de proteínas priónicas patógenas en diversas muestras, por ejemplo en muestras obtenidas de sujetos vivos, en muestras sanguíneas, en animales de granja y en otros suministros alimentarios humanos y animales. Además, sigue existiendo la necesidad de procedimientos y composiciones para diagnosticar y tratar enfermedades relacionadas con priones.

Sumario de la invención

La invención proporciona un reactivo peptídico aislado que interacciona preferentemente con PrP^{Sc} en comparación con PrP^C, siendo dicho reactivo peptídico un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 12, 14-15, 22, 26-31, 33-37, 39-43, 45-48, 50-63, 65-69, 71-73, 77, 81-82, 84-85, 87-94, 96-101 y 103-132 o un análogo o derivado de los mismos, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, incluyendo opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.

La invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende: (a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo peptídico de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo peptídico con la proteína priónica patógena, si está presente, para formar un primer complejo; y (b) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra por su unión con un reactivo peptídico.

La invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende: (a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo de unión a prión en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de unión a prión con la proteína priónica patógena, si está presente, para formar un primer complejo, (b) que comprende opcionalmente una o ambas de las etapas de (i) retirar materiales de muestra no unidos; y (ii) disociar dicho prión patógeno de dicho primer complejo; (c) poner en contacto dicho primer complejo o prión patógeno disociado con un segundo reactivo de unión a prión en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de unión a prión con el prión patógeno, en el que dicho segundo reactivo de unión a prión comprende un marcador detectable; y (d) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra mediante su unión con el segundo reactivo peptídico, en el que el primer y/o el segundo reactivo de unión a prión es un reactivo peptídico de la invención.

La invención proporciona un soporte sólido que comprende al menos un reactivo peptídico de la invención.

La invención proporciona un kit para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende: (a) un soporte sólido de la invención; (b) otros reactivos necesarios y, (c) opcionalmente, controles positivos y negativos.

La invención proporciona un reactivo peptídico de la invención para su uso como un medicamento.

La invención proporciona uso de un reactivo peptídico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad priónica.

La invención proporciona una composición que comprende un reactivo peptídico de la invención.

La invención proporciona uso de un reactivo peptídico de la invención en la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un paciente que se ha tratado previamente con al menos un medicamento de la invención, para el tratamiento o prevención de enfermedad priónica.

La invención proporciona un procedimiento para aislar una proteína priónica patógena a partir de una muestra que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo peptídico de la invención; (b) poner en contacto dicha muestra con dicho soporte sólido en condiciones que permitan la unión de una proteína priónica

patógena, si está presente en dicha muestra, con dicho primer reactivo peptídico, para formar un primer complejo; y (c) retirar materiales de muestra no unidos.

La invención proporciona un procedimiento para eliminar proteínas priónicas patógenas a partir de una muestra que comprende: (a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo peptídico de la invención; (b) poner en contacto dicho soporte sólido con una muestra sospechosa de contener proteínas priónicas patógenas en condiciones que permiten la unión de las proteínas priónicas patógenas, si están presentes, con el reactivo peptídico; y (c) recuperar los materiales de muestra no unidos.

La invención proporciona un procedimiento para preparar flujo sanguíneo que esté sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo dicho flujo sanguíneo sangre completa, plasma, plaquetas o suero, comprendiendo dicho procedimiento: (a) explorar alícuotas de sangre completa como plasma, plaquetas o suero a partir de muestras de sangre recogida, mediante el procedimiento de la invención; (b) eliminar muestras en las que se detecten priones patógenos; y (c) combinar muestras en las que no se detecten priones patógenos para proporcionar un flujo sanguíneo que esté sustancialmente sin priones patógenos.

La invención proporciona un procedimiento para preparar suministro alimentario que esté sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo dicho procedimiento: (a) explorar una muestra recogida de organismos vivos que entrarán en el suministro alimentario o una muestra recogida de alimento que se pretende que entre en el suministro alimentario, mediante el procedimiento de la invención; (b) eliminar muestras en las que se detecten priones patógenos; y (c) combinar muestras en las que no se detecten priones patógenos para proporcionar un suministro alimentario que esté sustancialmente sin priones patógenos.

La presente divulgación se refiere, en parte, a reactivos peptídicos que interaccionan con proteínas priónicas. Más específicamente, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento interaccionan preferentemente con las isoformas patógenas de proteínas priónicas. Estos reactivos peptídicos pueden usarse en una amplia serie de aplicaciones, incluyendo como herramientas para aislar priones patógenos o para detectar la presencia de priones patógenos en una muestra, como componentes de una composición terapéutica o profiláctica y/o para generar anticuerpos específicos de prión. Por ejemplo, los reactivos peptídicos que interaccionan preferentemente con PrP^{Sc} en comparación con PrP^C son útiles para detección directa de formas patógenas en muestras obtenidas de sujetos vivos, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad o para explorar muestras de sangre donada o explorar órganos para donación de órganos.

En un aspecto más amplio, la divulgación incluye un reactivo peptídico que interacciona preferentemente con formas patógenas de una proteína de enfermedad conformacional. En ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento interaccionan preferentemente con formas patógenas de una proteína priónica en comparación con formas no patógenas de la proteína priónica. Los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden ser parcial o completamente sintéticos, por ejemplo, pueden comprender uno o más de los siguientes restos: restos ciclados o péptidos, multímeros de péptidos, marcadores y/u otros restos químicos. Los ejemplos de reactivos peptídicos adecuados incluyen los derivados de los péptidos de SEC ID N°: 12-132, por ejemplo, péptidos tales como los representados en SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131, 132, 56, 57, 65, 82 u 84 y análogos y derivados de los mismos. Los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden interaccionar con cualquier proteína de enfermedad conformacional, por ejemplo, proteínas priónicas (por ejemplo, la proteína patógena PrP^{Sc}, y la forma no patógena PrP^C). En ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos interaccionan preferentemente con PrP^{Sc} en comparación con PrP^C. Los reactivos peptídicos generalmente serán específicos para PrP^{Sc} de más de una especie, pero pueden ser específicos para PrP^{Sc} de una especie única.

En otra realización, se proporcionan reactivos peptídicos derivados de péptidos mostrados en cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos derivan de regiones de una proteína priónica, por ejemplo, se emplean las regiones correspondientes a los restos 23-43 u 85-156 (por ejemplo, 23-30, 86-111, 89-112, 97-107, 113-135 y 136-156 numerados de acuerdo con la secuencia priónica de ratón mostrada en SEC ID N°: 2). Por conveniencia, los números de restos de aminoácidos expuestos anteriormente son los correspondientes a la secuencia proteica priónica de ratón en SEC ID N°: 2; un experto en la materia podría identificar fácilmente regiones correspondientes en proteínas priónicas de otras especies basándose en las secuencias conocidas en la técnica y las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Los reactivos peptídicos ejemplares incluyen los derivados de péptidos que tienen SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 o 127; o de péptidos que tienen SEC ID N°: 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 129, 130, 131, 132 o 128; o de péptidos que tienen SEC ID N°: 56, 57, 65, 82 u 84.

En otro aspecto, la divulgación incluye un complejo que comprende uno o más de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento y una proteína priónica.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para generar anticuerpos que reconocen proteínas priónicas, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar cualquiera de los reactivos peptídicos descritos en el

presente documento (o polinucleótidos que codifican los reactivos peptídicos) a un sujeto (por ejemplo, animal). En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de aislar anticuerpos del animal. Un aspecto relacionado de la divulgación incluye anticuerpos preparados por el procedimiento. Los anticuerpos preferidos son específicos para la forma patógena.

- 5 En otro aspecto más, la divulgación incluye un complejo que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento y una proteína priónica. En ciertas realizaciones, la proteína priónica es una isoforma no patógena mientras que en otras realizaciones es una forma patógena.

Cualquiera de los reactivos peptídicos y/o anticuerpos descritos en el presente documento puede codificarse, completamente o en parte, por uno o más polinucleótidos, que también forman parte de la presente divulgación.

- 10 En otro aspecto más, se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de proteínas priónicas. Los procedimientos de detección pueden usarse, entre otros, en relación con procedimientos para diagnosticar una enfermedad relacionada con priones (por ejemplo, en sujetos animales humanos o no humanos), asegurar un flujo sanguíneo, suministro de productos sanguíneos o suministro alimentario sustancialmente sin PrP^{Sc}, analizar muestras de órganos y tejidos para trasplante, supervisar la descontaminación de herramientas y equipamiento quirúrgico, así como cualquier otra situación en la que sea importante el conocimiento de la presencia o ausencia del prión patógeno.

Los procedimientos de detección se basan en la interacción preferente de los reactivos peptídicos de la invención de la divulgación con la isoforma priónica patógena. En ciertas realizaciones, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra biológica.

- 20 En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra sospechosa de contener un prión patógeno con uno o más de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento en condiciones que permitan la interacción del reactivo o los reactivos peptídicos y el prión patógeno, si está presente; y detectar la presencia o ausencia del prión patógeno en la muestra mediante su unión con el reactivo o los reactivos peptídicos. La interacción del reactivo o los reactivos peptídicos y el prión patógeno puede llevarse a cabo en solución, o puede proporcionarse uno o más de los reactivos en o sobre una fase sólida. Pueden llevarse a cabo ensayos de tipo sándwich en los que los reactivos peptídicos de la divulgación pueden usarse como un reactivo de captura, un reactivo de detección o ambos. Pueden usarse otros reactivos de unión a priones (por ejemplo, anticuerpos y otras moléculas de unión que se unen a proteína priónica desnaturalizada) en este aspecto en combinación con los reactivos peptídicos de la divulgación.

- 30 En un aspecto de la presente realización, uno o más reactivos peptídicos de la presente divulgación se proporcionan en un soporte sólido y se ponen en contacto con una muestra sospechosa de contener un prión patógeno, en condiciones que permiten la unión del prión patógeno, si está presente, con el reactivo peptídico. Pueden retirarse materiales de muestra no unidos, incluyendo cualquier prión no patógeno, y puede detectarse el prión patógeno, mientras que permanece unido al reactivo peptídico o después de disociación del reactivo peptídico. El prión patógeno puede detectarse usando un reactivo peptídico marcado de forma detectable (el mismo reactivo peptídico usado para “capturar” el prión patógeno o un segundo reactivo peptídico de la divulgación o un anticuerpo anti-priónico marcado de forma detectable u otro reactivo de unión a prión. Este anticuerpo o reactivo de unión a prión no necesita ser específico para la forma patógena del prión.

- 40 En otro aspecto de la presente realización, se proporciona un reactivo de unión a prión en un soporte sólido y se pone en contacto con una muestra sospechosa de contener un prión patógeno, en condiciones que permiten la unión del prión patógeno, si está presente, con el reactivo de unión a prión. Pueden retirarse materiales de muestra no unidos y puede detectarse el prión patógeno, mientras que permanece unido al reactivo peptídico o después de disociación del reactivo peptídico. El prión patógeno puede detectarse usando uno o más reactivos peptídicos marcados de forma detectable de la divulgación.

- 45 En otro aspecto de la presente realización, el prión patógeno en una muestra puede unirse de forma no específica a un soporte sólido (por ejemplo, una placa de ELISA) y detectarse mediante la unión de uno o más reactivos peptídicos marcados de forma detectable de la divulgación que interaccionan preferentemente con la isoforma priónica patógena.

- 50 En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra sospechosa de contener un prión patógeno con uno o más reactivos peptídicos seleccionados del grupo que consiste en péptidos que tienen las secuencias de SEC ID N°: 12-132, y análogos y derivados de los mismos, en condiciones que permiten la unión del reactivo o los reactivos peptídicos con el prión patógeno, si está presente; y detectar la presencia o ausencia del prión patógeno en la muestra mediante su unión con el reactivo o los reactivos peptídicos. En realizaciones preferidas, la muestra se pone en contacto con uno o más reactivos peptídicos seleccionados del grupo que consiste en péptidos que tienen las secuencias de SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131, 132, 56, 57, 65, 82 u 84 y análogos o derivados de los mismos.

En otras realizaciones más, se proporciona un procedimiento para detectar un prión patógeno en una muestra, comprendiendo el procedimiento: proporcionar un soporte sólido que comprende un primer péptido, en el que el primer péptido comprende uno o más de los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento que interaccionan preferentemente con PrP^{SC}; poner en contacto el soporte sólido con la muestra en condiciones que permitan que los priones patógenos, cuando están presentes en la muestra, se unan al primer péptido; poner en contacto el soporte sólido con un segundo péptido marcado de forma detectable, en el que el segundo péptido comprende uno o más de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento que interaccionan preferentemente con proteínas PrP^{SC}, en condiciones que permitan que el segundo péptido se una a priones patógenos unidos por el primer péptido; y detectar complejos formados entre el primer péptido, un prión patógeno de la muestra y el segundo péptido, detectando de este modo la presencia del prión patógeno en la muestra.

En otras realizaciones más, se proporciona en el presente documento un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende: proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo de unión a prión, en el que los reactivos de unión a prión se unen a proteínas priónicas; poner en contacto el soporte sólido con la muestra en condiciones que permitan que las proteínas priónicas, cuando están presentes en la muestra, se unan al reactivo de unión a prión; poner en contacto el soporte sólido con un reactivo peptídico marcado de forma detectable de la divulgación, en el que el reactivo peptídico interacciona preferentemente con la proteína priónica patógena; y detectar complejos formados entre el reactivo de unión a prión, un prión patógeno de la muestra y el reactivo peptídico.

En otra realización, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de proporcionar un soporte sólido que comprende un primer reactivo peptídico como se describe en el presente documento, en el que el primer reactivo peptídico interacciona preferentemente con formas patógenas; poner en contacto el soporte sólido con primer ligando marcado de forma detectable (por ejemplo, plasminógeno, receptor de laminina y parasulfato), en condiciones que permiten la formación de un complejo ligando-reactivo peptídico marcado de forma detectable, en el que la afinidad de unión del primer reactivo peptídico por el primer ligando marcado de forma detectable es más débil que la afinidad de unión del primer reactivo peptídico por un prión patógeno; poner en contacto una muestra sospechosa de contener priones patógenos con el soporte sólido en condiciones que permitan que un prión patógeno, cuando está presente en la muestra, se una al primer reactivo peptídico y reemplace al primer ligando; y detectar la presencia del prión patógeno en la muestra mediante reducción de ligando marcado de forma detectable en el soporte sólido.

Puede usarse cualquiera de los procedimientos anteriores de detección de un prión patógeno en un procedimiento para diagnosticar una enfermedad relacionada con prión.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para aislar un prión patógeno que comprende: proporcionar un soporte sólido que comprende uno o más reactivos peptídicos de la divulgación, poner en contacto el soporte sólido con una muestra que se sabe o se sospecha que contiene un prión patógeno en condiciones que permiten la unión del prión patógeno, si está presente, con el reactivo peptídico; y retirar cualquier material de muestra no unido. Realizaciones adicionales comprenden además la etapa de disociar el prión patógeno unido del reactivo peptídico y, opcionalmente, recuperar el prión patógeno disociado.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para retirar priones patógenos de una muestra que comprende: proporcionar un soporte sólido que comprende uno o más reactivos peptídicos de la divulgación, poner en contacto el soporte sólido con una muestra que se sabe o se sospecha que contiene priones patógenos, en condiciones que permiten la unión de los priones patógenos, si están presentes, con el reactivo peptídico; y recuperar los materiales de muestra no unidos.

En todas las realizaciones anteriores que proporcionan un soporte sólido que comprende uno o más reactivos peptídicos de la divulgación, se contemplan realizaciones alternativas en las que el reactivo peptídico se pone en contacto con la muestra antes de que el reactivo peptídico se una al soporte sólido. En estas realizaciones, el reactivo peptídico comprende un miembro de un par de unión y el soporte de sólido comprende el segundo miembro del par de unión. Por ejemplo, el reactivo peptídico de la divulgación puede contener o modificarse para contener biotina. El reactivo peptídico biotinilado se pone en contacto con una muestra sospechosa de contener un prión patógeno en condiciones que permiten la unión del reactivo peptídico con el prión patógeno. Después se pone en contacto un soporte sólido que comprende avidina o estreptavidina con el reactivo peptídico biotinilado. Se describen en el presente documento otros pares de unión adecuados.

En cualquiera de los procedimientos que usan un soporte sólido descritos en el presente documento, el soporte sólido puede ser, por ejemplo, nitrocelulosa, poliestireno, polipropileno, látex, fluoruro de polivinilo, papel diazotizado, membranas de nailon, perlas activadas y/o perlas magnéticamente sensibles, polivinilcloruro; polipropileno, látex de poliestireno, policarbonato, nailon, dextrano, quitina, arena, sílice, piedra pómez, agarosa, celulosa, vidrio, metal, poliácilamida, silicio, goma, polisacáridos; papel diazotizado; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y cualquier material usado habitualmente para síntesis de fase sólida, separaciones de afinidad, purificaciones, reacciones de hibridación, inmunoensayos y otras aplicaciones tales. El soporte puede estar en partículas o puede estar en forma de una superficie continua e incluye membranas, malla, placas, microgránulos, portaobjetos, discos, capilares, fibras huecas, agujas, alfileres, microplacas, fibras sólidas, geles (por ejemplo, geles de sílice) y perlas

(por ejemplo, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente reticuladas con divinilbenceno, perlas co-poli injertadas, perlas de poliácridamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticuladas con N-N'-bis-acriloletilendiamina, perlas magnéticas de óxido de hierro y partículas de vidrio revestidas con un polímero hidrófobo.

- 5 Además, en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento la muestra puede ser una muestra biológica, es decir una muestra obtenida o derivada de un organismo vivo o que ha estado vivo, por ejemplo, órganos, sangre completa, fracciones de sangre, componentes de la sangre, plasma, plaquetas, suero, líquido cefalorraquídeo (LCF), tejido cerebral, tejido del sistema nervioso, tejido muscular, médula ósea, orina, lágrimas, tejido de sistema no nervioso, órganos y/o biopsias o necropsias. En realizaciones preferidas, la muestra biológica
10 que comprende sangre, fracciones de sangre o componentes de la sangre. La muestra puede ser una muestra no biológica.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para diagnosticar una enfermedad relacionada con priones en un sujeto detectando la presencia de un prión patógeno en una muestra biológica de cualquier sujeto por cualquiera de los procedimientos de detección descritos en el presente documento.

- 15 En otro aspecto, la divulgación incluye procedimientos para preparar un flujo sanguíneo que está sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo el procedimiento las etapas de explorar alícuotas de sangre (por ejemplo, sangre completa, plasma, plaquetas o suero) de muestras de sangre recogidas por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento; eliminar cualquier muestra en la que se detecten priones patógenos; y combinar muestras en las que no se detecten priones patógenos para proporcionar un flujo sanguíneo sustancialmente sin
20 priones patógenos.

- En otro aspecto más, la divulgación incluye procedimientos para preparar un suministro alimentario, en particular, un suministro de carne (por ejemplo, ternera, cordero, borrego o cerdo usado para consumo humano o animal) que está sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo el procedimiento las etapas de explorar, usando cualquiera de los procedimientos de detección descritos en el presente documento, muestras recogidas de organismos vivos o
25 muertos que entrarán en el suministro alimentario o muestras recogidas de alimentos que se pretende que entren en el suministro alimentario; identificar muestras en las que se detectan priones patógenos; y retirar del suministro alimentario cualquier organismo vivo o muerto o alimento que se pretende que entre en el suministro alimentario, en muestras de las que se detectan priones patógenos; proporcionando de este modo un suministro alimentario que está sustancialmente sin priones patógenos.

- 30 En otro aspecto, la divulgación incluye un soporte sólido que comprende uno o más reactivos peptídicos como se describe en el presente documento. El soporte sólido puede usarse, entre otros, en los procedimientos de la divulgación para detectar una proteína priónica patógena en una muestra, para aislar una proteína priónica de una muestra y para eliminar proteínas priónicas patógenas de una muestra. El soporte sólido puede ser como se ha descrito anteriormente.

- 35 En otro aspecto, la divulgación incluye diversos kits para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra, para aislar un prión patógeno de una muestra, para eliminar un prión patógeno de una muestra, comprendiendo el kit: uno o más de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento; y/o cualquiera de los soportes sólidos que comprende uno o más de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento y otros reactivos necesarios y, opcionalmente, controles positivos y negativos. El reactivo o los reactivos peptídicos pueden marcarse
40 de forma detectable.

En otros aspectos, se proporcionan en el presente documento composiciones que comprenden uno o más de los reactivos peptídicos, polinucleótidos y/o anticuerpos descritos en el presente documento.

- En un aspecto adicional, se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir enfermedad priónica, por ejemplo, procedimientos que comprenden administrar a un animal (por ejemplo, mamífero no humano o humano) una o más
45 composiciones descritas en el presente documento. En otras realizaciones, los procedimientos comprenden administrar una primera composición que comprende cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, en una etapa de sensibilización y administrar una segunda composición que comprende cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento como un refuerzo, por ejemplo en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune en el sujeto. La composición o las composiciones pueden administrarse por vía
50 intramuscular, vía intramucosa, vía intranasal, vía subcutánea, vía intradérmica, vía transdérmica, vía intravaginal, vía intrarrectal, vía oral y/o vía intravenosa.

Estas y otras realizaciones de la divulgación objeto se encontrarán fácilmente por los expertos en la materia a la luz de la divulgación del presente documento.

Breve descripción de los dibujos

- 55 La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de proteínas priónicas humanas (SEC ID N°: 1) y de ratón (SEC ID N°: 2).

La Figura 2 representa un alineamiento de proteínas priónicas de ser humano (SEC ID N°: 3), hámster sirio (hámster) (SEC ID N°: 4), bovino (SEC ID N°: 5), oveja (SEC ID N°: 6), ratón (SEC ID N°: 7), alce (SEC ID N°: 8), gamo común (gamo) (SEC ID N°: 9), ciervo mulo (mulo) (SEC ID N°: 10) y ciervo de cola blanca (blanco) (SEC ID N°: 11). El Alce, Gamo, Ciervo Mulo y Ciervo de Cola Blanca solamente varían entre sí en dos restos, S/N128 y Q/E226 (mostrados en negrita).

La Figura 3, paneles A-F, representa sustituciones de peptoides que pueden realizarse para preparar cualquiera de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento. Los peptoides están rodeados en cada panel y se muestran en un reactivo peptídico ejemplar como se describe en el presente documento (SEC ID N°: 14, QWNKPSKPKTNG), en el que un resto de prolina (resto 8 de (SEC ID N°: 14) se reemplaza con un resto de glicina N-sustituido (peptoido). El Panel A muestra un reactivo peptídico en el que un resto de prolina se sustituye con el resto de peptoido: N-(S)-(1-feniletil)glicina; el panel B muestra un reactivo peptídico en el que un resto de prolina se sustituye con el resto de peptoido: N-(4-hidroxifenil)glicina; el panel C muestra un reactivo peptídico en el que un resto de prolina se sustituye con el resto de peptoido: N-(ciclopropilmetil)glicina; el panel D muestra un reactivo peptídico en el que un resto de prolina se sustituye con el resto de peptoido: N-(isopropil)glicina; el panel E muestra un reactivo peptídico en el que un resto de prolina se sustituye con el resto de peptoido: N-(3,4-dimetoxibencil)glicina; y el panel F muestra un reactivo peptídico en el que un resto de prolina se sustituye con el resto de peptoido: N-butilglicina.

La Figura 4 representa los resultados de experimentos de transferencia de Western como se describe en el Ejemplo 2. Los carriles 1 y 2 muestran la presencia de proteínas priónicas en homogeneizados de cerebro de ratón normales (Carril 1, marcado con "C") y en homogeneizados de cerebro de ratón infectados desnaturalizados (carril 2, marcados con "Sc"). Los carriles 3, 4 y 5 muestran unión específica de un reactivo peptídico como se describe en el presente documento (SEC ID N: 68) con formas priónicas patógenas en presencia de plasma humano. En particular, el carril 3 es un control de plasma humano y el carril 4 es una muestra de homogeneizado de cerebro de ratón normal. El carril 5 muestra fuerte unión por el reactivo peptídico con PrP^{Sc} en muestras de homogeneizado de cerebro de ratón infectado.

La Figura 5 representa las estructuras de reactivos peptídicos ligados a PEG ejemplares como se describen en el presente documento.

Descripción detallada

La invención se refiere al descubrimiento sorprendente e inesperado de que pueden usarse péptidos relativamente pequeños (menos de 50 a 100 aminoácidos de longitud, preferentemente menos de 50 aminoácidos de longitud y aún más preferentemente menos de aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) para diferenciar entre proteínas priónicas patógenas y no patógenas. Por lo tanto, la presente divulgación se refiere al sorprendente hallazgo de que estos péptidos y derivados de los mismos (de forma colectiva "reactivos peptídicos"), pueden unirse a formas proteicas patógenas y no patógenas con diferente especificidad y/o afinidad y, en consecuencia, pueden usarse, por sí solas, como reactivos de diagnóstico/detección o como componentes de composiciones terapéuticas. Antes de la presente divulgación, se creía que se podrían usar solamente moléculas mayores (por ejemplo, anticuerpos, PrP^C, PrP forma alfa y plasminógeno) para diferenciar formas patógenas y no patógenas. Como tales, los péptidos antigénicos previamente descritos se usaron para generar anticuerpos que se evaluaron con respecto a su capacidad para diferenciar entre formas patógenas y no patógenas. Sin embargo, debido a la naturaleza relativamente no inmunogénica de las proteínas priónicas, ha resultado difícil generar anticuerpos específicos para formas patógenas. Véase, por ejemplo, R.A. Williamson y col. "Antibodies as Tools to Probe Prion Protein Biology" en PRION BIOLOGY AND DISEASES, ed. S. Prusiner, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, pág: 717-741.

El descubrimiento de que ciertos péptidos como se describen en el presente documento interaccionan preferentemente con proteínas priónicas patógenas (PrP^{Sc}) posibilita el desarrollo de nuevos reactivos para diagnóstico, ensayos de detección y compuestos terapéuticos, entre otros. Por lo tanto, la invención se refiere a reactivos peptídicos y, además, se refiere a ensayos de detección y ensayos de diagnóstico que utilizan estos reactivos peptídicos, procedimientos de purificación o aislamiento que utilizan estos reactivos peptídicos y composiciones terapéuticas que comprenden estos reactivos peptídicos. También se proporcionan polinucleótidos que codifican estos reactivos peptídicos y anticuerpos generados usando estos reactivos peptídicos. Los reactivos peptídicos, polinucleótidos y/o anticuerpos descritos en el presente documento son útiles en composiciones y procedimientos para detectar la presencia de priones patógenos, por ejemplo en una muestra biológica. Además, la invención se requiere adicionalmente a procedimientos para usar tales reactivos peptídicos, anticuerpos y/o polinucleótidos como un componente en una composición terapéutica o profiláctica.

Los reactivos peptídicos (y polinucleótidos que codifican estos reactivos peptídicos) usados en la invención comprenden un péptido que interacciona preferentemente con isoformas patógenas en comparación con isoformas no patógenas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento se unen específicamente a formas proteicas de enfermedad conformacional patógenas y no se unen (o se unen en menor grado) a formas no patógenas. Los reactivos peptídicos descritos en el presente documento (y polinucleótidos que los codifican) pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos. Estos anticuerpos pueden reconocer formas patógenas, formas no patógenas o ambas. Estas moléculas son útiles, solas o en diversas

combinaciones, en ensayos de diagnóstico y/o en composiciones profilácticas o terapéuticas.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel y col. eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters y Dalrymple, Fields Virology (2ª ed), Fields y col. (eds.), B.N. Raven Press, Nueva York, NY.

Se entiende que los reactivos peptídicos, anticuerpos y procedimientos de la presente invención no se limitan a formulaciones o parámetros de procedimiento particulares ya que tales, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares de la invención solamente y no se presenta que sea limitante.

I. Definiciones

Para facilitar un entendimiento de la invención, se analizarán posteriormente términos seleccionados usados en la solicitud.

Las expresiones “prión”, “proteína priónica”, “proteína PrP” y “PrP” se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse tanto a la forma proteica patógena (denominada de diversas maneras proteína de tembladera, forma proteica patógena, isoforma patógena, prión patógeno y PrP^{Sc}), como a la forma no patógena (denominada de formas diversas forma proteica celular, isoforma celular, isoforma no patógena, proteína priónica no patógena y PrP^C), así como la forma desnaturalizada y diversas formas recombinantes de la proteína priónica que pueden no tener la conformación patógena o la conformación celular normal. La forma proteica patógena se asocia con patología (encefalopatías espongiformes) en seres humanos y animales; la forma no patógena está normalmente presente en células animales y puede, en condiciones apropiadas, convertirse a la conformación PrP^{Sc} patógena. Los priones se producen de forma natural en una amplia diversidad de especies de mamíferos, incluyendo seres humanos, ovejas, vacas y ratones. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de una proteína priónica humana como SEC ID N°: 1. Se expone una secuencia de aminoácidos representativa de una proteína priónica de ratón como SEC ID N°: 2. Se muestran otras secuencias representativas en la Figura 2.

Como se usa en el presente documento, el término “patógeno” puede significar que la proteína provoca de hecho la enfermedad o puede significar simplemente que la proteína se asocia con la enfermedad y por lo tanto está presente cuando está presente la enfermedad. Por lo tanto, una proteína patógena como se usa en relación con la presente divulgación no es necesariamente una proteína que sea el agente causante específico de una enfermedad. Las formas patógenas pueden ser o no infecciosas. La expresión “forma priónica patógena” se usa más específicamente para referirse a la conformación y/o la conformación rica en láminas beta de proteínas priónicas de mamífero, aviares o recombinantes. Generalmente, la conformación rica en láminas beta es resistente a proteinasa K. Las expresiones “no patógena” y “celular” cuando se usan con respecto a formas proteicas de enfermedad conformacional se usan de forma intercambiable para referirse a la isoforma normal de la proteína cuya presencia no se asocia con enfermedad.

Además, una “proteína priónica” o “proteína de enfermedad conformacional” como se usa en el presente documento no se limita a un polipéptido que tenga la secuencia exacta a las descritas en el presente documento. Resulta fácilmente evidente que las expresiones abarcan proteínas de enfermedad conformacional de cualquiera de las especies o enfermedades identificadas o no identificadas (por ejemplo, Alzheimer, Parkinson, etc.). Un experto habitual en la materia a la vista de las enseñanzas de la presente divulgación y la técnica puede determinar regiones correspondientes a las secuencias mostradas en las figuras en cualquier otra proteína priónica usando, por ejemplo, programas de comparación de secuencias (por ejemplo, BLAST y otros descritos en el presente documento) o identificación y alineamiento de elementos o motivos estructurales.

La expresión “gen de PrP” se usa en el presente documento para describir cualquier material genético que exprese proteínas priónicas incluyendo polimorfismo y mutaciones patógenas conocidos. La expresión “gen de PrP” se refiere en general a cualquier gen de cualquier especie que codifique cualquier forma de una proteína PrP. Algunas secuencias de PrP conocidas habitualmente se describen en Gabriel y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9097-9101 (1992), y Patentes de Estados Unidos N° 5.565.186; 5.763.740; 5.792.901; y documento WO97/04814. El gen de PrP puede ser de cualquier animal, incluyendo los animales “huésped” y de “ensayo” descritos en el presente documento y todos y cada uno de los polimorfismos y mutaciones de los mismos, reconociéndose que las expresiones incluyen otros genes del PrP tales que aún no se han descubierto. La proteína expresada por dicho gen puede tomar una forma PrP^C (sin enfermedad) o PrP^{Sc} (enfermedad).

“Enfermedad relacionada con prión” como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad provocada completamente o en parte por una proteína priónica patógena (PrP^{Sc}). Las enfermedades relacionadas con priones incluyen, pero sin limitación, tembladera, encefalopatías espongiformes bovinas (BSE), enfermedad de las vacas locas, encefalopatías espongiformes felinas, kuru, Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob de variante nueva (nvCJD), enfermedad de debilitamiento crónico (CWD), enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker (GSS) e insomnio familiar letal (FFI).

La expresión “reactivo peptídico” como se usa en el presente documento se refiere general a cualquier compuesto que comprenda polímeros de origen natural o sintético de aminoácidos o moléculas de tipo aminoácido, incluyendo pero sin limitación compuestos que comprenden solamente moléculas de amino y/o imino. Los reactivos peptídicos de la presente invención interactúan preferentemente con una proteína priónica patógena y derivan típicamente de fragmentos de una proteína priónica. El término “péptido” se usará de forma intercambiable con “oligopéptido” o “polipéptido” y no se implica ningún tamaño particular mediante el uso de estos términos. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, péptidos que contengan uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, peptoides, etc.), péptidos con enlaces sustituidos; así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural (por ejemplo, sintético). Por lo tanto, se incluyen dentro de la definición péptidos sintéticos, dímeros, multímeros (por ejemplo, repeticiones en tándem, formas de múltiples péptidos antigénicos (MAP), péptidos de enlace lineal), moléculas cicladas, ramificadas y similares. Los términos también incluyen moléculas que comprenden uno o más restos de glicina *N*-sustituida (un “peptoid”) y otros aminoácidos o péptidos sintéticos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.831.005; 5.877.278; y 5.977.301; Nguyen y col. (2000) Chem Biol. 7(7): 463-473; y Simon y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(20): 9367-9371 para descripciones de peptoides). Las longitudes no limitantes de péptidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen péptidos de 3 a 5 restos de longitud, 6 a 10 restos de longitud (o cualquier número entero entre ellos), 11 a 20 restos de longitud (o cualquier número entero entre ellos), 21 a 75 restos de longitud (o cualquier número entero entre ellos), 75 a 100 (o cualquier número entero entre ellos), o polipéptidos de más de 100 restos de longitud. Típicamente, los péptidos útiles en la presente invención pueden tener una longitud máxima adecuada para la aplicación pretendida. Preferentemente, el péptido es de entre aproximadamente 3 y 100 restos de longitud. Generalmente, un experto en la materia puede seleccionar fácilmente la longitud máxima a la vista de las enseñanzas del presente documento. Además, los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento, por ejemplo péptidos sintéticos, pueden incluir moléculas adicionales tales como marcadores, engarces u otros restos químicos (por ejemplo, biotina, colorantes específicos de amiloide tales como Rojo Control o Tioflavina). Tales restos pueden potenciar adicionalmente la interacción de los péptidos con las proteínas priónicas y/o detección adicional de proteínas priónicas.

Los reactivos peptídicos también incluyen derivados de las secuencias de aminoácidos de la invención que tienen una más o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, incluyendo uno o más aminoácidos de origen no natural. Preferentemente, los derivados muestran al menos aproximadamente 50% de identidad con cualquier secuencia de tipo silvestre o de referencia, preferentemente al menos aproximadamente 70% de identidad, más preferentemente al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% identidad de secuencia con cualquier secuencia de tipo silvestre o de referencia descrita en el presente documento. La identidad de secuencia (o porcentaje) puede determinarse como se describe posteriormente. Tales derivados pueden incluir modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares.

Los derivados peptídicos también pueden incluir modificaciones de la secuencia nativa, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), siempre que el polipéptido mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a amplificación por PCR. Además, pueden realizarse modificaciones que tienen uno o más de los siguientes efectos: reducir la toxicidad; aumentar la afinidad y/o especificidad por proteínas priónicas; facilitar el procesamiento celular (por ejemplo, secreción, presentación de antígenos, etc.); y facilitar la presentación a linfocitos B y/o linfocitos T. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden realizarse de forma recombinante, de forma sintética, purificarse a partir de fuentes naturales o en cultivo tisular.

Un “fragmento” como se usa en el presente documento se refiere a un péptido que consiste en solamente una parte de la proteína de longitud completa intacta y su estructura como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, un fragmento puede incluir una deleción C terminal y/o una deleción N terminal de una proteína. Típicamente, el fragmento conserva una, algunas o todas las funciones de la secuencia polipeptídica de longitud completa de la que deriva. Típicamente, un fragmento comprenderá al menos 5 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína nativa; preferentemente al menos aproximadamente 8 restos de aminoácidos consecutivos; más preferentemente, al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 restos de aminoácidos consecutivos de la proteína nativa.

El término “polinucleótido”, como se conoce en la técnica, generalmente se refiere a una molécula de ácido nucleico. Un “polinucleótido” puede incluir secuencias tanto bicatenarias como monocatenarias y se refiere a, pero sin limitación, secuencias procariotas, ARNm eucariotas, ADNc de ARNm viral, ARNm procariota o eucariota, secuencias de ARN y ADN genómico de ADN viral (por ejemplo virus de ARN y ADN y retrovirus), procariota o ADN eucariota

(por ejemplo, de mamífero), y especialmente secuencias de ADN sintéticas. El término también abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidas de ADN y ARN, e incluye modificaciones tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa), de la secuencia nativa. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de huéspedes que incluyen polinucleótidos que codifican priones. Las modificaciones de los polinucleótidos pueden tener cualquiera de varios efectos incluyendo, por ejemplo, facilitar la expresión del producto polipeptídico en una célula huésped.

Un polinucleótido puede codificar una proteína o un polipéptido biológicamente activo (por ejemplo, inmunogénico o terapéutico). Dependiendo de la naturaleza del polipéptido codificado por el polinucleótido, un polinucleótido puede incluir tan poco como 10 nucleótidos, por ejemplo, cuando el polinucleótido codifica un antígeno o epítipo. Típicamente, el polinucleótido codifica péptidos de al menos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o incluso más aminoácidos.

Una “secuencia codificante de polinucleótido” o una secuencia que “codifica” un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) a un polipéptido *in vivo* cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas (o “elementos de control”). Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) terminal y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxilo) terminal. Puede localizarse una secuencia de terminación de la transcripción 3' de la secuencia codificante. Los “elementos de control” típicos incluyen, pero sin limitación: reguladores de la transcripción, tales como promotores, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción y secuencias de poliadenilación; y reguladores de traducción, tales como secuencias para optimización del inicio de la traducción, por ejemplo, secuencias Shine-Dalgarno (sitio de unión de a ribosomas), secuencias Kozak (es decir, secuencias para la optimización de la traducción, localizadas, por ejemplo, 5' de la secuencia codificante), secuencias líder (heterólogas o nativas), codón de inicio de la traducción (por ejemplo, ATG) y secuencias de terminación de la traducción. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (en los que la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente al promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (en los que la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente con el promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.) y promotores constitutivos.

“Unido operativamente” se refiere a un ordenamiento de elementos en el que los componentes descritos de este modo se configuran para realizar su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado unido operativamente con una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes las enzimas apropiadas. El promotor no necesita estar contiguo a la secuencia codificante, siempre que actúe para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias no traducidas pero transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede aún considerarse “unida operativamente” a la secuencia codificante.

Una molécula de ácido nucleico “recombinante” como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico significa un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, semi-sintético o sintético que, según su origen o manipulación: (1) no se asocia con todo o una parte del polinucleótido con el que se asocia en la naturaleza; y/o (2) se une a un polinucleótido distinto al que se une en la naturaleza. El término “recombinante” como se usa con respecto a una proteína o polipéptido significa un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante. “Células huésped recombinantes”, “células huésped”, “células”, “lineales celulares”, “cultivos celulares” y otras expresiones tales que indican microorganismos procariontes o líneas celulares eucariotas cultivados como entidades unicelulares, se usan de forma intercambiable y se refieren a células que pueden usarse, o se han usado, como receptores para vectores recombinantes u otro ADN de transferencia e incluyen la descendencia de la célula original que se ha transfectado. Se entiende que la descendencia de una célula parental única puede no ser necesariamente completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN genómico o total al parental original, debido a mutación accidental o deliberada. La descendencia de la célula parental que es suficientemente similar al parental para caracterizar por la propiedad relevante, tal como la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido deseado, se incluye en la descendencia pretendida por la presente definición y está abarcada por las expresiones anteriores.

Por “aislado” se entiende, cuando se hace referencia a un polinucleótido o un polipéptido, que la molécula indicada está separada y aparte del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza o, cuando el polinucleótido o polipéptido no se encuentra en la naturaleza está suficientemente libre de otras macromoléculas biológicas de modo que el polinucleótido o polipéptido puede usarse para su fin pretendido.

“Anticuerpo” como se conoce en la técnica incluye uno o más restos biológicos que, a través de medios químicos o físicos, puede unirse o asociarse con un epítipo de un polipéptido de interés. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden interaccionar preferentemente con (por ejemplo, unirse específicamente a) conformaciones príónicas patógenas. El término “anticuerpo” incluye anticuerpos obtenidos de preparaciones tanto policlonales como monoclonales, así como los siguientes: moléculas de anticuerpo híbrido (quimérico) (véase, por ejemplo, Winter y col. (1991) *Nature* 349: 293-299; y Patente de Estados Unidos N° 4.516.567; fragmentos F(ab')₂ y F(ab); moléculas F_v (heterodímeros no covalentes, véase, por ejemplo, Inbar y col. (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2659-2662; y

Ehrlich y col. (1980) *Biochem* 19: 4091-4096); moléculas F_v de cadena sencilla (sFv) (véase, por ejemplo, Huston y col. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6897-5853); construcciones de fragmentos de anticuerpos diméricos y triméricos; minicuerpos (véase por ejemplo, Pack y col. (1992) *Biochem* 31: 1579-1584; Cumber y col. (1992) *J Immunology* 149B: 120-126); moléculas de anticuerpo humanizadas (véase por ejemplo, Riechmann y col. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyan y col. (1988) *Science* 239: 1534-1536; y Publicación de Patente del Reino Unido N° GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994); y cualquier fragmento funcional obtenido de tales moléculas, en las que tales fragmentos conservan propiedades de unión inmunológica de la molécula de anticuerpo parental. El término "anticuerpo" incluye además anticuerpos obtenidos a través de procedimientos no convencionales, tales como presentación de fagos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos homogénea. La expresión no se limita con respecto a la especie o fuente del anticuerpo, ni se pretende que se limite por la manera en la que se realiza. Por lo tanto, la expresión abarca anticuerpos obtenidos de hibridomas murinos, así como anticuerpos monoclonales humanos obtenidos usando hibridomas humanos en lugar de murinos. Véase, por ejemplo, Cote, y col. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 1985, pág 77.

Si se desean anticuerpos policlonales, generalmente se inmuniza a un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con una composición inmunogénica (por ejemplo, un reactivo peptídico como se describe en el presente documento). Se recoge suero del animal inmunizado y se trata de acuerdo con procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales para el reactivo peptídico seleccionado contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Se conocen en este campo técnicas para producir y procesar antisueros policlonales, véase por ejemplo, Mayer y Walker, eds. (1987) *IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY* (Academic Press, Londres).

Un experto en la materia también puede producir fácilmente anticuerpos monoclonales dirigidos contra reactivos peptídicos descritos en el presente documento. La metodología general para realizar anticuerpos monoclonales por hibridomas se conoce bien. Pueden crearse líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales mediante fusión celular y también mediante otras técnicas tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier y col. (1980) *HYBRIDOMA TECHNIQUES*; Hammerling y col. (1981), *MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS*; Kennett y col. (1980) *MONOCLONAL ANTIBODIES*; véase también, Patentes de Estados Unidos N° 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; y 4.493.890.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo de dominio sencillo" (dAb) es un anticuerpo que está comprendido por un dominio VH, que se une específicamente con un antígeno designado. Un dAb no contiene un dominio VL, pero puede contener otros dominios de unión a antígeno que se sabe que existen para anticuerpos, por ejemplo, los dominios kappa y lambda. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar dAb. Véase, por ejemplo, Ward y col, *Nature* 341: 544 (1989).

Los anticuerpos pueden estar comprendidos también por dominios VH y VL, así como otros dominios de unión a antígeno conocidos. Se conocen en la técnica ejemplos de estos tipos de anticuerpos y procedimientos para su preparación (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.467) e incluyen los siguientes. Por ejemplo, "anticuerpos vertebrados" se refiere a anticuerpos que son tetrámeros o agregados de los mismos, que comprenden cadenas ligeras y pesadas que habitualmente se agregan en una configuración en "Y" y que pueden o no tener enlaces covalentes entre las cadenas. En anticuerpos de vertebrados, las secuencias de aminoácidos de las cadenas son homólogas de las secuencias halladas en anticuerpos producidos en vertebrados, *in situ* o *in vitro* (por ejemplo, en hibridomas). Los anticuerpos de vertebrados incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales purificados, procedimientos para la preparación de los cuales se describen posteriormente.

"Anticuerpos híbridos" son anticuerpos en los que las cadenas son homólogas por separado con referencia a cadenas de anticuerpos de mamíferos y representan nuevos ensamblajes de ellas, de modo que dos antígenos diferentes pueden precipitarse por el tetrámero o agregado. En anticuerpos híbridos un par de cadenas pesadas o ligeras son homólogas de las halladas en un anticuerpo inducido contra un primer antígeno, mientras que un segundo par de cadenas son homólogas de las halladas en un anticuerpo inducido contra un segundo anticuerpo. Esto da como resultado la propiedad de "divalencia", es decir, la capacidad de unir dos antígenos simultáneamente. Tales híbridos también pueden formarse usando cadenas quiméricas, como se expone posteriormente.

"Anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que las cadenas pesada y/o ligera son proteínas de fusión. Típicamente, una parte de las secuencias de aminoácidos de la cadena es homóloga de secuencias correspondientes en un anticuerpo derivado de una especie particular o una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo de las secuencias derivadas de otra especie y/o clase. Habitualmente, la región variable de cadenas tanto ligeras como pesadas se asemeja a las regiones variables o anticuerpos derivados de una especie de vertebrado, mientras que las partes constantes son homólogas de las secuencias en los anticuerpos derivados de otra especie de vertebrados. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo

particular. También se incluye cualquier anticuerpo en el que una o ambas de las cadenas pesada o ligera están compuestas de combinaciones de secuencias que se asemejan a las secuencias en anticuerpos de diferentes fuentes, sean estas fuentes de clases diferentes o diferente especie de origen y esté o no el punto de fusión en el límite de variable/constante. Por lo tanto, es posible producir anticuerpos en los que ni la región constante ni la variable se asemejan a secuencias de anticuerpos conocidas. Por lo tanto se hace posible, por ejemplo, construir anticuerpos cuya región variable tiene una afinidad específica mayor por un antígeno particular, o cuya región constante puede inducir fijación de complemento potenciada, o realizar otras mejoras de propiedades poseídas por una región constante particular.

Otro ejemplo es "anticuerpos alterados", que se prefiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de origen natural en un anticuerpo vertebrado se ha variado. Utilizando técnicas de ADN recombinante, pueden rediseñarse anticuerpos para obtener características deseadas. Las posibles variaciones son muchas, y varían del cambio de uno o más aminoácidos al rediseño completo de una región, por ejemplo, la región constante. Pueden realizarse cambios en la región constante, en general, para conseguir características de procesos celulares deseadas, por ejemplo, cambios en la fijación del complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Pueden realizarse cambios en la región variable para alterar las características de unión a antígeno. El anticuerpo también puede modificarse por ingeniería genética para ayudar al suministro específico de una molécula o sustancia a una célula o sitio tisular específico. Las alteraciones deseadas pueden realizarse por técnicas conocidas en biología molecular, por ejemplo, técnicas recombinantes, mutagénesis dirigida, etc.

Otro ejemplo más son "anticuerpos univalentes" que son agregados comprendidos por un dímero de cadena pesada/cadena ligera unido a la región Fc (es decir, troncal) de una segunda cadena pesada. Este tipo de anticuerpo escapa a la modulación antigénica. Véase, por ejemplo, Glennie y col. Nature 295: 712 (1982). También se incluyen dentro de la definición de anticuerpos fragmentos "Fab" de anticuerpos. La región "Fab" se refiere a las partes de las cadenas pesadas y ligeras que son aproximadamente equivalentes, o análogas, a las secuencias que comprenden la parte ramificada de las cadenas pesadas y ligeras, y que se ha demostrado que muestran unión inmunológica con un antígeno específico, pero que carecen de la parte Fc efectora. "Fab" incluye agregados de una cadena pesada y una ligera (habitualmente conocida como Fab'), así como de tetrámeros que contienen las cadenas 2H y 2L (denominadas F(ab)2), que son capaces de reaccionar de forma selectiva con un antígeno o familia de antígenos designada. Los anticuerpos Fab pueden dividirse en subconjuntos análogos a los descritos anteriormente, es decir, "Fab de vertebrado", "Fab híbrido", "Fab quimérico" y "Fab alterado". Se conocen dentro de la técnica procedimientos para producir fragmentos Fab de anticuerpos que incluyen, por ejemplo, proteólisis y síntesis por técnicas recombinantes.

"Complejo de antígeno-anticuerpo" se refiere al complejo formado por un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo en un antígeno.

Se dice que un péptido (o reactivo peptídico) "interacciona" con otro péptido o proteína si se une específicamente, no específicamente o en alguna combinación de unión específica y no específica. Se dice que un péptido (o reactivo peptídico) "interacciona preferentemente" con una proteína priónica patógena si se une con mayor afinidad y/o mayor especificidad a la forma patógena que a las isoformas no patógenas. Un reactivo peptídico que interacciona preferentemente con una proteína priónica patógena se denomina también en el presente documento un reactivo peptídico específico de prión patógeno. Debe entenderse que una interacción preferente no requiere necesariamente interacción entre restos de aminoácidos específicos y/o motivos de cada péptido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento interaccionan preferentemente con isoformas patógenas pero, no obstante, pueden ser capaces de unirse a isoformas no patógenas a un nivel débil, pero detectable, (por ejemplo, 10% o menos de la unión mostrada con el polipéptido de interés). Típicamente, la unión débil, o unión de fondo, es fácilmente diferenciable de la interacción precedente con el compuesto o polipéptido de interés, por ejemplo, mediante el uso de controles apropiados. En general, los péptidos de la invención se unen a priones patógenos en presencia de exceso de 10^6 veces de formas no patógenas.

El término "afinidad" se refiere a la fuerza de unión y puede expresarse cuantitativamente como una constante de disociación (K_d). Preferentemente, un péptido (o reactivo peptídico) que interacciona preferentemente con una isoforma patógena preferentemente interacciona con la isoforma patógena con una afinidad al menos 2 veces mayor, más preferentemente una afinidad al menos 10 veces mayor y aún más preferentemente una afinidad al menos 100 veces mayor que con la que interacciona con la isoforma no patógena. La afinidad de unión (es decir, K_d) puede determinarse usando técnicas convencionales.

Se conocen bien este campo técnicas para determinar "similitud" o "porcentaje de identidad" de las secuencias de aminoácidos. En general, "similitud" significa la comparación aminoácido a aminoácido de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, en el que los aminoácidos son idénticos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares tales como carga o hidrofobicidad. Después puede determinarse un denominado "porcentaje de identidad" entre las secuencias polipeptídicas comparadas. Además se conocen bien en este campo técnicas para determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico y aminoácidos e incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (habitualmente mediante un intermedio de ADNc) y determinar la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo, y comparar esta con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos polinucleótidos o

secuencias polipeptídicas, respectivamente.

Pueden compararse dos o más secuencias de aminoácidos o polinucleótidos determinando su “porcentaje de identidad”. El porcentaje de identidad puede determinarse mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas (la secuencia de referencia y una secuencia con porcentaje de identidad desconocido para la secuencia de referencia) alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia de referencia y multiplicando el resultado por 100. Pueden usarse programas informáticos fácilmente disponibles para ayudar en el análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Supl. 3: 353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Advances in Appl. Math. 2: 482-489, 1981 para análisis peptídico. Están disponibles programas para determinar la identidad de secuencia en el Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto recomendados por el fabricante y descritos en el Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, al que se ha hecho referencia anteriormente. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia puede determinarse usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización de hueco de seis posiciones de nucleótidos.

Otro procedimiento para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH™ con copyright de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y disponible de numerosas fuentes, por ejemplo en Internet. De este conjunto de paquetes puede emplearse el algoritmo Smith-Waterman en el que se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización de apertura de hueco de 12, penalización de extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados el valor de “Coincidencia” refleja la “identidad de secuencia”. Se conocen generalmente en la técnica otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, por ejemplo, otro programa de alineamiento es BLAST, usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, puede usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = convencional; filtro = ninguno; hebra = ambas; punto de corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes; GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones de CDS de GenBank + Swiss protein + Spupdate + PIR. Están disponibles fácilmente detalles de estos programas.

Una “composición inmunogénica” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier composición (por ejemplo, péptido, anticuerpo y/o polinucleótidos) en la que la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o una celular. La composición inmunogénica puede introducirse directamente en un sujeto receptor, tal como por inyección, inhalación, vía de administración oral, intranasal o cualquier otra parenteral o mucosa (por ejemplo, por vía intrarrectal o intravaginal).

Por “epítipo” se entiende un sitio en un antígeno al que responden linfocitos B y/o linfocitos T específicos, que hace a la molécula que incluye dicho epítipo capaz de inducir una reacción inmunológica o capaz de reaccionar con anticuerpos presentes en una muestra biológica. El término también se usa de forma intercambiable con “determinante antigénico” o “sitio determinante antigénico”. Un epítipo puede comprender 3 o más aminoácidos en una conformación espacial única del epítipo. Generalmente, un epítipo consiste en al menos 5 de tales aminoácidos y, más habitualmente, consiste en al menos 8-10 de tales aminoácidos. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar la conformación espacial de los aminoácidos e incluyen por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Además, la identificación de epítopos en una proteína dada se consigue fácilmente usando técnicas bien conocidas en este campo, tal como mediante el uso de estudios de hidrofobicidad y por serología dirigida. Véase, también, Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81: 3998-4002 (procedimiento general para sintetizar rápidamente péptidos para determinar la localización de epítopos inmunogénicos en un antígeno dado); Patente de Estados Unidos Nº 4.708.871 (procedimientos para identificar y sintetizar químicamente epítopos de antígenos); y Geysen y col., Molecular Immunology (1986) 23: 709-715 (técnica para identificar péptidos con alta afinidad para un anticuerpo dado). Pueden identificarse anticuerpos que reconocen el mismo epítipo en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro antígeno con un antígeno diana.

Una “respuesta inmunológica” o “respuesta inmune” como se usa en el presente documento es el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o una celular a un péptido como se describe en el presente documento cuando el polipéptido está presente en una composición de vacuna. Estos anticuerpos pueden neutralizar también la infectividad y/o mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o complemento de anticuerpo para proporcionar protección a un huésped inmunizado. La reactividad inmunológica puede determinarse en inmunoensayos convencionales, tales como ensayos de competición, bien conocidos en la técnica.

“Transferencia génica” o “suministro génico” se refiere a procedimientos o sistemas para insertar de forma fiable ADN de interés en una célula huésped. Tales procedimientos pueden dar como resultado expresión transitoria de ADN transferido no integrado, replicación extracromosómica y expresión de replicones transferidos (por ejemplo, episomas) o integración de material genético transferido en el ADN genómico de células huésped. Los vectores de

expresión de suministro génico, incluyen pero sin limitación, vectores derivados de virus alfa, virus de viruela y virus vaccinia. Cuando se usan para inmunización, tales vectores de expresión de suministro génico pueden denominarse vacunas o vectores de vacunas.

- El término “muestra” incluye muestras biológicas y no biológicas. Las muestras biológicas son las obtenidas o derivadas de un organismo vivo o que estaba vivo. Las muestras no biológicas no derivan de organismos vivos o que estaban vivos. Las muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, muestras derivadas de un animal (vivo o muerto) tales como órganos (por ejemplo, cerebro, hígado, riñón, etc.), sangre completa, fracciones de sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, lágrimas, tejido, órganos, biopsias. Los ejemplos de muestras no biológicas incluyen compuestos farmacéuticos, alimentos, cosméticos y similares.
- Las expresiones “marcador” y “marcador detectable” se refieren a una molécula capaz de detección, incluyendo, pero sin limitación, isótopos radiactivos, fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y similares. El término “fluorescente” se refiere a una sustancia o una parte de la misma que es capaz de mostrar fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos particulares de marcadores que pueden usarse con la invención incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, Texas red, luminol, ésteres de acradimum, NADPH, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano rusticano, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina y ureasa. El marcador también puede ser un marcador epitópico (por ejemplo, un marcador His-His), un anticuerpo o un oligonucleótido amplificable o detectable de otro modo.

II. Visión general de conjunto

- Se describen en el presente documento composiciones que comprenden un reactivo peptídico (y/o polinucleótidos que codifican estos reactivos peptídicos) en las que el reactivo peptídico es capaz de distinguir entre isoformas patógenas y no patógenas de proteínas priónicas, por ejemplo interaccionando preferentemente con una forma y no la otra. También se proporcionan anticuerpos generados usando estos reactivos peptídicos, así como composiciones que comprenden y procedimientos para preparar y usar estos reactivos peptídicos y/o anticuerpos (por ejemplo, para aislamiento y/o detección de la proteína priónica patógena).

- La invención se basa en parte en el descubrimiento por los presentes inventores de que fragmentos relativamente pequeños de una proteína priónica pueden interaccionar preferentemente con la forma patógena del prión. Estos fragmentos no necesitan ser parte de una estructura proteica mayor u otro tipo de molécula de armazón para mostrar esta interacción preferente con la isoforma priónica patógena. No deseando quedar ligado a ninguna teoría particular, parece que los fragmentos peptídicos toman espontáneamente una conformación que permite la unión con la isoforma priónica patógena pero no con la isoforma priónica no patógena, quizás imitando una conformación que está presente en la isoforma no patógena. Este principio general, de que ciertos fragmentos de una proteína de enfermedad conformacional interaccionan preferentemente con la forma patógena de la proteína de enfermedad conformacional, demostrado aquí para priones, puede aplicarse fácilmente a otras proteínas de enfermedad conformacional para producir reactivos peptídicos que interaccionan preferentemente con las formas patógenas. Resultará evidente para un experto habitual en la materia que, aunque los fragmentos proporcionan un punto de partida (con respecto a tamaño o características de secuencia, por ejemplo), que pueden realizarse muchas modificaciones en los fragmentos para producir reactivos peptídicos con atributos más deseables (por ejemplo, mayor afinidad, mayor estabilidad, mayor solubilidad, menor sensibilidad a proteasa, mayor especificidad, más facilidad para sintetizar, etc.).

- En general, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden interaccionar preferentemente con formas patógenas de proteínas priónicas. Por lo tanto, estos reactivos peptídicos posibilitan la detección rápida de la presencia de proteínas priónicas patógenas y, por lo tanto, el diagnóstico de enfermedades relacionadas con priones en prácticamente cualquier muestra, biológica o no biológica, incluyendo tejido vivo o muerto de cerebro, médula espinal u otro sistema nervioso así como sangre.

- Además, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden usarse para generar anticuerpos que pueden usarse en composiciones y procedimientos de diagnóstico o terapéuticos. En particular, cuando un reactivo específico y/o anticuerpo interaccionan preferentemente con una proteína patógena, puede usarse para detectar la presencia de isoformas patógenas, por ejemplo ordenando, agregando o induciendo de otro modo las proteínas de forma de enfermedad a un estado que después puede detectarse. Los reactivos peptídicos descritos en el presente documento son útiles en una diversidad de ensayos de diagnóstico, incluyendo para detectar formas patógenas en muestras que contienen sangre. Los anticuerpos y/o reactivos peptídicos (o una o más de sus partes componentes) pueden marcarse o etiquetarse para facilitar la detección y/o potenciar la interacción con las proteínas priónicas.

- Además, puede usarse cualquier sistema de amplificación de señal adecuado para facilitar adicionalmente la detección, incluyendo pero sin limitación, el uso de ADN ramificado para amplificación de señal (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.681.697; 5.424.413; 5.451.503; 5.4547.025; y 6.235.483); aplicar técnicas de amplificación de diana como PCR, amplificación por círculo rodante, invasor de Tercera Oleada (Arruda y col. 2002 Expert. Rev. Mol. Diagn. 2: 487; Patentes de Estados Unidos N° 6090606, 5843669, 5985557, 6090543, 5846717), NASBA, TMA, etc. (Patente de Estados Unidos N° 6.511.809; documento EP 0544212A1); y/o técnicas de inmuno-

PCR (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.665.539; Publicaciones Internacionales WO 98/23962; WO 00/75663; y WO 01/31056).

Además, los reactivos peptídicos y anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse, solos o en cualquier combinación, para tratar o prevenir enfermedad.

5 **III.A. Reactivos peptídicos**

Se describen en el presente documento reactivos peptídicos que interaccionan con formas patógenas de una proteína de enfermedad conformacional. Se ejemplifican proteínas de enfermedad conformacional en el presente documento por proteínas priónicas.

10 La siguiente es una lista no limitante de enfermedades con proteínas asociadas que toman dos o más conformaciones diferentes.

Enfermedad	Proteína o proteínas de Enfermedad Conformacional
Enfermedades priónicas (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt Jakob, tembladera, encefalopatía espongiforme bovina)	PrP ^{Sc}
Enfermedad de Alzheimer	APP, péptido A*, *1-antiquimotripsina, tan, componente no-A*
ALS	SOD y neurofilamento
Enfermedad de Pick	Cuerpo de Pick
Enfermedad de Parkinson	Cuerpo de Lewy
Diabetes de Tipo 1	Amilina
Mieloma múltiple – discrasias de células plasmáticas	Cadena de IgGL
Polineuropatía amiloidótica familiar	Transtiretina
Carcinoma medular de tiroides	Procalcitonina
Insuficiencia renal crónica	beta2-microglobulina
Insuficiencia cardíaca congestiva	Factor natriurético auricular
Amiloidosis sistémica y cardíaca senil	Transtiretina
Inflamación crónica	Amiloide A del suero
Aterosclerosis	ApoA1
Amiloidosis familiar	Gelsolina

Además, las proteínas de enfermedad conformacional enumeradas anteriormente incluyen cada una varias variantes o mutaciones que dan como resultado diferentes cepas que están abarcadas todas por la presente invención. Se proporciona posteriormente un análisis funcional de diversas regiones y secuencias de una proteína priónica de ratón. Véase, también, Priola (2001) Adv. Protein Chem. 57: 1-27. Las regiones y los restos correspondientes a los expuestos posteriormente para ratón (Mo), hámster (Ha), ser humano (Hu), aves (A) y ovejas (Sh) puede determinarse fácilmente para otras especies siguiendo procedimientos convencionales y las enseñanzas del presente documento.

Aminoácido o Aminoácidos	Función
Mol-28	Dominio de translocación (escindido)
22	Sitio de escisión potencial
23-28	Región básica que interacciona potencialmente con el sitio de unión de Proteína X ya que su delección anula el efecto de mutaciones asociadas con proteína X en el extremo C terminal de proteínas priónicas.
23-88	Región de repeticiones octapeptídicas (1-9 inserciones o 2 delecciones potencian la enfermedad); Coordinación de cobre por las histidinas en cada una de las repeticiones.

(continuación)

Aminoácido o Aminoácidos	Función
34-52	Parte de las repeticiones octapeptídicas mostrada para formar una hélice de poliprolina y también para formar hidroxiprolina.
86-91	Sitios de escisión de PrP ^{Sc} cuando se digiere con Proteinasa K
Hu82-146	Fragmento de 7 kDa hallado en cerebros enfermos de pacientes con GSS; el péptido sintético correspondiente a esta región forma canales iónicos.
HuP102	Mutación P102L asociada con GSS, no parece provocar conversión espontánea de la proteína priónica a conformación resistente a proteasa; Prolina conservada en todas las especies examinadas.
HuP105	Mutación P105L asociada con GSS, no parece provocar conversión espontánea de la proteína priónica a conformación resistente a proteasa; Prolina conservada en todas las especies examinadas.
Hu102-105	Motivo PXXP; posible hélice de poliprolina de tipo II
Mo_106	Asociado con resistencia a enfermedad
Hu106-126	Formas mutantes de péptidos sintéticos sugeridas que se ha sugerido que forman canales iónicos moduladores de cobre; se ha mostrado que G114 y G119 reducen el comportamiento fibrillogénico de este péptido ya que el péptido es más amiloidogénico cuando se muta a A.
Mo_111	Asociado con resistencia a enfermedad.
Sh104-113	Péptido co-cristalizado con Fab D13.
Ha109-112	Bucle reconocido específicamente por péptido D13 como se muestra en la estructura cristalina (M109 y M112 se insertan en bolsillos de unión dentro del Fab).
Hu113-120	Secuencia palindrómica; totalmente conservada.
A117V	Mutación patógena en el palíndromo; aumenta las propiedades amiloidogénicas de péptidos que contienen esa región.
Ha129-131	Lámina beta 1 en PrP ^C
Hu129/Go132	Polimorfismo asociado con susceptibilidad/resistencia a enfermedad priónica.
Ha136	Polimorfismo de alanina asociado con aumento en fosas revestidas en ovejas.
Mo138/Go142	Polimorfismo asociado con susceptibilidad/resistencia a enfermedad priónica.
Mo141-176	El área suprimida (junto con 23-88) en miniprión de ratón PrP106 no tiene efectos; sugiere una función no esencial para esta región.
Ha144-154	Hélice A
Ha155	Polimorfismo asociado con susceptibilidad/resistencia a enfermedad priónica.
Ha160-163	Lámina 2
MoV165	Barrera de especie; cuando los ratones transgénicos humanos mutan estos restos de vuelta a la secuencia de ratón, se obtienen tiempos de incubación mucho más rápidos.
MoQ167	Barrera de especie; cuando los ratones transgénicos humanos mutan estos restos de vuelta a la secuencia de ratón, se obtienen tiempos de incubación mucho más rápidos.
MoQ168	Sitio de unión a proteína X potencial; cuando se muta protege frente a enfermedad priónica
Sh171	Polimorfismo asociado con susceptibilidad/resistencia a enfermedad priónica.
MoQ172	Sitio de unión a proteína X potencial; cuando se muta protege frente a enfermedad priónica
176	Cisteína unida a disulfuro.
Ha173-194	Hélice B
178	Mutación asociada a enfermedad

(continuación)

Aminoácido o Aminoácidos	Función
180	Mutación asociada a enfermedad; sitio de glicosilación
196	Sitio de glicosilación
198	Mutación asociada a enfermedad.
Hu200-228	Hélice C
HuE200	Mutación a K asociada con CJD familiar en Judíos Libios (el polimorfismo M129 en combinación también aumenta las posibilidades de enfermedad)
208	Mutación asociada a enfermedad.
210	Mutación asociada a enfermedad.
MoT215	Sitio de unión a Proteína X potencial; cuando muta protege contra enfermedad priónica.
217	Mutación asociada a enfermedad.
MoQ219	Sitio de unión a Proteína X potencial; cuando muta protege frente a enfermedad priónica.
232	Mutación asociada a enfermedad.
232	Anclaje GPI
~233	Anclaje GPI potencial y sitio de escisión
233-254	Parte retirada de la proteína madura

También debería observarse que las proteínas priónicas (y otras proteínas de enfermedad conformacional) tienen dos conformaciones tridimensionales diferentes con la misma secuencia de aminoácidos. Una conformación se asocia con características de enfermedad y es generalmente insoluble mientras que la otra conformación no se asocia con características de enfermedad y es soluble. Véase, por ejemplo, Wille, y col., "Structural Studies of the Scrapie Prion Protein by Electron Crystallography", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99 (6): 3563-3568 (2002). Aunque se ejemplifica con respecto a proteínas priónicas, la presente invención no se limita a las enfermedades, proteínas y cepas enumeradas.

Por lo tanto, en ciertos aspectos, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de una proteína de origen natural, por ejemplo una proteína de enfermedad conformacional (por ejemplo, proteína priónica) o una proteína que contiene motivos o secuencias que muestran homología con proteínas priónicas. En particular, los reactivos peptídicos de la invención derivan típicamente de una proteína priónica de origen natural. Los reactivos peptídicos derivan preferentemente de las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones de las proteínas priónicas. Estas regiones preferidas se ejemplifican con respecto a la secuencia priónica de ratón (SEC ID N°: 2), en regiones de los restos de aminoácidos 23-43 y 85-156, y subregiones de las mismas. La invención no se limita a reactivos peptídicos derivados de las secuencias de ratón sino que incluye reactivos peptídicos derivados de forma similar como se describe en el presente documento, de secuencias priónicas de cualquier especie, incluyendo ser humano, bovino, oveja, ciervo, alce, hámster. Cuando derivan de proteínas priónicas, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden incluir un motivo de hélice de poliprolina de tipo II. Este motivo típicamente contiene la secuencia general PxxP (por ejemplo, restos 102-105 de SEC ID N°: 1), aunque se ha sugerido que otras secuencias, en particular tetrapéptidos de alanina, también forman hélices de poliprolina de tipo II (véase, por ejemplo, Nguyen y col. Chem Biol. 2000 7: 463; Nguyen y col. Science 1998 282: 2088; Schweitzer-Stenner y col. J. Am. Chem Soc. 2004 126: 2768). En la secuencia de PxxP, "x" puede ser cualquier aminoácido y "P" es prolina en la secuencia de origen natural pero puede reemplazarse por un sustituto de proteína en los reactivos peptídicos de la invención. Tales sustitutos de prolina incluyen glicinas N-sustituidas habitualmente denominadas peptoides. Por lo tanto, en los reactivos peptídicos de la invención que incluyen una hélice de poliprolina de tipo II basada en la secuencia de PxxP, "P" representa una prolina o un resto de glicina N-sustituida y "x" representa cualquier aminoácido o análogo de aminoácido. Se describen en el presente documento glicinas N sustituidas particularmente preferidas.

Además, se conoce la secuencia polinucleotídica y de aminoácidos para proteínas priónicas producidas por muchas especies diferentes, incluyendo ser humano, ratón, oveja y vaca. También existen variantes de estas secuencias dentro de cada especie. Por lo tanto, los reactivos peptídicos usados en la invención pueden comprender fragmentos o derivados de las secuencias de aminoácidos de cualquier especie o variante. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento derivan de cualquiera de las secuencias expuestas en la Figura 2 (SEC ID N°: 3-11). Las secuencias de los reactivos peptídicos que se desvelan específicamente en el presente documento se basan generalmente en la secuencia priónica de ratón, sin embargo,

un experto en la materia puede sustituir fácilmente secuencias correspondientes de otras especies cuando sea apropiado. Por ejemplo, si se desea diagnóstico o terapia humana, puede realizarse fácilmente reemplazo de las secuencias de ratón con las de las secuencias humanas correspondientes. En un ejemplo particular, en reactivos peptídicos derivados de la región de aproximadamente el resto 85 a aproximadamente el resto 112 (por ejemplo, SEC ID N°: 35, 36, 37, 40), la leucina en la posición correspondiente al resto 109 puede reemplazarse con una metionina, la valina en la posición correspondiente al resto 112 puede reemplazarse con metionina, y la asparagina en la posición correspondiente a 97 puede reemplazarse con serina. De forma similar, si se desea un diagnóstico bovino, las sustituciones apropiadas pueden realizarse en las secuencias peptídicas desveladas para reflejar la secuencia priónica bovina. Por lo tanto, continuando con el ejemplo anterior para reactivos peptídicos derivados de la región de aproximadamente el resto 85 a aproximadamente el resto 112, la leucina en la posición correspondiente al resto 109 puede reemplazarse con una metionina, y la asparagina en la posición correspondiente al 97 puede reemplazarse con glicina. También pueden usarse derivados de proteínas priónicas, incluyendo reemplazos de aminoácidos, deleciones, adiciones y otras mutaciones de estas secuencias. Preferentemente, cualquier reemplazo, adición y deleción de aminoácido en comparación con una secuencia proteica priónica no afecta a la capacidad del reactivo peptídico para interactuar con la forma patógena.

Debería entenderse que sin importar qué fuente se use para los reactivos peptídicos descritos en el presente documento, estos reactivos peptídicos no mostrarán necesariamente identidad de secuencia con proteínas priónicas conocidas. Por lo tanto, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden incluir uno o más reemplazos, adiciones y deleciones de aminoácidos en relación con la proteína priónica de origen natural o las secuencias desveladas en el presente documento, siempre que conserven la capacidad para interactuar preferentemente con formas patógenas de proteínas de enfermedad conformacional. En ciertas realizaciones, se prefieren reemplazos de aminoácidos conservativos. Son reemplazos de aminoácidos conservativos los que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácido = aspartato, glutamato; (2) básico = lisina, arginina, histidina; (3) no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar no cargado = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican en ocasiones conjuntamente como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonablemente predecible que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo conservativo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica.

También resultará evidente que puede usarse cualquier combinación de los aminoácidos naturales y análogos de aminoácidos no naturales para preparar los reactivos peptídicos descritos en el presente documento. Los análogos de aminoácidos habitualmente encontrados que no están codificados genéticamente incluyen, pero sin limitación, ornitina (Orn); ácido aminoisobutírico (Aib); benzotiofenilalanina (BtPhe); albizziina (Abz); t-butilglicina (Tle); fenilglicina (PhG); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); 2-naftilalanina (2-Nal); 1-naftilalanina (1-Nal); 2-tienilalanina (2-Thi); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); N-metilisoleucina (N-Melle); homoarginina (Har); N α -metilarginina (N-MeArg); fosfotirosina (pTyr o pY); ácido pipercolínico (Pip); 4-clorofenilalanina (4-ClPhe); 4-fluorofenilalanina (4-FPhe); ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (1- NCPC); y sarcosina (Sar). Cualquiera de los aminoácidos usados en los reactivos peptídicos de la presente invención puede ser el isómero D o, más típicamente, L.

Otros análogos de origen natural de aminoácidos que pueden usarse para formar los reactivos peptídicos descritos en el presente documento incluyen peptoides y/o compuestos peptidomiméticos tales como los análogos de ácido sulfónico y borónico de aminoácidos que son equivalentes biológicamente funcionales, también son útiles en los compuestos de la presente invención e incluyen compuestos que tienen uno o más enlaces de amida opcionalmente reemplazados por un isótero. En el contexto de la presente invención, por ejemplo, -CONH- puede reemplazarse por -CH₂NH-, -NHCO-, -SO₂NH-, -CH₂O-, -CH₂CH₂-, -CH₂S-, -CH₂SO-, -CH-CH- (cis o trans), -COCH₂-CH(OH)CH₂- y tetrazol 1,5-disustituido de modo que los radicales unidos por estos isósteros se mantendrían en orientaciones similares a radicales unidos por -CONH-. Uno o más restos de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden comprender peptoides.

Por lo tanto, los reactivos peptídicos también pueden comprender uno o más restos de glicina N-sustituidos (los péptidos que tienen uno o más restos de glicina N-sustituidos pueden denominarse "peptoides"). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, uno o más restos de prolina de cualquiera de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento se reemplazan con restos de glicina N sustituidos. Las glicinas N sustituidas particulares que son adecuadas a este respecto incluyen, pero sin limitación, N-(S)-1(feniletil)glicina; N-(4-hidroxifenil)glicina; N-(ciclopropilmetil)glicina; N-(isopropil)glicina; N-(3,5-dimetoxibencil)glicina; y N-butilglicina (por ejemplo, Figura 3). Otras glicinas N-sustituidas también pueden ser adecuadas para reemplazar uno o más restos de aminoácidos en las secuencias de reactivos peptídicos descritas en el presente documento. Para una revisión general de estos y otros análogos de aminoácidos y peptidomiméticos, véase, Nguyen y col. (2000) Chem Biol. 7(7): 463-473; Spatola, A. F., en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983). Véase también, Spatola, A. F., Peptide Backbone Modifications (revision general), Vega Data, Vol. 1, N° 3, (marzo de 1983); Morley, Trends Pharm Sci (revision general), pág. 463-468 (1980); Hudson, D. y col., Int J Pept Prot Res, 14: 177-185 (1979) (-CH₂NH-, CH₂CH₂-); Spatola y col., Life Sci, 38: 1243-

1249 (1986) (-CH₂-S); Hann J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307-314 (1982) (-CH-CH-, cis y trans); Almquist y col., J Med Chem, 23: 1392-1398 (1980) (-COCH₂-); Jennings-White y col., Tetrahedron Lett, 23:2533 (1982) (-COCH₂-); Szelke y col., Solicitud Europea EP 45665 CA: 97: 39405 (1982) (-CH(OH)CH₂-); Holladay y col., Tetrahedron Lett, 24: 4401-4404 (1983) (-C(OH)CH₂-); y Hruby, Life Sci, 31: 189-199 (1982) (-CH₂-S-). El ácido carboxílico C terminal puede reemplazarse por un ácido borónico -B(OH)₂ o éster borónico -B(OR)₂ u otro derivado de ácido borónico tal como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.288.707.

Los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden comprender monómeros, multímeros, moléculas cicladas, moléculas ramificadas, engarces y similares. También se contemplan multímeros (es decir, dímeros, trímeros y similares) de cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento o equivalentes biológicamente funcionales de los mismos. El multímero puede ser un homomultímero, es decir, compuesto de monómeros idénticos, por ejemplo, cada monómero es la misma secuencia peptídica. Como alternativa, el multímero puede ser un heteromultímero, por lo que se entiende que no todos los monómeros que componen el multímero son idénticos.

Los multímeros pueden formarse mediante la unión directa de los monómeros entre sí o con sustrato, incluyendo, por ejemplo, péptidos antigénicos múltiples (MAPS) (por ejemplo, MAPS simétricos), péptidos unidos a armazones poliméricos, por ejemplo, un armazón de PEG y/o péptidos unidos en tándem con o sin unidades espaciadoras.

Como alternativa, pueden añadirse grupos de enlace a las secuencias monoméricas para unir los monómeros entre sí y formar un multímero. Los ejemplos no limitantes de multímeros que usan grupos de enlace incluyen repeticiones en tándem que usan engarces de glicina; MAPS unidos mediante un engarce con un sustrato y/o péptidos enlazados linealmente unidos mediante engarces con un armazón. Los grupos de enlace pueden implicar usar unidades espaciadoras bifuncionales (bien homobifuncionales o bien heterobifuncionales) como se conoce por un experto en la materia. Como ejemplo y sin limitación, muchos procedimientos para incorporar tales unidades espaciadoras en el enlace de péptidos entre sí usando reactivos tales como succinimidil-4 (p-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), succinimidi-4-(p-maleimidofenil)butirato y similares se describen en el Pierce Immunotechnology Handbook (Pierce Chemical Co., Rockville, Ill.) y también están disponibles de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) y Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.) y se describen en "Comprehensive Organic Transformations", VCK-Verlagsgesellschaft, Weinheim/Alemania (1989). Un ejemplo de un grupo de enlace que puede usarse para enlazar las secuencias monoméricas entre sí es -Y₁-F-Y₂ en el que Y₁ e Y₂ son idénticos o diferentes y son grupos de alqueno de 0-20, preferentemente 0-8, más preferentemente 0-3 átomos de carbono y F es uno o más grupos funcionales tales como -O-, -S-, -S-S-, -C(O)-O-, -NR-, -C(O)-NR-, -NR-C(O)-O-, -NR-C(O)-NR-, -NR-C(S)-NR-, -NR-C(S)-O-. Y₁ e Y₂ pueden sustituirse opcionalmente con hidroxi, alcoxi, hidroxialquilo, alcoxialquilo, amino, carboxilo, carboxialquilo y similares. Se entenderá que puede unirse cualquier átomo apropiado del monómero al grupo de enlace.

Además, los reactivos peptídicos de la invención pueden ser lineales, ramificados o ciclados. Las unidades monoméricas pueden ciclarse o enlazarse entre sí para proporcionar los multímeros de una manera lineal o ramificada, en forma de un anillo (por ejemplo, un macrociclo), en forma de una estrella (dendrimeros) o en forma de una bola (por ejemplo, fulerenos). Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una multitud de polímeros que pueden formarse a partir de las secuencias monoméricas desveladas en el presente documento. En ciertas realizaciones, el multímero es un dímero cíclico. Usando la misma terminología que antes, el dímero puede ser un homodímero o un heterodímero.

Pueden realizarse formas cíclicas, bien monoméricas o bien multiméricas, mediante cualquiera de los enlaces descritos anteriormente, tales como, pero sin limitación, por ejemplo: (1) ciclación de la amina N terminal con el ácido carboxílico C terminal mediante formación de enlace amida directo entre el nitrógeno y el carbonilo C terminal, o mediante la intermediación de grupo espaciador tal como por ejemplo mediante condensación con un ácido carboxílico épsilon-amino; (2) ciclación mediante la formación de un enlace entre las cadenas laterales de dos restos, por ejemplo, mediante la formación de un enlace amida entre una cadena lateral de aspartato o glutamato y una cadena lateral de lisina o mediante formación de enlace disulfuro entre dos cadenas laterales de cisteína o entre una cadena lateral de penicilamina y cisteína o entre dos cadenas laterales de penicilamina, (3) ciclación mediante formación de un enlace amida entre una cadena lateral (por ejemplo, aspartato o lisina) y la amina N terminal o el carboxilo C terminal respectivamente; y/o (4) ligar dos cadenas laterales mediante la intermediación de un grupo espaciador de carbono corto.

Preferentemente, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento no son patógenos y/o infecciosos.

Los reactivos peptídicos de la infección pueden ser de cualquiera de 3 a aproximadamente 100 restos de longitud (o cualquier valor intermedio) o aún más largos, preferentemente de aproximadamente 4 a 75 restos (o cualquier valor intermedio), preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 63 restos (o cualquier valor intermedio) y aún más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 30 restos (o cualquier valor intermedio) y más preferentemente el reactivo peptídico será de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 restos.

- 5 Se derivan ejemplos no limitantes de reactivos peptídicos útiles en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento de secuencias mostradas en la Tabla 1 y en la Tabla 4. Los reactivos peptídicos en las tablas se representan por códigos de aminoácidos de una letra convencionales y se representan con su extremo N terminal a la izquierda y el extremo C terminal a la derecha. Los aminoácidos entre corchetes indican restos alternativos que pueden usarse en esa posición en diferentes reactivos peptídicos. Los paréntesis indican que el resto o los restos pueden estar presentes o ausentes del reactivo peptídico. Puede sustituirse cualquier resto de prolina con restos de glicina N-sustituida para formar peptoides. Cualquiera de las secuencias en las tablas puede incluir opcionalmente engarces de Gly (G_n en la que $n=1, 2, 3$ o 4) en el extremo N y/o C terminal.

TABLA 1

Secuencia peptídica	SEC ID N°
KKRPK	12
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC	13
(GGG)QWNKPSKPKTN	14
QWNKPSKPKTNMKHV	15
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGEN	16
TTKGENFTETD	17
GENFTETD	18
GENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQ A YY[Q/D] (G)(R)R[G/S][S/A]S	19
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGENFTE TD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQA YY[Q/D] (G)(R)R[G/S][S/A]S	20
[A/V/T/M] [V/I]LFSSPPVILLISFLIFL[I/M] VG	21
G[N/S]D[W/Y]EDRYYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D [Q/E/R]Y[S/N]NQNN[N/T] FVH	22
N[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTK	23
VYYR	24
RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]	25
KKRPKPGG(G)WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG	26
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)	27
WNTGGSRYFGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG	28
GGWGQGGTHSQWNKPSKPKTN	29
GGTHSQWNKPSKPKTN	30
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG GWGQPHGGGWGQPHGG	31
GQPHGGGW	32
RPIIHFGSDYEDRYYRENMR	33
RPMIHFGNDWEDRYYRENMYR	34
(GGGG)C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	35
(GGGG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)	37

(continuación)

Secuencia peptídica	SEC ID N°
[M/L]KH[M/V]	38
KPKTN[M/L]KH[M/V]	39
C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG) C	40
SRPIHFGSDYEDRYRENMHRYPN	41
PMIHFNDWEDRYRENMYRPVD	42
AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	43
RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)	44
GGGRPMIHFNDWEDRYRENMYRGG	45
(GG)C(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)C	46
AGAAAAGAVVGGLGG	47
GGLGG	48
LGS	49
QWNKPSKPKTN(GGG)	50
QWNKPSKPKTN(GGG)QWNKPSKPKTN	51
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	52
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53
GGTHNQWNKPSKPKTN	54
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	55
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGG	56
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57
YMLGSAM[S/N]R	58
[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	59
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	60
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]HFG[N/S]D	61
[W/Y]EDRYREN[M/H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y	62
[W/Y]EDRYREN[M/H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y [S/N]NQN[N/T]	63
D[Q/E/R]Y[S/N]NQN[N/T]	64
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGG	65
(GGG)KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS	66
(GGG)KKRPKPGGWNTGG	67
(GGG)KKRPKPGG	68
PHGGGWGQHGGSWGQPHGGSWGQ	69
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70
PHGGGWGQ	71
(GGG)KKRPKPGGKKRPKPGG	72
(GGG)GPKRKGP	73

(continuación)

Secuencia peptídica	SEC ID N°
(GGG)WNTGGSRYPGQGS	74
(GGG)WNKPSKPKT	75
(GGG)RPMIHFGNDWEDRYRENMYR(GG)C	76
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	77
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78
(GGG)NKPSKPK	79
(GGG)KPSKPK	80
(GGG)KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	82
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	83
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMKKK	84
(GGG)KKKKKKKKK	85
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	86
(GGG)NNKQSPWPTKK	87
DKDKGGVGALAGAAVAAGGDKDK	88
(GGG)QANKPSKPKTN	89
(GGG)QWNKASKPKTN	90
(GGG)QWNKPSAKTN	91
(GGG)QWNAPSKPKTN	92
(GGG)QWNKPSAPKTN	93
(GGG)QWNKPSKPATN	94
(GGG)QWNKASKAKTN	95
(GGG)KKRAKPGG	96
(GGG)KKRPKAGG	97
(GGG)KKRAKAGG	98
(GGG)QWNKASKPKTN	99
(GGG)QWAKPSKPKTN	100
(GGG)QWNKPAKPKTN	101
(GGG)QWNKPSKPKAN	102
(GGG)QWNKPSKPKTA	103
(GGG)AKRPKPGG	104
(GGG)KARP KPGG	105
(GGG)KKAPKPGG	106
(GGG)KKRPAPGG	107
(GGG)KKAPKAGG	108
(GGG)KKRPKPGGGWNTGG	127
QWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTN	128

En un aspecto, el reactivo peptídico de la invención incluye cada uno de los péptidos desvelados en el presente documento y derivados (como se describen en el presente documento) de los mismos. La invención por tanto incluye un reactivo peptídico derivado de un péptido de SEC ID N°: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 o 132.

La invención preferentemente incluye un reactivo peptídico derivado de un péptido de SEC ID N°: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 72, 74, 76, 77, 78, 81, 82, 84, 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 o 132.

En ciertas realizaciones preferidas, los reactivos peptídicos se unen específicamente a priones patógenos, por ejemplo, reactivos peptídicos derivados de péptidos de SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131, 132, 56, 57, 65, 82 o 84 y análogos (por ejemplo, sustitución de una o más prolinas con una glicina N-sustituida) y derivados de los mismos.

Como se ha descrito anteriormente, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden incluir una o más sustituciones, adiciones y/o mutaciones. Por ejemplo, uno o más restos puede reemplazarse en los reactivos peptídicos con otros restos, por ejemplo restos de alanina o con un análogo de aminoácido o resto de glicina N-sustituida para preparar un peptoide (véase, por ejemplo, Nguyen y col. (2000) Chem Biol. 7(7): 463-473).

Además, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento también pueden incluir componentes peptídicos o no peptídicos adicionales. Los ejemplos no limitantes de componentes peptídicos adicionales incluyen restos espaciadores, por ejemplo, dos o más restos de glicina (natural o derivatizada) o engarces de ácido aminohexanoico en uno o ambos extremos o restos que pueden ayudar a solubilizar los reactivos peptídicos, por ejemplo, restos ácidos tales como ácido aspártico (Asp o D) como se representa por ejemplo en SEC ID N°: 83, 86. En ciertas realizaciones, por ejemplo, los reactivos peptídicos se sintetizan como péptidos antigénicos múltiples (MAP). Típicamente, se sintetizan múltiples copias de los reactivos peptídicos (por ejemplo, 2-10 copias) directamente en un vehículo de MAP tal como una lisina ramificada u otro núcleo de vehículo de MAP. Véase, por ejemplo, Wu y col. (2001) J Am Chem Soc. 2001 123(28): 6778-84; Spetzler y col. (1995) Int J Pept Protein Res. 45(1): 78-85.

Los ejemplos no limitantes de componentes no peptídicos (por ejemplo, restos químicos) que pueden incluirse en los reactivos peptídicos descritos en el presente documento incluyen uno o más marcadores detectables, etiquetas (por ejemplo, biotina, marcadores de His, oligonucleótidos), colorantes, miembros de un par de unión y similares, en el extremo o internos en el reactivo peptídico. Los componentes no peptídicos también pueden unirse (por ejemplo, mediante unión covalente de uno o más marcadores), directamente o a través de un espaciador (por ejemplo, un grupo amida), con una posición o posiciones en el compuesto que se ha predicho por datos de actividad-estructura cuantitativos y/o modelización molecular que no interfieren. Los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento también pueden incluir restos químicos específicos de priones tales como colorantes específicos de amiloide, (por ejemplo, Rojo Congo, Tioflavina, etc.). La derivatización (por ejemplo, marcaje, ciclación, unión de restos químicos, etc.) de compuestos no debería interferir sustancialmente con (y puede incluso potenciar) las propiedades de unión, función biológica y/o actividad farmacológica del reactivo peptídico.

Los reactivos peptídicos de la invención típicamente tendrán al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia con fragmentos de proteínas priónicas o con las secuencias peptídicas expuestas en el presente documento. Preferentemente, los reactivos peptídicos tendrán al menos 70% de identidad de secuencia; más preferentemente al menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad de secuencia con fragmentos de proteínas priónicas o con las secuencias peptídicas expuestas en el presente documento.

Los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento interaccionan preferentemente con las formas patógenas y, en consecuencia, son útiles en una amplia serie de aplicaciones de aislamiento, purificación, detección, diagnóstico y terapéuticas. Por ejemplo, en realizaciones en las que el reactivo peptídico interacciona preferentemente con formas patógenas, los reactivos peptídicos en sí mismos pueden usarse para detectar formas patógenas en una muestra, tal como una muestra de sangre, tejido del sistema nervioso (cerebro, médula espinal, LCR, etc.) u otro tejido u órgano. Los reactivos peptídicos también son útiles para diagnosticar la presencia de enfermedad asociada con las formas patógenas, para aislar las formas patógenas y para descontaminar muestras retirando las formas patógenas.

La interacción de los reactivos peptídicos con proteínas priónicas puede ensayarse usando cualquier ensayo de unión conocido, por ejemplo inmunoensayos convencionales tales como ELISA, transferencias de Western y similares.

Un procedimiento conveniente para ensayar la especificidad de los reactivos peptídicos de la presente invención es seleccionar una muestra que contenga priones tanto patógenos como no patógenos. Tales muestras típicas incluyen tejido de cerebro o médula espinal de animales enfermos. Los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento que se unen específicamente a formas patógenas se unen a un soporte sólido (por procedimientos bien conocidos en la técnica y como se describe adicionalmente posteriormente) y se usan para separar ("extracción") priones patógenos de los otros componentes de la muestra y obtener un valor cuantitativo directamente relacionado con el número de interacciones de unión péptido-prión en el soporte sólido. También pueden usarse variaciones y otros ensayos conocidos en la técnica para demostrar la especificidad de los reactivos peptídicos de la invención. Véase, por ejemplo, Ejemplos.

Aunque no se requiere cuando se usan los reactivos peptídicos descritos en el presente documento, estos ensayos pueden utilizar el hecho de que los priones que tienen una conformación patógena son generalmente resistentes a ciertas proteasas, tales como proteinasa K. Las mismas proteasas son capaces de degradar priones en una conformación no patógena. Por lo tanto, cuando se usa una proteasa, la muestra puede separarse en dos volúmenes iguales. La proteasa puede añadirse a la segunda muestra y puede realizarse el mismo ensayo. Debido a que la proteasa en la segunda muestra degradará cualquier prión no patógeno, cualquier interacción de unión péptido-prión en la segunda muestra puede atribuirse a priones patógenos.

Por lo tanto, los ejemplos no limitantes de procedimientos para evaluar la especificidad de unión y/o afinidad de los reactivos peptídicos descritos en el presente documento incluyen procedimientos de transferencia de Western y Far-Western convencionales; péptidos marcados; ensayos de tipo ELISA; y/o ensayos basados en células. Las transferencias de Western, por ejemplo, emplean típicamente un anticuerpo primario marcado que detecta proteína priónica desnaturalizada de un gel de SDS-PAGE, en muestras obtenidas de un ensayo de "extracción" (como se describe en el presente documento), que se ha electrotransferido a nitrocelulosa o PVDF. Se han descrito anticuerpos que reconocen proteína priónica desnaturalizada (descritos, entre otros, en Peretz y col. 1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretz y col. 2001 Nature 412: 739; Williamson y col. 1998 J. Virol. 72: 9413; Patente de Estados Unidos N° 6.765.088; Patente de Estados Unidos N° 6.537.548) y algunos están disponibles en el mercado. Se han descrito otras moléculas de unión a priones, por ejemplo, polipéptidos híbridos con motivo injertado (véase, documento WO03/085086), ciertos polímeros catiónicos o aniónicos (véase, documento WO03/073106), ciertos péptidos que son "catalizadores de propagación" (véase, documento WO02/0974444) y plasminógeno. El anticuerpo primario se detecta después (y/o se amplifica) con una sonda para el marcador (por ejemplo, fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, peroxidasa de rábano rusticano, reactivo ECL, y/u oligonucleótidos amplificables). La unión también puede evaluarse usando reactivos de detección tales como un péptido con un marcador de afinidad (por ejemplo, biotina) que se marca y se amplifica con una sonda para el marcador de afinidad (por ejemplo, fosfatasa conjugada con estreptavidina, peroxidasa de rábano rusticano, reactivo ECL u oligonucleótidos amplificables). Además, pueden usarse procedimientos de placa de microtitulación similares a ELISA de tipo sándwich, por ejemplo, un reactivo peptídico específico de prión como se describe en el presente documento se usa para inmovilizar una proteína o proteínas priónicas en un soporte sólido (por ejemplo, pocillo de una placa de microtitulación, perla, etc.) y un reactivo de detección adicional que podría incluir, pero sin limitación, otro reactivo peptídico específico de prión con un marcador de afinidad y/o detección tal como una fosfatasa alcalina conjugada, peroxidasa de rábano rusticano, reactivo ECL u oligonucleótidos amplificables. También pueden emplearse ensayos basados en células, por ejemplo, en los que la proteína priónica se detecta directamente en células individuales (por ejemplo, usando un reactivo peptídico específico de prión marcado con fluorescencia que permite la separación celular basada en fluorescencia, recuento o detección de las células marcadas específicamente).

III.B. Producción de reactivo peptídico

Los reactivos peptídicos de la presente invención pueden producirse de varias maneras, todas las cuales se conocen bien en la técnica.

En una realización, en la que el reactivo peptídico es, completamente o en parte, un péptido codificado genéticamente, el péptido puede generarse usando técnicas recombinantes, bien conocidas en este campo. Un experto en la materia podría determinar fácilmente secuencias de nucleótidos que codifiquen el péptido deseado usando metodología convencional y las enseñanzas del presente documento. Una vez aislado, el péptido recombinante, opcionalmente, puede modificarse para incluir componentes no codificados genéticamente (por ejemplo, marcadores detectables, miembros de pares de unión, etc.) como se describe en el presente documento y como se conoce bien en la técnica, para producir los reactivos peptídicos.

Pueden idearse sondas oligonucleotídicas basadas en las secuencias conocidas y usarse para explorar bibliotecas genómicas o de ADNc. Las secuencias pueden después aislarse adicionalmente usando técnicas convencionales y, por ejemplo, emplearse enzimas de restricción para trincar el gen en partes deseadas de la secuencia de longitud completa. De forma similar, pueden aislarse secuencias de interés directamente de células y tejidos que las contienen, usando técnicas conocidas, tales como extracción de fenol y manipularse adicionalmente la secuencia para producir los truncamientos deseados. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., mencionado anteriormente, para una descripción de técnicas usadas para obtener y aislar ADN.

Las secuencias que codifican el péptido también pueden producirse de forma sintética, por ejemplo, basándose en las secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos particular deseada. La secuencia completa se ensambla generalmente a partir de oligonucleótidos solapantes preparados por procedimientos convencionales y ensamblados en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) *Nature* 292: 756; Nambair y col. (1984) *Science* 223: 1299; Jay y col. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 6311; Stemmer y col. (1995) *Gene* 164: 49-53.

Se usan fácilmente técnicas recombinantes para clonar secuencias que codifican polipéptidos útiles en los reactivos peptídicos reivindicados que pueden después mutarse *in vitro* mediante el reemplazo del par o los pares de bases apropiados, para dar como resultado el codón para el aminoácido deseado. Dicho cambio puede incluir solamente un par de bases, efectuando un cambio en un aminoácido único, o puede abarcar cambios de varios pares de bases. Como alternativa, las mutaciones pueden efectuarse usando un cebador con emparejamiento erróneo que hibrida con la secuencia de nucleótidos parental (generalmente ADNc correspondiente a la secuencia de ARN), a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión de la doble cadena con emparejamientos erróneos. El cebador puede hacerse específico manteniendo la longitud de cebador y la composición de bases dentro de límites relativamente estrechos y manteniendo la base mutante localizada de forma central. Véase, por ejemplo, Innis y col. (1990) *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*; Zoller y Smith, *Methods Enzymol.* (1983) 100: 468. Se efectúa extensión de cebadores usando ADN polimerasa, el producto clonado y clones que contienen el ADN mutado, derivado por segregación de la primera hebra extendida del cebador, seleccionado. La selección puede conseguirse usando el cebador mutante como una sonda de hibridación. La técnica también es aplicable para generar múltiples mutaciones puntuales. Véase, por ejemplo, Dalbie-McFarland y col. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1982) 79: 6409.

Una vez que se han aislado y/o sintetizado las secuencias codificantes, estas pueden clonarse en cualquier vector o replicón adecuado para expresión. (Véase, también, Ejemplos). Como resultará evidente a partir de las enseñanzas del presente documento, puede generarse una amplia diversidad de vectores que codifican polipéptidos modificados creando construcciones de expresión que se unen operativamente, en diversas combinaciones, a polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen delecciones o mutaciones en los mismos.

Se conocen por los expertos en la materia numerosos vectores de clonación, y la selección de un vector de clonación apropiado es un asunto de elección. Los ejemplos de vectores de ADN recombinante para clonación y células huésped que pueden transformar incluyen el bacteriófago λ (*E. coli*), pBR322 (*E. coli*), pACYC177 (*E. coli*), pKT230 (bacterias gram-negativas), pGV1106 (bacterias gram-negativas), pLAFR1 (bacterias gram-negativas), pME290 (bacterias gram-negativas no *E. coli*), pHV14 (*E. coli* y *Bacillus subtilis*), pBD9 (*Bacillus*), pIJ61 (*Streptomyces*), pUC6 (*Streptomyces*), Ylp5 (*Saccharomyces*), YCp19 (*Saccharomyces*) y virus del papiloma bovino (células de mamífero). Véase, en general, *DNA Cloning: Vols. I y II*, mencionado anteriormente; Sambrook y col., mencionado anteriormente; B. Perbal, mencionado anteriormente.

También pueden usarse sistemas de expresión de células de insectos, tales como sistemas de baculovirus, y se conocen por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* N° 1555 (1987). Están disponibles en el mercado materiales y procedimientos para sistemas de expresión de células de insectos/baculovirus en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBac").

También pueden usarse sistemas de expresión vegetales para producir los reactivos peptídicos descritos en el presente documento. En general, tales sistemas usan vectores basados en virus para transfectar células vegetales con genes heterólogos. Para una descripción de tales sistemas, véase, por ejemplo, Porta y col., *Mol. Biotech.* (1996) 5: 209-221; y Hackland y col., *Arch. Virol.* (1994) 139: 1-22.

Los sistemas virales, tales como un sistema de infección/transfección basado en vaccinia, como se describe en Tomei y col., *J. Virol.* (1993) 67: 4017-4026 y Selby y col., *J. Gen. Virol.* (1993) 74: 1103-1113, también encontrarán uso con la presente invención. En este sistema, las células se transfectan en primer lugar *in vitro*, con un virus vaccinia recombinante que codifica la ARN polimerasa de bacteriófago T7. Esta polimerasa presenta especificidad intensa porque solamente transcribe moldes que porten promotores de T7. Después de la infección, las células se transfectan con el ADN de interés, dirigido por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del virus vaccinia recombinante transcribe el ADN transfectado a ARN que después se traduce a proteína por la maquinaria de traducción del huésped. El procedimiento posibilita producción citoplasmática transitoria de alto nivel de grandes cantidades de ARN y su producto o sus productos de traducción.

El gen puede situarse bajo el control de un promotor, sitio de unión a ribosoma (para expresión bacteriana) y, opcionalmente, un operador (denominados colectivamente en el presente documento elementos de "control"), de modo que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido deseado se transcribe a ARN en la célula huésped transformada por un vector que contiene esta construcción de expresión. La secuencia codificante puede contener o no un péptido señal o secuencia líder. Con la presente invención, pueden usarse tanto los péptidos señal de origen natural como secuencias heterólogas. Pueden retirarse secuencias líder por el huésped en procesamiento postraduccion. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.431.739; 4.425.437; 4.338.397. Tales secuencias incluyen, pero sin limitación, el líder TPA, así como la secuencia señal de melitina de abeja melífera.

También pueden ser deseables otras secuencias reguladoras que posibilitan la regulación de la expresión de las secuencias proteicas en relación con el crecimiento de la célula huésped. Tales secuencias reguladoras se conocen por los expertos en la materia y los ejemplos incluyen los que provocan que la expresión de un gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. También

5 pueden estar presentes otros tipos de elementos reguladores en el vector, por ejemplo, secuencias potenciadoras.

Las secuencias de control y las secuencias reguladoras pueden estar ligadas a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Como alternativa, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado.

10 En algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia codificante de modo que esta pueda unirse a las secuencias de control con la orientación apropiada; es decir, para mantener la fase de lectura apropiada. Pueden prepararse mutantes o análogos mediante la delección de una parte de la secuencia que codifica la proteína, mediante inserción de una secuencia y/o mediante sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia. Se conocen bien por los expertos en la materia técnicas para modificar secuencias de nucleótidos, tales como mutagénesis dirigida. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., mencionado anteriormente, *DNA Cloning*, Vols. I y II,

15 mencionado anteriormente; *Nucleic Acid Hybridization*, mencionado anteriormente.

El vector de expresión se usa después para transformar una célula huésped apropiada. Se conocen en la técnica varias líneas celulares de mamífero e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), tales como, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células Vero293, así como otras. De forma similar, huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con las presentes construcciones de expresión. Los huéspedes de levadura útiles en la presente invención incluyen entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las

25 células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

Dependiendo del sistema de expresión y huésped seleccionado, las proteínas de la presente invención se producen cultivando células huésped transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente en condiciones en las que se expresa la proteína de interés. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica.

30 En una realización, las células transformadas secretan el producto polipeptídico al medio circundante. Pueden incluirse ciertas secuencias reguladoras en el vector para potenciar la secreción del producto proteico, por ejemplo, usando una secuencia líder de activador de plasminógeno tisular (TPA), una secuencia señal de interferón (γ o α) u otras secuencias peptídicas señal de proteínas secretoras conocidas. El producto polipeptídico secretado puede

35 después aislarse por diversas técnicas descritas en el presente documento, por ejemplo, usando técnicas de purificación convencionales tales como, pero sin limitación, resina de hidroxiapatita, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, HPLC, técnicas inmunoabsorbentes, cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación y similares.

40 Como alternativa, las células transformadas se rompen, usando medios químicos, físicos o mecánicos, que lisan las células pero mantienen los polipéptidos recombinantes sustancialmente intactos. También pueden obtenerse proteínas intracelulares retirando componentes de la membrana o pared celular, por ejemplo, mediante el uso de detergentes o disolventes orgánicos, de modo que se produzca filtración de los polipéptidos. Tales procedimientos se conocen por los expertos en la materia y se describen en, por ejemplo, Protein Purification Applications: A Practical Approach, (E.L.V. Harris y S. Angal, Eds., 1990).

45 Por ejemplo, los procedimientos para romper células para su uso con la presente invención incluyen pero sin limitación: sonicación o ultrasonificación; agitación; extrusión líquida o sólida; tratamiento con calor; congelación-descongelación; desecación; descompresión explosiva; choque osmótico; tratamiento con enzimas líticas incluyendo proteasas tales como tripsina, neuraminidasa y lisozima; tratamiento alcalino; y el uso de detergentes y disolventes tales como sales biliares, dodecilsulfato sódico, Tritón, NP40 y CHAPS. La técnica particular usada para romper las

50 células es en gran medida un tema de elección y dependerá del tipo celular en el que se exprese el polipéptido, las condiciones de cultivo y cualquier pretratamiento usado.

Después de la rotura de las células, se retiran los residuos celulares, generalmente por centrifugación y los polipéptidos producidos de forma intracelular se purifican adicionalmente, usando técnicas de purificación convencionales tales como, pero sin limitación, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, HPLC, técnicas inmunoabsorbentes, cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación y similares.

55 Por ejemplo, un procedimiento para obtener los polipéptidos intracelulares de la presente invención implica purificación de afinidad, tal como por cromatografía de afinidad usando anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos

previamente generados) o mediante cromatografía de afinidad por lectinas. Son resinas de lectinas particularmente preferidas las que reconocen restos de manosa tales como, pero sin limitación, resinas derivadas de aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), aglutinina de *Lens culinaris* (LCA o lectina de lenteja), aglutinina de *Pisum sativum* (PSA o lectina de guisante), aglutinina de *Narcissus pseudonarcissus* (NPA) y aglutinina de *Allium ursinum* (AUA). La elección de una resina de afinidad adecuada está dentro de la experiencia de la técnica. Después de purificación de afinidad, los polipéptidos pueden purificarse adicionalmente usando técnicas convencionales bien conocidas en este campo, tal como por cualquiera de las técnicas descritas anteriormente.

Oportunamente los reactivos peptídicos pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, por cualquiera de varias técnicas que se conocen por los expertos en la materia de los péptidos. En general, estos procedimientos emplean la adición secuencial de uno o más aminoácidos a una cadena peptídica creciente. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer aminoácido está protegido por un grupo protector adecuado. El aminoácido protegido o derivatizado puede después unirse a un soporte sólido inerte o utilizarse en solución añadiendo el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) protegido de forma adecuada, en condiciones que posibilitan la formación de un enlace de amida. El grupo protector se retira después del resto de aminoácido recién añadido y el siguiente aminoácido (protegido de forma adecuada) se añade después, y así sucesivamente. Después de que los aminoácidos deseados se hayan enlazado en la secuencia apropiada, se retira cualquier grupo protector restante (y cualquier soporte sólido, si se usan técnicas de síntesis de fase sólida) secuencialmente o simultáneamente, para producir el polipéptido final. Por modificación sencilla de este procedimiento general, es posible añadir más de un aminoácido cada vez a una cadena creciente, por ejemplo, acoplando (en condiciones que no racemizan centros quirales) un tripéptido protegido con un dipéptido protegido de forma apropiada para formar, después de la desprotección, un pentapéptido. Véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editores E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, Nueva York, 1980), pág. 3-254, para técnicas de síntesis peptídica de fase sólida; y M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlín 1984) y E. Gross y J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, para síntesis de solución clásica. Estos procedimientos típicamente se usan para polipéptidos relativamente pequeños, es decir, de hasta aproximadamente 50-100 aminoácidos de longitud, pero también son aplicables a polipéptidos mayores.

Los grupos protectores típicos incluyen t-butiloxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) benciloxicarbonilo (Cbz); p-toluenosulfonilo (Tx); 2,4-dinitrofenilo; bencilo (Bzl); bifenilisopropiloxicarboxi-carbonilo, t-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, o-bromobenciloxicarbonilo, ciclohexilo, isopropilo, acetilo, o-nitrofenilsulfonilo y similares.

Los soportes sólidos típicos son soportes polímeros reticulados. Estos pueden incluir polímeros basados en estireno reticulados con divinilbenceno, por ejemplo, copolímeros de divinilbenceno-hidroximetilestireno, copolímeros de divinilbenceno-clorometilestireno y copolímeros de divinilbenceno-benzhidrilaminopoliestireno.

La síntesis de polímeros que contienen peptoides puede llevarse a cabo de acuerdo con, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.877.278; 6.033.631; Simon y col. (1992) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 9367.

El reactivo peptídico de la presente invención también puede prepararse químicamente por otros procedimientos tales como por el procedimiento de síntesis simultánea de múltiples péptidos. Véase, por ejemplo, Houghten *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 5131-5135; Patente de Estados Unidos N° 4.631.211.

IV. Anticuerpos

Además, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento usados en la invención pueden usarse para generar anticuerpos. Los anticuerpos inducidos contra estos reactivos peptídicos son específicos para priones patógenos. En otros casos, los anticuerpos se unen a formas tanto patógenas como no patógenas. En más casos adicionales, los anticuerpos son específicos para isoformas no patógenas. Opcionalmente, los anticuerpos descritos en el presente documento inhiben la conversión de la forma no patógena a la conformación patógena. Típicamente, los anticuerpos se generan administrando un reactivo peptídico como se describe en el presente documento (o polinucleótido que codifica dicho reactivo peptídico) a un animal. Los procedimientos también pueden incluir aislar los anticuerpos del animal.

Los anticuerpos de la invención pueden ser preparaciones de anticuerpos policlonales o monoclonales, antiseros mono-específicos, anticuerpos humanos, o pueden ser anticuerpos quiméricos o híbridos, tales como anticuerpos humanizados, fragmentos (Fab')₂ de anticuerpos alterados, fragmentos F(ab), fragmentos Fv, anticuerpos de dominio sencillo, fragmentos o construcciones de anticuerpo dimérico o trimérico, minicuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que se unen al antígeno en cuestión.

Se producen anticuerpos usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia y se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.011.308; 4.722.890; 4.016.043; 3.876.504; 3.770.380; y 4.372.745. Por ejemplo, se generan anticuerpos policlonales inmunizando a un animal adecuado, tal como un ratón, rata, conejo, oveja o cabra, con un antígeno de interés (por ejemplo, un reactivo peptídico como se describe en el presente documento). Para potenciar la inmunogenicidad, el antígeno puede unirse a un vehículo antes de la inmunización.

Tales vehículos se conocen bien por los expertos habituales en la materia. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando el antígeno en solución salina, preferentemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente vía subcutánea o intramuscular). El animal se estimula generalmente 2.6 semanas después con una o más inyecciones del antígeno en solución salina, preferentemente usando adyuvante incompleto de Freund. También pueden generarse anticuerpos por inmunización *in vitro*, usando procedimientos conocidos en la técnica. Se obtiene después antisuero policlonal del animal inmunizado.

Se preparan en generar anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497, o una modificación del mismo. Típicamente, un ratón o una rata se inmuniza como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en lugar de extraer sangre del animal para extraer suero, se retira el bazo (y opcionalmente varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, las células del bazo pueden explorarse (después de la retirada de células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo revestido con el antígeno. Los linfocitos B, que expresan inmunoglobulina unida a membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa, y no se retiran por aclarado con el resto de la suspensión. Después se induce que los linfocitos B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, se fusionen con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se siembran por dilución limitante, y se ensayan con respecto a la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizador (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas que secretan anticuerpo monoclonal seleccionados se cultivan después *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o reactores de fibra hueca) o *in vivo* (por ejemplo, en líquido ascítico en ratones).

Los anticuerpos humanizados y quiméricos también son útiles en la invención. Se analizan en general moléculas de anticuerpos híbridos (quiméricos) en Winter y col. (1991) Nature 349: 293-299 y Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. Se analizan en general moléculas de anticuerpos humanizados en Riechmann y col. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeven y col. (1988) Science 239: 1534-1536; y Publicación de Patente de Reino Unido N° GB 2.276.169, publicada el 21 de septiembre de 1994). Un enfoque para obtener por ingeniería genética un anticuerpo humanizado implica clonar ADN recombinante que contiene las secuencias de promotor, líder y región variable de un gen de anticuerpo de ratón y los exones de región constante de un gen de anticuerpo humano, para crear un anticuerpo ratón-humano, un anticuerpo humanizado. Véase, en general, Kuby, "Immunology, 3ª Edición", W.H. Freeman and Company, Nueva York (1998) en la página 136.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que se dirigen contra reactivos peptídicos como se describe en el presente documento, son particularmente útiles en aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas, por ejemplo, los anticuerpos que se neutralizan son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales en particular, pueden usarse para inducir anticuerpos anti-idiotípicos.

Los anticuerpos anti-idiotípicos son inmunoglobulinas que portan una "imagen interna" del antígeno del agente frente al que se desea protección. Se conocen en este campo técnicas para inducir anticuerpos anti-idiotípicos. Véase, por ejemplo, Grzych (1985), Nature 316: 74; MacNamara y col. (1984), Science 226: 1325; Uytendaele y col. (1985), J. Immunol. 134: 1225. Estos anticuerpos anti-idiotípicos también pueden ser útiles para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades conformacionales.

También se incluyen fragmentos de anticuerpo dentro del alcance de la invención. Se conocen en la técnica varios fragmentos de anticuerpo que comprenden sitios de unión a antígeno capaces de mostrar propiedades de unión inmunológica de una molécula de anticuerpo intacta. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpos funcionales escindiendo una región constante, no responsable de la unión a antígeno, de la molécula de anticuerpo, usando por ejemplo, pepsina, para producir fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos contendrán dos sitios de unión a antígeno, pero carecen de una parte de la región constante de cada una de las cadenas pesadas. De forma similar, si se desea, los fragmentos Fab, que comprenden un sitio de unión a antígeno único, pueden producirse, por ejemplo, mediante digestión de anticuerpos monoclonales o policlonales con papaína. También pueden producirse fragmentos funcionales, que incluyen solamente las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, usando técnicas convencionales tales como producción recombinante o escisión proteolítica preferente de moléculas de inmunoglobulina. Estos fragmentos se conocen como F_v . Véase, por ejemplo, Inbar y col. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 2659-2662; Hochman y col. (1976) Biochem. 15: 2706-2710; y Ehrlich y col. (1980) Biochem. 19: 4091-4096.

Un polipéptido F_v de cadena sencilla ("sFv" o "scFv") es un heterodímero $V_H - V_L$ unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican V_H y V_L unidos por un engarce que codifica péptido. Huston y col. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883. Se han descrito varios procedimientos para distinguir y desarrollar estructuras químicas (engarces) para convertir las cadenas polipeptídicas ligera y pesada agregadas de forma natural, pero separadas químicamente, de una región V de anticuerpo a una molécula sFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura a la estructura de un sitio de unión de antígeno. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513; 5.132.405; y 4.946.778. Las moléculas sFv pueden producirse usando procedimiento descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Huston y col. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5879-5338; Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513; 5.132.405 y 4.946.778.

Los criterios de diseño incluyen determinar la longitud apropiada para abarcar la distancia entre el extremo C terminal de una cadena y el extremo N terminal de la otra, en la que el engarce se forma generalmente a partir de restos de aminoácidos hidrófilos pequeños que no se enrollan o forman estructuras secundarias. Tales procedimientos se han descrito en la técnica. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.091.513; 5.132.405 y 4.946.778. Los engarces adecuados generalmente comprenden cadenas polipeptídicas de conjuntos alternantes de restos de glicina y serina, y pueden incluir restos de ácido glutámico y lisina insertados para potenciar la solubilidad.

Los "mini-anticuerpos" o "minicuerpos" también encontrarán uso con la presente invención. Los minicuerpos son cadenas polipeptídicas sFv que incluyen dominios de oligomerización en sus extremos C terminales, separados del sFv por una región bisagra. Pack y col., (1992) Biochem 31: 1579-1584. El dominio de oligomerización comprende hélices α autoasociativas, por ejemplo, cremalleras de leucina, que pueden estabilizarse adicionalmente por enlaces disulfuro adicionales. El dominio de oligomerización se diseña para que sea compatible con plegamiento vectorial a través de una membrana, un procedimiento que se cree que facilita el plegamiento *in vivo* del polipéptido en una proteína de unión funcional. Generalmente, se producen minicuerpos usando procedimientos recombinantes bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pack y col., (1992) Biochem 31: 1579-1584; Cumber y col. (1992) J. Immunology 149B: 120-126.

También pueden usarse medios no convencionales para generar e identificar anticuerpos. Por ejemplo, puede explorarse una biblioteca de presentación de fagos para anticuerpos que se unen más a formas patógenas que formas no patógenas o viceversa. Véase, en general, "Recombinant Monoclonal Antibody Technology", Transfus. Clin. Biol. (2002) 9(1): 15-22; Sidhu, "Phage Display in Pharmaceutical Biotechnology", Curr. Opin. Biotechnol. (2000) 11(6): 610 - 616; Sharon, y col., "Recombinant Polyclonal Antibody Libraries", Comb. Chem. High Throughput Screen (2000) 3(3): 185-196; y Schmitz y col., "Phage Display: A Molecular Tool for the Generation of Antibodies – Review", Placenta, (2000) 21 Supl A: S106-12.

Como se ha observado anteriormente, los anticuerpos también pueden generarse administrando una secuencia polinucleotídica que codifica un reactivo peptídico como se describe en el presente documento a un animal. Cuando el péptido se expresa *in vivo*, se generan anticuerpos *in vivo*. Se analizan procedimientos para el suministro de polinucleótidos posteriormente.

La especificidad de los anticuerpos de la invención puede ensayarse como se ha descrito anteriormente para reactivos peptídicos. Como se ha mencionado anteriormente, los priones que tienen una conformación patógena son generalmente resistentes a ciertas proteasas, tales como proteinasa K. Las mismas proteasas son capaces de degradar priones en una conformación no patógena. Un procedimiento para ensayar la especificidad de los anticuerpos de la presente invención es seleccionar una muestra biológica que contengan priones tanto patógenos como no patógenos. La muestra puede separarse en dos volúmenes iguales. Pueden añadirse anticuerpos de la invención adsorbidos en un soporte sólido (como describe adicionalmente posteriormente) y usarse para obtener un valor cuantitativo directamente relacionado con el número de interacciones de unión anticuerpo-prión en el soporte sólido. Puede añadirse proteasa a la segunda muestra y realizarse el mismo ensayo. Debido a que la proteasa en la segunda muestra degradará cualquier prión no patógeno, cualquier interacción de unión anticuerpo-prión en la segunda muestra puede atribuirse a priones patógenos. Pueden usarse variaciones y otros ensayos conocidos en la técnica para demostrar la especificidad de los anticuerpos de la invención.

V. Ensayos

Los reactivos peptídicos de la invención pueden usarse en una diversidad de ensayos para explorar muestras (por ejemplo, muestras biológicas tales como sangre, cerebro, médula espinal, LCR o muestras de órganos), por ejemplo para detectar la presencia o ausencia de formas patógenas de proteínas de enfermedad conformacional en estas muestras. A diferencia de muchos reactivos de diagnóstico de priones actuales, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento permitirán la detección en prácticamente cualquier tipo de muestra biológica o no biológica, incluyendo muestra sanguínea, productos sanguíneos o muestras de biopsia.

La invención proporciona de este modo un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende: poner en contacto la muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un reactivo peptídico de la invención en condiciones que permitan la unión del reactivo peptídico con la proteína priónica patógena, si está presente; y detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra por su unión con el reactivo peptídico.

Para su uso en el procedimiento de la invención, la muestra puede ser cualquiera que se sepa que, o se sospeche que, contiene una proteína priónica patógena. La muestra puede ser una muestra biológica (es decir, una muestra preparada a partir de un organismo vivo o que estaba vivo) o una muestra no biológica. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, órganos, sangre completa, fracciones de sangre, componentes sanguíneos, plasma, plaquetas, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido cerebral, tejido del sistema nervioso, tejido muscular, médula ósea, orina, lágrimas, tejido no del sistema nervioso, órganos y/o biopsias o necropsias. Las muestras biológicas preferidas incluyen sangre completa, fracciones de sangre, componentes de la sangre, plasma, plaquetas y suero.

La muestra se pone en contacto con uno o más reactivos peptídicos de la invención en condiciones que permitan la unión del reactivo o los reactivos peptídicos con la proteína priónica patógena si está presente en la muestra. Está dentro de la competencia de un experto habitual en la materia determinar las condiciones particulares basándose en la divulgación del presente documento. Típicamente, la muestra y el reactivo o los reactivos peptídicos se incuban juntos en un tampón adecuado a pH aproximadamente neutro (por ejemplo, un tampón de TBS a pH de 7,5) a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 4 °C) durante un periodo de tiempo adecuado (por ejemplo, aproximadamente 1 hora a durante noche) para permitir que se produzca la unión.

La presencia de proteína priónica patógena en la muestra se detecta por su unión con el reactivo o los reactivos peptídicos. La detección de la presencia de la proteína priónica patógena por su unión con el reactivo o los reactivos peptídicos de la invención puede conseguirse de varias maneras. Por ejemplo, el reactivo o los reactivos peptídicos de la invención pueden usarse para "capturar" específicamente la proteína priónica patógena mediante la formación de un primer complejo entre el reactivo o los reactivos peptídicos y la proteína priónica patógena pudiendo dicho primer complejo separarse de los materiales de muestra no unidos, incluyendo cualquier proteína priónica no patógena presente en la muestra. La proteína priónica patógena puede después detectarse mediante la adición y unión de uno o más reactivos peptídicos de la invención, habiéndose marcado de forma detectable dichos reactivos peptídicos (es decir, reactivo o reactivos peptídicos marcados). La proteína priónica patógena puede detectarse cuando está en el primer complejo, o la proteína priónica patógena puede disociarse del primer complejo antes de la adición de y unión con el reactivo o los reactivos peptídicos marcados de la invención.

Como alternativa, cuando el reactivo o los reactivos peptídicos de la invención se usan para capturar la proteína priónica patógena como se ha descrito anteriormente, y el primer complejo se separa de los materiales de muestra no unidos, puede usarse un reactivo de unión a prión marcado de forma detectable para detectar la proteína priónica patógena, bien mientras la proteína priónica patógena está en el primer complejo o bien después de la disociación de la proteína priónica patógena del primer complejo. Un "reactivo de unión a prión" es un reactivo que se une a una proteína priónica en cualquier conformación, típicamente el reactivo de unión a prión se unirá a una forma desnaturalizada de la proteína priónica. Tales reactivos se han descrito e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-priones (descritos, entre otros, en Peretz y col. 1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretz y col. 2001 Nature 412:739; Williamson y col. 1998 J. Virol. 72: 9413; Patente de Estados Unidos N° 6.765.088; Patente de Estados Unidos N° 6.537.548), polipéptidos híbridos con motivo injertado (véase, documento WO03/085086), ciertos polímeros catiónicos o aniónicos (véase, documento WO03/073106), ciertos péptidos que son "catalizadores de propagación" (véase, documento WO02/0974444) y plasminógeno. Resultará evidente que si el reactivo de unión a prión particular usado se une a una forma desnaturalizada del prión, la proteína priónica patógena "capturada" debería desnaturalizarse antes de la detección con el reactivo de unión a prión.

En otra alternativa, puede usarse un reactivo de unión a prión para capturar cualquier prión (patógeno o no patógeno) presente en la muestra para formar un primer complejo, y uno o más reactivos peptídicos marcados de forma detectable de la invención pueden usarse para detectar los priones patógenos en el primer complejo o después de disociación del primer complejo.

En una alternativa adicional, la muestra puede capturarse directamente (es decir, sin ningún reactivo de unión a prión) en un soporte sólido y las proteínas priónicas patógenas, si están presentes, pueden detectarse usando uno o más reactivos peptídicos marcados de forma detectable de la invención.

Las etapas de captura y detección descritas anteriormente pueden llevarse a cabo en solución o pueden llevarse a cabo en o sobre un soporte sólido, o cualquier combinación de fase de solución y sólida. Algunos formatos de fase de solución adecuados incluyen, por ejemplo, espectroscopía de correlación de fluorescencia (véase, Giese y col. Arch. Virol. Suppl. 2000 16: 161; Bieschke y col. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2000 97: 55468) y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Típicamente, el reactivo o los reactivos peptídicos de la invención se marcarán de forma detectable en estos formatos de fase de solución. Preferentemente, el reactivo o los reactivos peptídicos se marcarán con dos o más marcadores detectables distinguibles. La presencia de una proteína priónica patógena puede detectarse mediante la coincidencia de dos o más marcadores detectables en un primer complejo. Se describen en el presente documento formatos de ensayo de fase sólida. En general, para formatos de fase sólida, el reactivo de captura (que puede ser uno o más de los reactivos peptídicos de la invención, o uno o más reactivos de unión a prión) se une, o se adapta para unión, a un soporte sólido. El reactivo de captura puede adaptarse para unión a un soporte sólido por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, el reactivo de captura y el soporte sólido pueden cada uno comprender un miembro de un par de unión, de modo que cuando el reactivo de captura se pone en contacto con el soporte sólido el reactivo de captura se une al soporte sólido a través de la unión de los miembros del par de unión. Por ejemplo, el reactivo de captura puede comprender biotina y el soporte puede comprender avidina o estreptavidina. Además de biotina-avidina y biotina-estreptavidina, otros pares de unión adecuados para esta realización incluyen, por ejemplo, antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo, mimetopo-anticuerpo, receptor-hormona, receptor-ligando, agonista-antagonista, lectina-carbohidrato, Proteína A-anticuerpo Fc. Tales pares de unión se conocen bien (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.551.843 y 6.586.193) y un experto habitual en la materia sería competente para seleccionar pares de unión adecuados y adaptarlos para su uso con la presente invención. Cuando el reactivo de captura se adapta para unión con el soporte como se ha descrito anteriormente, la muestra puede ponerse en contacto con el reactivo de captura antes o después de que el reactivo de captura se una al soporte.

La invención proporciona de este modo un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

- 5 (a) poner en contacto una muestra sospecha de contener un prión patógeno con un primer reactivo peptídico en condiciones que permitan la unión del primer reactivo peptídico con la proteína priónica patógena, si está presente, para formar un primer complejo; y
- (b) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra mediante su unión con el primer reactivo peptídico.

10 El reactivo peptídico es como se describe en el presente documento, preferentemente el reactivo peptídico deriva de un péptido que tiene una secuencia de SEC ID N°: 12-132, más preferentemente, de un péptido que tiene una secuencia de una de SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 131, 132; o de péptidos que tienen SEC ID N°: 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118 o 128; o de péptidos que tienen SEC ID N°: 56, 57, 65, 82 o 84. El reactivo peptídico puede estar biotinilado. El reactivo peptídico puede estar unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones, el reactivo peptídico puede estar marcado de forma detectable.

15 La invención también proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo peptídico en condiciones que permitan la unión del primer reactivo peptídico con el prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo;
- 20 (b) poner en contacto dicho primer complejo con un segundo reactivo peptídico en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo peptídico con el prión patógeno en dicho primer complejo, en el que dicho segundo reactivo peptídico comprende un marcador detectable; y
- (c) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra por su unión con el segundo reactivo peptídico.

25 Cuando el procedimiento utiliza un primer reactivo peptídico y un segundo reactivo peptídico, el primer y segundo reactivos peptídicos pueden ser iguales o diferentes. Por "iguales" se entiende que el primer y segundo reactivos peptídicos difieren solamente en la inclusión de un marcador detectable en el segundo reactivo peptídico.

30 El primer reactivo peptídico y el segundo reactivo peptídico pueden derivar de fragmentos peptídicos de la misma región de una proteína peptídica o de fragmentos peptídicos de una región diferente de una proteína priónica. El primer reactivo peptídico y el segundo reactivo peptídico pueden seleccionarse cada uno de forma independiente de reactivos peptídicos derivados de péptidos que tienen SEC ID N°: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131 o 132.

35 El primer reactivo peptídico y el segundo reactivo peptídico pueden seleccionarse cada uno de forma independiente de un reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131, 132, 56, 57, 65, 82 y 84.

40 El primer reactivo peptídico puede seleccionarse de un reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 o 127, y el segundo reactivo peptídico puede seleccionarse de reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131 o 132 o viceversa. El primer reactivo peptídico puede seleccionarse de un reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, o 127, y el segundo reactivo peptídico puede seleccionarse de reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 56, 57, 65, 82 y 84, o viceversa. El primer reactivo peptídico puede seleccionarse de un reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131 o 132, y el segundo reactivo peptídico puede seleccionarse de reactivo peptídico derivado de péptidos que tienen SEC ID N°: 56, 57, 65, 82 y 84 o viceversa.

50 El primer reactivo peptídico puede estar biotinilado y puede unirse a un soporte sólido.

La invención también proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo peptídico

en condiciones que permitan la unión del primer reactivo peptídico con el prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo;

(b) retirar materiales de muestra no unidos;

(c) disociar dicho prión patógeno de dicho primer complejo;

5 (d) poner en contacto dicho prión patógeno disociado con un segundo reactivo peptídico en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo peptídico con el prión patógeno, en el que dicho segundo reactivo peptídico comprende un marcador detectable; y

(e) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra mediante su unión con el segundo reactivo peptídico. El primer y segundo reactivos peptídicos pueden ser iguales o diferentes.

10 La invención también proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

(a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo peptídico en condiciones que permitan la unión del primer reactivo peptídico con el prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo;

15 (b) retirar materiales de muestra no unidos;

(c) disociar dicho prión patógeno de dicho primer complejo;

(d) poner en contacto dicho prión patógeno disociado con un reactivo de unión a prión en condiciones que permiten la unión del reactivo de unión a prión con el prión patógeno, en el que dicho reactivo de unión a prión comprende un marcador detectable; y

20 (e) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra mediante su unión con el reactivo de unión a prión. El reactivo de unión a prión puede ser un anticuerpo anti-prión, polipéptido híbrido con motivos injertados, polímeros catiónicos o aniónicos, catalizadores de propagación y plasminógeno, o cualquier otro resto que se sabe que se une a proteínas priónicas.

25 La invención también proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

(a) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un prión patógeno con un reactivo de unión a prión en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a prión con el prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo;

(b) retirar materiales de muestra no unidos;

30 (c) poner en contacto dicho primer complejo con un reactivo peptídico en condiciones que permitan la unión del reactivo peptídico con el prión patógeno, en el que dicho reactivo peptídico comprende un marcador detectable; y

(d) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra mediante su unión con el reactivo peptídico.

35 La invención también proporciona un procedimiento para detectar un prión patógeno en una muestra, que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido que comprende un primer reactivo peptídico.

(b) poner en contacto el soporte sólido con una muestra en condiciones que permitan que los priones patógenos, cuando estén presentes en la muestra, se unan al primer reactivo peptídico;

40 (c) poner en contacto el soporte sólido con un segundo reactivo peptídico marcado de forma detectable en condiciones que permitan que el segundo reactivo peptídico se una a priones patógenos unidos con el primer reactivo peptídico; y,

(d) detectar complejos formados entre el primer reactivo peptídico, un prión patógeno de la muestra y el segundo reactivo peptídico, detectando de este modo la presencia del prión patógeno en la muestra.

45 Como alternativa el reactivo de unión a prión puede proporcionarse en el soporte sólido. La invención proporciona de este modo un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo de unión a prión;

(b) poner en contacto el soporte sólido con una muestra en condiciones que permitan que las proteínas priónicas, cuando están presentes en la muestra, se unan al reactivo de unión a prión;

(c) poner en contacto el soporte sólido con un segundo reactivo peptídico marcado de forma detectable; y

5 (d) detectar complejos formados entre el reactivo de unión a prión, un prión patógeno de la muestra biológica, y el segundo reactivo peptídico.

El ensayo puede proporcionarse en un formato competitivo; por lo tanto la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

(a) proporcionar un soporte sólido que comprende un primer reactivo peptídico;

10 (b) combinar el soporte sólido con un primer ligando marcado de forma detectable, en el que la afinidad de unión del primer reactivo peptídico con el primer ligando marcado de forma detectable es más débil que la afinidad de unión del primer reactivo peptídico con un prión patógeno;

(c) combinar una muestra con el soporte sólido en condiciones que permitan que un prión patógeno, cuando está presente en la muestra, se una al primer reactivo peptídico y reemplace el primer ligando;

(d) detectar complejos formados entre el primer reactivo peptídico y el prión patógeno de la muestra.

15 En general, se usan reactivos peptídicos como se describen en el presente documento para unirse a proteínas priónicas en una muestra (por ejemplo, como un reactivo de captura) y/o para detectar la presencia de proteínas priónicas (por ejemplo, como un reactivo de detección). El reactivo de captura y reactivo de detección pueden ser moléculas separadas o, como alternativa, una molécula puede cumplir funciones tanto de captura como de
20 detección. En ciertas realizaciones, los reactivos de captura y/o detección son reactivos peptídicos descritos en el presente documento que interactúan preferentemente con priones patógenos (es decir, son específicos de priones patógenos). En otras realizaciones, el reactivo de captura es específico para priones patógenos y el reactivo de detección se une a formas tanto patógenas como no patógenas, por ejemplo, anticuerpos que se unen a proteínas priónicas. Tales reactivos de unión a prión se han descrito anteriormente en el presente documento. Como alternativa, en otras realizaciones, el reactivo de captura no es específico para priones patógenos y el reactivo de
25 detección es específico para priones patógenos.

Puede usarse después cualquier medio adecuado de detección para identificar unión entre un reactivo peptídico como se describe en el presente documento y una proteína priónica. Por ejemplo, los ensayos como se describen en el presente documento pueden implicar el uso de reactivos peptídicos o anticuerpos marcados. Los marcadores detectables adecuados para su uso en la invención incluyen cualquier molécula capaz de detección, incluyendo pero
30 sin limitación, isótopos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromóforos, nanocristales semiconductores fluorescentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores de enzima, cromóforos, colorantes, iones metálicos, sales metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina, estreptavidina o haptenos) y similares. Los marcadores adicionales incluyen, pero sin limitación, los que usan fluorescencia, incluyendo las sustancias o partes de las mismas que son capaces de mostrar fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos particulares
35 de marcadores que pueden usarse en la invención, incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano rusticano (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetil acridinio (DMAE), Texas red, luminol, NADPH y β -galactosidasa. Además, el marcador detectable puede incluir un marcador oligonucleotídico, pudiendo detectarse dicho marcador por cualquier procedimiento de detección de ácidos nucleicos incluyendo PCR, TMA, b-DNA, NASBA, etc.

40 Además del uso de reactivos de detección marcados (descritos anteriormente), puede usarse inmunoprecipitación para separar reactivos peptídicos que están unidos a la proteína priónica (por ejemplo, prión patógeno). Preferentemente, la inmunoprecipitación se facilita mediante la adición de un agente potenciador de precipitación. Un agente potenciador de precipitación incluye restos que pueden potenciar o aumentar la precipitación de los reactivos peptídicos que se unen a priones patógenos. Tales agentes potenciadores de precipitación incluyen
45 polietilenglicol (PEG), proteína G, proteína A y similares. Cuando se usan proteína G o proteína A como agentes potenciadores de precipitación, la proteína puede opcionalmente unirse a una perla, preferentemente una perla magnética. La precipitación puede potenciarse adicionalmente mediante el uso de centrifugación o con el uso de fuerza magnética. Se conoce en la técnica el uso de tales agentes potenciadores de precipitación.

50 También se conocen ensayos que amplifican las señales a partir del reactivo de detección. Son ejemplos de estos ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos mediados y marcados con enzima, tales como ensayos de ELISA.

Una o más de las etapas de los ensayos descritos en el presente documento pueden realizarse en solución (por ejemplo, un medio líquido) o en un soporte sólido. Un soporte sólido, para los fines de la invención, puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y puede tener una superficie rígida o semi-rígida a la que se puede
55 ligar o unir una molécula de interés (por ejemplo, reactivos peptídicos de la invención, proteínas priónicas, anticuerpos, etc.). Los soportes sólidos ejemplares incluyen, pero sin limitación, sustratos tales como nitrocelulosa,

polivinilcloruro; polipropileno, poliestireno, látex, policarbonato, nailon, dextrano, quitina, arena, sílice, piedra pómez, agarosa, celulosa, vidrio, metal, poliácridamida, silicio, goma, polisacáridos, fluoruro de polivinilo; papel diazotizado; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y cualquier material habitualmente usado para síntesis en fase sólida, separaciones de afinidad, purificaciones, reacciones de hibridización, inmunoensayos y otras aplicaciones tales. El soporte puede estar en partículas o puede estar en forma de una superficie continua e incluye membrana, malla, placas, sedimentos, portaobjetos, discos, capilares, fibras huecas, agujas, alfileres, microplacas, fibras sólidas, geles (por ejemplo, geles de sílice) y perlas (por ejemplo, perlas de vidrio poroso, geles de sílice, perlas de poliestireno opcionalmente reticuladas con divinilbenceno, perlas de co-poli injertadas, perlas de poliácridamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticuladas con N-N'-bis-acriloielendiamina, perlas magnéticas de óxido de hierro y partículas de vidrio revestidas con un polímero hidrófobo.

Los reactivos peptídicos como se describen en el presente documento pueden acoplarse fácilmente al soporte sólido usando técnicas convencionales. Puede potenciarse la inmovilización en el soporte acoplando en primer lugar el reactivo peptídico a una proteína (por ejemplo, cuando la proteína tiene mejores propiedades de unión a fase sólida). Las proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen pero sin limitación, macromoléculas tales como albúminas de suero incluyendo albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la materia. Otros reactivos que pueden usarse para unir moléculas al soporte incluyen polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y similares. Tales moléculas y procedimientos para acoplar estas moléculas a proteínas, se conocen bien por los expertos habituales en la materia. Véase, por ejemplo, Brinkley, M.A., (1992) *Bioconjugate Chem.*, 3: 2-13; Hashida y col. (1984) *J. Appl. Biochem.*, 6: 56-63; y Anjaneyulu y Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30: 117-124.

Si se desea, las moléculas para añadir al soporte sólido pueden funcionalizarse fácilmente para crear restos de estireno o acrilato, permitiendo de este modo la incorporación de las moléculas en poliestireno, poliácridato u otros polímeros tales como poliimida, poliácridamida, polietileno, polivinilo, polidiacetileno, polifenilén-vinileno, polipéptido, polisacárido, polisulfona, polipirrol, polimidazol, politiofeno, poliéter, epoxis, vidrio de sílice, gel de sílice, siloxano, polifosfato, hidrogel, agarosa, celulosa y similares.

Los reactivos peptídicos pueden unirse al soporte sólido a través de la interacción de un par de unión de moléculas. Tales pares de unión se conocen bien y se describen ejemplos en otra parte del presente documento. Un miembro del par de unión se acopla por técnicas descritas anteriormente al soporte sólido y el otro miembro de par de unión se une al reactivo peptídico (antes, durante o después de la síntesis). El reactivo peptídico modificado de este modo puede ponerse en contacto con la muestra y puede producirse interacción con el prion patógeno, si está presente, en solución, después de lo cual el soporte sólido puede ponerse en contacto con el reactivo peptídico (o complejo péptido-prion). Los pares de unión preferidos para esta realización incluyen biotina y avidina, y biotina y estreptavidina.

También pueden usarse controles adecuados en los ensayos de la invención. Por ejemplo, puede usarse un control negativo de PrP^C en los ensayos. También podría usarse un control positivo de PrP^{Sc} (o PrPres) en los ensayos. Tales controles pueden opcionalmente marcarse de forma detectable.

Pueden aplicarse varias variaciones y combinaciones usando los reactivos peptídicos de la invención en los ensayos de la invención. Los siguientes ejemplos no limitantes se describen para ilustración.

En ciertas realizaciones, se describen ensayos para detectar priones patógenos en una muestra biológica. En tales procedimientos, el reactivo peptídico de la invención puede usarse como un reactivo de captura para priones patógenos en una muestra biológica o no biológica. En dicha realización, se hace reaccionar en primer lugar un soporte sólido (por ejemplo, perlas magnéticas) con un reactivo peptídico como se describe en el presente documento que interacciona preferentemente con priones patógenos de modo que el reactivo peptídico se inmovilice de forma suficiente al soporte. El soporte sólido se pone en contacto después con una muestra sospechosa de contener priones patógenos en condiciones que permitan que el reactivo peptídico se una a priones patógenos. Después de la retirada del material de muestra no unido, los priones patógenos unidos pueden disociarse del reactivo peptídico y detectarse usando cualquier mecanismo de detección conocido, incluyendo pero sin limitación, transferencia de Western y ELISA, por ejemplo, como se describe posteriormente en los Ejemplos y las referencias citadas en los mismos. Como alternativa, el prion patógeno unido puede detectarse sin disociación del reactivo peptídico.

Como alternativa, el reactivo peptídico de la invención puede ponerse en contacto con la muestra sospechosa de contener priones patógenos antes de unirse al soporte sólido, seguido de unión del reactivo peptídico al soporte sólido (por ejemplo, el reactivo peptídico puede biotinarse y el soporte sólido comprender avidina o estreptavidina). Después de la retirada del material de muestra no unido, los priones patógenos pueden disociarse del reactivo peptídico y detectarse usando cualquier mecanismo de detección conocido, incluyendo pero sin limitación transferencia de Western y ELISA, por ejemplo, como se describe posteriormente en los Ejemplos y referencias citadas en los mismos. Como alternativa, los priones patógenos no necesitan disociarse del reactivo peptídico antes de la detección.

La detección de los priones patógenos en la muestra puede conseguirse usando un reactivo peptídico como se describe en el presente documento, que interacciona preferentemente con formas patógenas. Como alternativa, pueden detectarse priones patógenos mediante reactivos de detección no específicos (por ejemplo, péptidos o anticuerpos que se unen a PrP de forma general). En ciertas realizaciones, después de la disociación del soporte sólido, el prion patógeno capturado se desnaturaliza antes de la detección, lo que puede facilitar la detección permitiendo el uso de reactivos de detección no específicos. Como alternativa, el prion patógeno capturado puede desnaturalizarse sin disociación del reactivo peptídico si, por ejemplo, el reactivo peptídico se modifica para contener un grupo reactivo activable (por ejemplo, un grupo fotorreactivo) que puede usarse para unir covalentemente el reactivo peptídico y el prion patógeno.

Pueden realizarse protocolos tales como ELISA como se describe en Ryou y col. (2003) Lab Invest. 83(6): 837-43 para cuantificar la cantidad de prion patógeno eluido del soporte sólido. (Véase, Ejemplos). Brevemente, los pocillos de una placa de microtitulación se revisten con el prion patógeno capturado que se ha disociado (eluido) del soporte sólido. La placa o las placas pueden lavarse para retirar restos no unidos y se añade una molécula de unión marcada de forma detectable, tal como un anticuerpo anti-prion o un reactivo peptídico de la invención (el mismo usado para captura o uno diferente). Se permite que esta molécula de unión reaccione con cualquier prion de muestra capturado, la placa se lava y la presencia de los anticuerpos marcados y/o reactivos peptídicos marcados se detecta usando procedimientos bien conocidos en la materia. La molécula de unión no necesita ser específica para la forma priónica patógena sino que puede unirse a ambas isoformas o un PrP desnaturalizado, siempre que el reactivo de captura sea específico para la forma priónica patógena.

En otros ensayos ejemplares, el reactivo de captura y prion no se disocian antes de la detección. Por ejemplo, un soporte sólido (por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación) se une a una primera molécula específica de prion patógeno (reactivo peptídico). Una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene priones patógenos se añade después al soporte sólido. Después de un período de incubación suficiente para permitir que cualquier prion patógeno se una a la primera molécula, el soporte sólido puede lavarse para retirar restos no unidos y añadirse una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable como se ha descrito anteriormente, tal como un segundo anticuerpo anti-PrP o un reactivo peptídico específico de prion. Como alternativa, puede acoplarse una molécula que se une a formas patógenas y no patógenas (por ejemplo, reactivo de captura no específico) con un soporte sólido (por ejemplo, revistiendo los pocillos de una placa de microtitulación) y puede conseguirse detección usando un reactivo de detección específico de prion patógeno (por ejemplo, reactivo peptídico descrito en el presente documento).

Otro ensayo ejemplar es un ensayo de “tipo sándwich de dos péptidos” que puede usarse para detectar priones (por ejemplo, priones patógenos). En esta técnica, el soporte sólido se hace reaccionar con uno o más de los primeros reactivos peptídicos de la invención como se describe en el presente documento, se lava para retirar el primer reactivo peptídico que no ha reaccionado y después se expone a la muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra biológica) sospechosa de contener una proteína priónica patógena en condiciones que permitan la interacción entre el primer reactivo o reactivos peptídicos y cualquier proteína priónica patógena presente en la muestra. Los componentes de la muestra que no han reaccionado se retiran y se añaden uno o más segundos reactivos peptídicos de la invención en condiciones que permitan la interacción del segundo reactivo o reactivos peptídicos para interaccionar con cualquier proteína priónica patógena presente. La interacción entre primer péptido-proteína priónica-segundo péptido puede detectarse por cualquier medio que se conozca en la técnica. Típicamente el segundo o los segundos reactivos peptídicos comprenden un marcador detectable. Para este ensayo, el primer o los primeros reactivos peptídicos y/o el segundo o los segundos reactivos peptídicos interaccionan preferentemente con una proteína priónica patógena.

En ciertas realizaciones, se usan anticuerpos anti-PrP para detectar proteínas priónicas. Se han descrito anticuerpos, anticuerpos modificados y otros reactivos, que se unen a priones, particularmente a PrP^C o al PrP desnaturalizado, y algunos de estos están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, anticuerpos anti-prion descritos en Peretz y col. 1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretz y col. 2001 Nature 412: 739; Williamson y col. 1998 J. Virol. 72: 9413; Patente de Estados Unidos Nº 6.765.088. Algunos de estos y otros están disponibles en el mercado de, entre otros, InPro Biotechnology, South San Francisco, CA, Cayman Chemicals, Ann Arbor MI; Prionics AG, Zúrich; véase también documento WO 03/085086 para descripción de anticuerpos modificados).

Los reactivos peptídicos de la invención también pueden usarse en ensayos de competición. Pueden usarse medios de detección para identificar cuándo un ligando que se une débilmente a PrP^{Sc} se desplaza por un reactivo peptídico descrito en el presente documento que es específico para PrP^{Sc}. Por ejemplo, una muestra sospechosa de contener PrP^{Sc} puede adsorberse en un soporte sólido. Posteriormente, el soporte sólido se combina con un ligando marcado de forma detectable que se une a PrP^{Sc} (por ejemplo, plasminógeno, receptor de laminina y heparán sulfato) en condiciones tales que el ligando marcado de forma detectable se una a PrP^{Sc}. Se detectan los complejos ligando-PrP^{Sc}. Se añade después un reactivo peptídico de unión a PrP^{Sc} como se describe en el presente documento. La afinidad de unión del ligando marcado de forma detectable es más débil que la afinidad de unión del reactivo peptídico para un prion patógeno. En consecuencia, el reactivo peptídico de unión a PrP^{Sc} reemplazará el ligando marcado y la reducción de cantidades detectadas del ligando marcado indica que pueden detectarse complejos formados entre el reactivo peptídico y priones patógenos de la muestra biológica.

Los reactivos de ensayo descritos anteriormente, incluyendo los reactivos peptídicos descritos en el presente documento, pueden proporcionarse en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, para realizar ensayos de detección como se ha descrito anteriormente. Cuando el reactivo peptídico se adsorbe en un soporte sólido, el kit puede comprender adicionalmente o como alternativa tales reactivos peptídicos adsorbidos en uno o más soportes sólidos. El kit puede contener además controles positivos y negativos adecuados, como se ha descrito anteriormente. El kit también puede contener, dependiendo del ensayo de detección particular usado, marcadores adecuados y otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares).

En más realizaciones adicionales, la invención se refiere a soportes sólidos que comprenden un reactivo peptídico específico de prión patógeno. También se proporcionan procedimientos para producir estos soportes sólidos, por ejemplo (a), proporcionando un soporte sólido; y (b) uniendo al mismo uno o más reactivos peptídicos específicos de prión patógeno.

Los reactivos peptídicos específicos de prión pueden usarse además para aislar proteínas priónicas patógenas usando soportes de afinidad. Los reactivos peptídicos pueden fijarse en un soporte sólido mediante, por ejemplo, adsorción, enlace covalente, etc. de modo que los reactivos peptídicos conserven su actividad de unión selectiva de prión. Opcionalmente, pueden incluirse grupos espaciadores, por ejemplo, de modo que el sitio de unión del reactivo peptídico permanezca accesible. Las moléculas inmovilizadas pueden después usarse para unirse a la proteína priónica patógena de una muestra biológica, tal como sangre, plasma, cerebro, médula espinal, otros tejidos. Los reactivos o complejos peptídicos unidos se recuperan del soporte mediante, por ejemplo, un cambio del pH o el prión patógeno puede disociarse del complejo.

Las muestras que pueden ensayarse de acuerdo con la invención incluyen cualquier muestra susceptible de un ensayo de anticuerpo, incluyendo muestras de tejido del sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, LCR, etc.), sangre y/u otras muestras tisulares de sujetos vivos o muertos. Como se ha observado anteriormente, en realizaciones preferidas, las muestras son sangre, producto sanguíneo o muestras de tejido obtenidas de un sujeto vivo.

VI. Aplicaciones Adicionales

A. Detección

Como se ha descrito anteriormente, los reactivos peptídicos descritos en el presente documento pueden usarse para diagnosticar enfermedad priónica en un sujeto. Además, los reactivos peptídicos descritos anteriormente pueden usarse también para detectar contaminación priónica patógena en suministros sanguíneos y/o alimentarios. Por lo tanto, puede prepararse un suministro sanguíneo que esté sustancialmente sin priones patógenos explorando alícuotas de muestras recogidas individuales o muestras agrupadas usando cualquiera de los ensayos de detección descritos en el presente documento. Las muestras o muestras agrupadas que están contaminadas con priones patógenos pueden eliminarse antes de que se combinen. De este modo, puede proporcionarse un suministro sanguíneo sustancialmente sin contaminación de priones patógenos. Por "sustancialmente sin priones patógenos" se entiende que no se detecta la presencia de priones patógenos usando ninguno de los ensayos descritos en el presente documento. Resulta importante que los reactivos peptídicos descritos en el presente documento, que ya se ha mostrado que detectan formas proteicas patógenas en tejido cerebral diluido 10^6 veces por tejido normal, son el único reactivo demostrado que puede ser capaz de detectar priones patógenos en sangre.

La invención proporciona por lo tanto un procedimiento para preparar suministro sanguíneo que está sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo dicho suministro sanguíneo sangre completa, glóbulos rojos, plasma, plaquetas o suero, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) explorar alícuotas de sangre completa, glóbulos rojos, plasma, plaquetas o suero de muestras sanguíneas recogidas por cualquiera de los procedimientos de detección proporcionados en el presente documento para detectar priones patógenos;

(b) eliminar muestras en la que se detectan priones patógenos; y

(c) combinar muestras en las que no se detectan priones patógenos para proporcionar un suministro sanguíneo que está sustancialmente sin priones patógenos.

De forma similar, el suministro alimentario puede explorarse con respecto a la presencia de priones patógenos para proporcionar alimento que está sustancialmente sin priones patógenos. Por lo tanto, usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, pueden explorarse muestras de organismos vivos que se pretende que sean alimento para consumo humano o animal con respecto a la presencia de priones patógenos. También pueden explorarse muestras tomadas de productos alimentarios que se pretende que entren en el suministro alimentario. Se identifican muestras en las que se detectan priones patógenos y el organismo vivo o el alimento que se pretende que entre en el suministro alimentario del que se retiran las muestras en las que se detectaron priones patógenos del suministro alimentario. De este modo, puede proporcionarse un suministro alimentario que esté sustancialmente sin priones patógenos.

La invención proporciona de este modo un procedimiento para preparar suministro alimentario que está sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 (a) explorar una muestra recogida de organismos vivos que entrará en el suministro alimentario o una muestra recogida de alimento que se pretende que entre en el suministro alimentario por cualquiera de los procedimientos de detección proporcionados en el presente documento para detectar priones patógenos
- (b) eliminar muestras en las que se detecten priones patógenos; y
- (c) combinar muestras en las que no se detectan priones patógenos para proporcionar un suministro alimentario que está sustancialmente sin priones patógenos.

B. Purificación

- 10 Los péptidos de la invención también pueden usarse para retirar priones patógenos de una muestra, tanto para el fin de aislar el prión patógeno (por ejemplo, para concentrar la proteína priónica antes de la detección) como para el fin de eliminar el prión patógeno de la muestra (por ejemplo, como medio para proporcionar una muestra que esté sustancialmente sin priones patógenos). En estos procedimientos, los reactivos peptídicos se proporcionan típicamente en un soporte sólido. El soporte sólido que comprende el reactivo peptídico se pone en contacto con la
- 15 muestra que contiene el prión patógeno en condiciones para unir el prión con el reactivo peptídico. Si el objetivo es aislar el prión patógeno, se retira la muestra no unida y se recoge el soporte sólido que contiene los priones; si el objetivo es eliminar los priones de la muestra, se recoge la muestra no unida.

La invención proporciona por lo tanto un procedimiento para aislar una proteína priónica patógena de una muestra que comprende:

- 20 (a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo peptídico de acuerdo con la invención;
- (b) poner en contacto dicha muestra con dicho soporte sólido en condiciones que permitan la unión de una proteína priónica patógena, si está presente en dicha muestra, con dicho primer reactivo peptídico, para formar un primer complejo y
- (c) retirar materiales de muestra no unidos.
- 25 En una realización adicional, dicha proteína priónica patógena puede disociarse de dicho primer complejo. Esta disociación puede conseguirse por técnicas que se conocen bien en el campo de la purificación de proteínas.

La invención también proporciona un procedimiento para eliminar proteínas priónicas patógenas de una muestra que comprende:

- (a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo peptídico de acuerdo con la invención;
- 30 (b) poner en contacto dicho soporte sólido con una muestra sospechosa de contener proteínas priónicas patógenas en condiciones que permitan la unión de las proteínas priónicas patógenas, si están presentes, con el reactivo peptídico;
- (c) recuperar los materiales de muestra no unidos.

C. Composiciones

- 35 La invención se refiere además a composiciones que comprenden los reactivos peptídicos y/o anticuerpos descritos en el presente documento (y polinucleótidos que codifican estos reactivos peptídicos y/o anticuerpos). Estas composiciones pueden usarse en composiciones terapéuticas y profilácticas para el tratamiento o prevención de enfermedades relacionadas con priones. Además, los anticuerpos, reactivos peptídicos (y polinucleótidos que codifican estos anticuerpos y/o reactivos peptídicos) también pueden usarse en composiciones, de forma individual o
- 40 en combinación, para fines profilácticos (es decir, para prevenir patogénesis) o terapéuticos (para tratar enfermedad después de infección).

- El mecanismo preciso por el que las composiciones descritas en el presente documento actúan para tratar o prevenir enfermedad no es crítico. Sin quedar ligado a una teoría, las composiciones descritas en el presente documento pueden actuar para tratar o prevenir enfermedades de conformación por uno o más de los siguientes
- 45 mecanismos: inducción de una respuesta inmune en el sujeto que después trata o previene la patología; interacción (por ejemplo, unión) con formas no patógenas que pueden prevenir la conversión a formas no patógenas; unión con formas patógenas que puede prevenir consecuencias patógenas; y/o unión a formas patógenas que puede prevenir que las formas patógenas conviertan formas no patógenas adicionales a formas de enfermedad. (Véase, por ejemplo, Peretz y col. (2001) Nature 412: 739-743 que ensaya la capacidad de ciertos Fab para inhibir la
- 50 propagación de priones)

Las composiciones pueden comprender mezclas de uno o más de los reactivos peptídicos, anticuerpos y/o polinucleótidos. Estas moléculas pueden obtenerse a partir de una diversidad de fuentes, por ejemplo, proteína producida de forma recombinante, proteínas producidas de forma sintética, etc. Las composiciones también pueden administrarse junto con otras moléculas, por ejemplo, antígenos y agentes inmunorreguladores tales como

5 inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas, incluyendo pero sin limitación IL-2, IL-2 modificada (cys125-ser125), GM-CSF, IL-12, interferón alfa o gamma, IP-10, MIP1 y RANTES. Las composiciones pueden administrarse como polipéptidos o, como alternativa, como ácido nucleico desnudo (por ejemplo, ADN), usando vectores virales (por ejemplo, vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, vectores alfavirales) o vectores no virales (por ejemplo, liposomas, partículas revestidas con ácido nucleico o proteína).

10 Las composiciones también pueden comprender una mezcla de reactivo peptídico y ácido nucleico, que a su vez pueden suministrarse usando las mismas o diferentes modalidades y/o vehículos. Las mismas o diferentes composiciones pueden proporcionarse más de una vez (por ejemplo, una administración de "sensibilización" seguida de uno o más "refuerzos") para conseguir los efectos deseados. La misma composición puede administrarse como la sensibilización y como el o los refuerzos. Como alternativa, pueden usarse diferentes composiciones para

15 sensibilización y refuerzo.

Las composiciones de la invención son preferentemente farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente aceptables. Particularmente, las composiciones son preferentemente no indeseables biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo en una formulación o composición sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera deletérea con cualquiera de los componentes de la composición

20 en la que está contenida.

Las composiciones como se describen en el presente documento típicamente comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas (reactivos peptídicos) o secuencias de nucleótidos que las codifican, anticuerpos dirigidos a estas moléculas y cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según se necesite. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que inducirá una respuesta protectora y/o

25 terapéutica en el sujeto no infectado, infectado o no expuesto al que se administra. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" quedará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo del sujeto que se trate; la edad y condición general del individuo que se trate; la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos; el grado de protección deseado; la gravedad de la afección que se trate; la composición particular seleccionada y su modo de administración, entre

30 otros factores.

En ciertas realizaciones, los reactivos peptídicos son inmunogénicos y debe administrarse una composición inmunogénica que comprenda un reactivo peptídico como se describe en el presente documento, un anticuerpo específico para priones patógenos, y/o polinucleótidos que codifican estos reactivos patógenos o anticuerpos a un animal. Las composiciones inmunogénicas usadas en la invención preferentemente comprenden una cantidad

35 inmunológicamente eficaz de estos componentes. Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad suficiente para permitir que el mamífero induzca una respuesta inmune a una proteína priónica, preferentemente un prión patógeno. La respuesta inmune generalmente da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune secretora, celular y/o mediada por anticuerpos. Habitualmente, dicha respuesta incluye pero sin limitación uno o más de los siguientes efectos; la producción de anticuerpos de cualquiera de las clases inmunológicas, tales

40 como inmunoglobulinas A, D, E, G o M; la proliferación de linfocitos B y T; la provisión de señales activación, crecimiento y diferenciación a células inmunológicas; expansión de linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos. La cantidad de anticuerpos producidos variará dependiendo de varios factores incluyendo el animal usado, la presencia de un adyuvante, etc.

Las composiciones de la invención pueden comprender además uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen uno o más de los siguientes:

45 para su uso en la invención incluyen uno o más de los siguientes:

- Enterotoxina lábil por calor de *E. Coli* ("LT"), o mutantes detoxificados de la misma, tales como los mutantes K63 o R72;
- toxina del cólera ("CT"), o mutantes detoxificados de la misma;
- Micropartículas (es decir, una partícula de 100 nm a aproximadamente 150 μ m de diámetro, más

50 preferentemente de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 30 μ m de diámetro, y más preferentemente de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhidrido, una policaprolactona, etc.);

- Un polioxietilen éter o un polioxietilen éster (véase solicitud de patente Internacional WO 99/52549);

55 - un tensioactivo de polioxietilen sorbitán éster en combinación con un octoxinol (véase solicitud de patente Internacional WO 01/21207) o un tensioactivo de polioxietilen alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (véase solicitud de patente Internacional WO

01/21152);

- quitosano (por ejemplo, solicitud de patente Internacional WO 99/27960)
- un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) y una saponina (véase solicitud de patente Internacional WO 00/62800)
- 5 - ARN bicatenario inmunoestimulador
- compuestos de aluminio (por ejemplo hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, oxihidróxido, ortofosfato, sulfato, etc. (por ejemplo véanse capítulos 8 y 9 de *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) (en lo sucesivo en el presente documento "*Vaccine design*"), o mezclas de diferentes compuestos de aluminio, tomando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.) y prefiriéndose adsorción;
- 10 - MF59 (Escualeno 5%, Tween 80 0,5% y Span 85 0,5%, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidificador) (véase, Capítulo 10 de *Vaccine design*; véase también solicitud de patente Internacional WO 90/14837);
- liposomas (véase Capítulos 13 y 14 de *Vaccine design*);
- 15 - ISCOM (véase Capítulo 23 de *Vaccine design*);
- SAF, que contiene Escualeno 10%, Tween 80 0,4%, polímero en bloque de pluronic L121 5% y thr-MDP, fluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtex para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula (véase Capítulo 12 de *Vaccine design*);
- Sistema adyuvante Ribi[™] (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene Escualeno 2%, Tween 80 0,2% y uno o más componentes de pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox[™]);
- 20 - adyuvantes de saponina, tales como QuilA o QS21 (véase Capítulo 22 de *Vaccine design*), también conocido como Stimulon[™].
- ISCOM, que pueden estar desprovistos de detergente adicional (solicitud de patente Internacional WO 00/07621);
- 25 - adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA);
- citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de necrosis tumoral, etc. (véase Capítulos 27 y 28 de *Vaccine design*);
- 30 - monofosforil lípido A (MPL) o MPL 3-O-desacilado (3dMPL) (por ejemplo capítulo 21 de *Vaccine design*);
- combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (solicitudes de patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231);
- oligonucleótidos que comprenden motivos CpG (véase Krieg (2000) *Vaccine*, 19: 618 - 622; Krieg (2001) *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001, 3: 15 - 24; documentos WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 y WO 98/52581, etc.), es decir que contienen al menos un dinucleótido CG.
- 35 - un polioxietilen éter o un polioxietilen éster (solicitud de patente Internacional WO 99/52549);
- un tensioactivo de polioxietilen sorbitán éster en combinación con un octoxinol (solicitud de patente Internacional WO 01/21207) o un tensioactivo de polioxietilen alquil éter o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (solicitud de patente Internacional WO 01/21152);
- 40 - un oligonucleótido inmunoestimulador (por ejemplo un oligonucleótido CpG) y una saponina (solicitud de patente Internacional WO 00/62800);
- un inmunoestimulador y una partícula de sal metálica (solicitud de patente Internacional WO 00/23105);
- una saponina y una emulsión de aceite en agua (solicitud de patente Internacional WO 99/11241); y
- una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) (solicitud de patente Internacional WO 98/57659).
- 45

Los péptidos de muramilo incluyen, pero sin limitación, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-

sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

También están disponibles otros adyuvantes adecuados para administración mucosa o parental (por ejemplo, véase capítulo 7 de *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)).

- 5 Los mutantes de LT son adyuvantes preferidos (por ejemplo, adyuvantes de mucosa), en particular los mutantes "K63" y "R72" (por ejemplo, véase solicitud de patente Internacional WO 98/18928), ya que estos dan como resultado una respuesta inmune potenciada.

10 También son útiles micropartículas y derivan preferentemente de un poli(α -hidroxi-ácido), en particular, de una poli(lactida) ("PLA"), un copolímero de D,L-lactida y glicolida o ácido glicólico, tales como una poli(D,L-lactida-co-glicolida) ("PLG" o "PLGA") o un copolímero de D,L-lactida y caprolactona. Las micropartículas pueden derivar de cualquiera de diversos materiales de partida poliméricos que tienen una diversidad de pesos moleculares y, en el caso de los copolímeros tales como PLG, una diversidad de relaciones de lactida:glicolida, la selección de las cuales será en gran medida un asunto de elección. Los priones, anticuerpos, y/o polinucleótidos de la invención pueden inmovilizarse dentro de las micropartículas, o pueden adsorberse en ellas. Se prefiere inmovilización dentro de micropartículas de PLG. Se analizan micropartículas de PLG en más detalle en Morris y col., (1994), *Vaccine*, 12: 5 - 11, en el capítulo 13 de *Mucosal Vaccines*, eds. Kiyono y col., Academic Press 1996 (ISBN 012410587), y en los capítulos 16 y 18 de *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell y Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).

20 Los mutantes de LT pueden usarse provechosamente en combinación con antígeno inmovilizado en micropartículas, dando como resultado respuestas inmunes potenciadas significativamente.

Son adyuvantes preferidos para su uso parenteral compuestos de aluminio y MF59.

25 Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas para efecto adyuvante potenciado, como se ha analizado anteriormente.

30 También pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables en composiciones de la invención, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Son sustratos proteicos especialmente útiles, albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide del tétanos y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la materia.

35 Las composiciones de la invención también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, glicerol, dextrosa, etanol o similares, individualmente o en combinación, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes o agentes tamponantes de pH. Está presente opcionalmente un vehículo que es una molécula que no induce por sí misma la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos (tales como gotas de aceite o liposomas) y partículas de virus inactivos. Tales vehículos se conocen bien por los expertos habituales en la materia. Además, pueden conjugarse uno o más polipéptidos en la composición con un toxoide bacteriano, tal como toxoide de difteria, tétanos, cólera, etc.

D. Administración

45 Las composiciones de la invención pueden administrarse en una dosis única, o como parte de un régimen de administración. Pueden administrarse ácidos nucleicos y/o péptidos por cualquier modalidad adecuada, incluyendo, pero sin limitación, por vía intramuscular, vía intramucosa, vía subcutánea, vía intradérmica, vía transdérmica, vía intravaginal, vía intrarrectal, vía oral y/o vía intravenosa. El régimen de dosificación puede incluir dosis de sensibilización y refuerzo, que pueden administrarse por vía mucosa, vía parenteral o diversas combinaciones de las mismas.

50 En ciertas realizaciones, se administran uno o más componentes de las composiciones por vía parenteral o por vía mucosa. Las vías adecuadas de administración parenteral incluyen vías intramuscular (IM), subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, transcutánea y transdérmica (véase por ejemplo, solicitud de patente Internacional WO 98/20734), así como suministro al espacio intersticial de un tejido. Las vías adecuadas de administración mucosa incluyen vías oral, intranasal, intragástrica, pulmonar, intestinal, rectal, ocular y vaginal. La composición puede adaptarse para administración mucosa. Por ejemplo, cuando la composición es para administración oral, esta puede estar en forma de comprimidos o cápsulas, opcionalmente revestidas de forma entérica, líquidos, plantas transgénicas, etc. Cuando la composición es para administración intranasal, esta puede estar en forma de una pulverización nasal, gotas nasales, gel o polvo. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Las composiciones (o componentes de las mismas) también pueden estar encapsuladas, adsorbidas en, o asociadas con, vehículos en partículas. Tales vehículos presentan múltiples copias de un antígeno seleccionado al sistema inmune y promueven la inmovilización y retención de antígenos en ganglios linfáticos locales. Las partículas pueden fagocitarse por macrófagos y pueden potenciar la presentación de antígenos a través de liberación de citocinas. Los ejemplos de vehículos en partículas incluyen los derivados de polímeros de polimetil metacrilato, así como micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidas como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffery y col., Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee JP, y col., J Microencapsul. 14(2): 197-210, 1997; O'Hagan DT, y col., Vaccine 11(2): 149-54, 1993. También pueden fabricarse micropartículas adecuadas en presencia de detergentes cargados, tales como detergentes aniónicos o catiónicos, para producir micropartículas con una superficie que tenga una carga neta negativa o neta positiva. Por ejemplo, las micropartículas fabricadas con detergentes aniónicos, tales como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), es decir, micropartículas de CTAB-PLG, adsorben macromoléculas cargadas de forma negativa, tales como ADN. (Véase, por ejemplo, Solicitud Internacional N° PCT/U599/17308).

Además, pueden usarse otros sistemas de partículas y polímeros para el suministro *in vivo* o *ex vivo*. Por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas, son útiles para transferir un ácido nucleico de interés. De forma similar, la transfección mediada por DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico o precipitación usando otras sales inorgánicas insolubles, tales como fosfato de estroncio, silicatos de aluminio, incluyendo bentonita y caolín, óxido crómico, silicato de magnesio, talco y similares, encontrarán uso con los presentes procedimientos. Véase, por ejemplo, Felgner, P.L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5: 163-187, para una revisión de sistemas de suministro útiles para transferencia génica. También pueden usarse peptoides (Zuckerman, R.N., y col., Patente de Estados Unidos N° 5.831.005, presentada el 3 de noviembre de 1998) para suministro de una construcción de la presente invención.

Como se ha observado anteriormente, también pueden suministrarse péptidos (o anticuerpos) como ácidos nucleicos que codifican estas moléculas. La secuencia deseada se inserta en un vector unicistrónico o multicistrónico que contiene elementos de control seleccionados (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.). Una vez completas, las construcciones pueden suministrarse usando protocolos de suministro génico convencionales incluyendo, por ejemplo, inyección usando una jeringa convencional (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466), o una pistola génica, tal como el sistema de suministro génico Accell® (PowderJect Technologies, Inc., Oxford, Inglaterra); usando sistemas basados en virus tales como sistemas retrovirales como se describen en (Patente de Estados Unidos N° 5.219.740), sistemas adenovirales (Barr y col., Gene Therapy (1994) 1: 51-58; Berkner, K.L. BioTechniques (1988) 6: 616-629; y Rich y col., Human Gene Therapy (1993) 4: 461-476), sistemas de virus adenoasociados (AAV) (Patentes de Estados Unidos N° 5.173.414 y 5.139.941), sistemas de virus de viruela, sistemas de suministro de virus vaccinia (véase, por ejemplo, Publicación Internacional N° WO 94/26911), sistemas de avipoxvirus, tales como los virus de viruela aviar y viruela de los canarios, sistemas de suministro de virus alfa (Patentes de Estados Unidos N° 5.843.723; 5.789.245; 6.342.372; 6.329.201) así como otros sistemas virales; sistemas no virales tales como liposomas cargados o no cargados (véase, por ejemplo, Hug y Sleight, Biochim. Biophys. Acta. (1991) 1097: 1-17; Straubinger y col., en Methods of Enzymology (1983), Vol. 101, pág. 512-527; Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84: 7413-7416); y/o composiciones lipídicas cocleadas similares a las descritas por Papahadjopoulos y col., Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394: 483-491. Véase, también, Patentes de Estados Unidos N° 4.663.161 y 4.871.488. Pueden suministrarse polinucleótidos directamente al sujeto vertebrado o, como alternativa, suministrarse *ex vivo*, a células derivadas del sujeto y reimplantarse las células en el sujeto.

Los procedimientos de la invención pueden usarse además para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con priones administrando a un animal una composición que comprende una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención.

Los procedimientos de tratamiento pueden combinar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo composiciones que contienen péptidos y/o composiciones de anticuerpos. Los diversos componentes pueden administrarse por separado o juntos.

Los animales adecuados para la invención incluyen seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja, tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos, animales domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, salvajes y caza, tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos y similares. Los animales adecuados para su uso en la invención pueden ser de cualquier edad, incluyendo tanto adultos como neonatos. También pueden usarse animales transgénicos en la invención. Véase, en general, Prusiner "Prions" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95: 13363-13383 para un análisis de animales transgénicos usados en la actualidad para estudiar enfermedades relacionadas con priones.

Las composiciones de la invención pueden usarse para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con priones. Tales enfermedades relacionadas con priones incluyen una enfermedad provocada totalmente o en parte por una proteína priónica patógena (PrP^{Sc}). Las enfermedades relacionadas con priones incluyen tembladera, encefalopatías espongiformes bovinas (BSE), enfermedad de las vacas locas, encefalopatías espongiformes felinas, kuru,

Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker (GSS) e insomnio familiar letal (FFI).

Ejemplos

5 A continuación hay ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solamente para fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Se han realizado intentos de asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, debería tenerse en cuenta cierto error y desviación experimental.

Ejemplo 1: Producción de reactivos peptídicos

10 Se sintetizaron químicamente fragmentos peptídicos de proteínas priónicas usando técnicas de síntesis peptídica convencionales, esencialmente como se describe en Merrifield (1969) Advan. Enzymol. 32: 221 y Holm y Medal (1989), Multiple column peptide synthesis, p. 208E, Bayer y G. Jung (ed.), Peptides 1988, Walter de Gruyter & Co. Berlin-N.Y. Se purificaron péptidos por HPLC y la secuencia se verificó por espectroscopía de masas.

15 En ciertos casos, los péptidos sintetizados incluyeron restos adicionales en el extremo N o C terminal, por ejemplo restos GGG y/o incluyeron una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con secuencias de tipo silvestre.

A. Sustituciones de peptoides

20 También se realizaron sustituciones de peptoides en el péptido presentado en SEC ID N°: 14 (QWNKPSKPKTN, correspondiente a los restos 97 a 107 de SEC ID N°: 2), SEC ID N°: 67 (KKRPKPGGWNTGG, correspondiente a los restos 23-36 de SEC ID N°: 2) y SEC ID N°: 68 (KKRPKPGG, correspondiente a los restos 23-30 de SEC ID N°: 2). En particular, uno o más restos de prolina de estos péptidos se sustituyeron con diversos peptoides N-sustituidos. Véase, Fig. 3 para peptoides que pueden sustituir cualquier prolina. Se prepararon y sintetizaron peptoides como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.877.278 y 6.033.631; Simon y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367.

25 B. Multimerización

También se prepararon ciertos reactivos peptídicos como multímeros, por ejemplo preparando repeticiones en tándem (uniendo múltiples copias de un péptido mediante engarces tales como GGG), múltiples péptidos antígenicos (MAPS) y/o péptidos unidos linealmente.

30 En particular, se prepararon MAPS usando técnicas convencionales, esencialmente como se describe en Wu y col. (2001) J Am Chem Soc. 2001 123(28): 6778-84; Spetzler y col. (1995) Int J Pept Protein Res. 45(1): 78-85.

35 También se prepararon péptidos lineales y ramificados (por ejemplo, multimerización de engarce de PEG) usando engarces de polietilenglicol (PEG), usando técnicas convencionales. En particular, se crearon armazones de PEG muiteptídicos ramificados con las siguientes estructuras: Biotina-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys (sin péptido control) y Biotina-PEG-Lys(Péptido)-PEG-Lys(Péptido)-PEG-Lys(Péptido)-PEG-Lys(Péptido)-PEG-Lys(Péptido). Además, se prepararon enlaces de péptido con Lys: Lys-épsilon-NH-CO-(CH₂)₃-Mal-S-Cys-péptido. Véase, Fig. 5.

C. Biotinilación

Los péptidos se biotinilaron usando técnicas convencionales después de síntesis y purificación. Se añadió biotina al extremo N o C terminal del péptido.

40 Ejemplo 2: Ensayos de unión

A. Extracción

45 Se ensayaron reactivos peptídicos como se describe en el presente documento con respecto a su capacidad para unirse específicamente a proteínas priónicas usando un ensayo de extracción de perlas magnéticas. Para este ensayo, los reactivos peptídicos se marcaron con biotina, lo que permitió la unión con perlas magnéticas revestidas con estreptavidina.

50 Se prepararon homogeneizados de cerebro a partir de ratones Balb-c RML PrP^{Sc+} y PrP^{C+}. Brevemente, se añadieron 5 ml de tampón TBS (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 37,5 mM) con TW20 1% y Triton 100 1% a cerebros que pesaban ~0,5 g para producir un homogeneizado al 10%. La suspensión cerebral se homogeneizó con dounce hasta que habían desaparecido las partículas grandes. Se diluyeron alícuotas de 200 µl 1:1 en tampón y se añadieron a tubos eppendorf previamente enfriados y las muestras se sonicaron durante varias repeticiones de varios segundos cada una. Las muestras se centrifugaron durante 10-15 minutos a 500x y se retiraron los

sobrenadantes.

Para ensayar el efecto de la digestión con Proteinasa K, ciertos sobrenadantes se dividieron en dos muestras y se añadieron 4 µl de Proteinasa K a una muestra y se rotó a 37 °C durante 1 hora. Se añadieron ocho microlitros de PMSF a los tubos de Proteinasa K para detener la digestión y los tubos se incubaron durante un mínimo de 1 hora a 4 °C.

Los homogeneizados se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior y se sonicaron de nuevo como se ha descrito anteriormente si fue necesario. Se incubó una preparación de PrP^{Ct} o PrP^{Sc} del 10% p/v de los homogeneizados de cerebro durante una noche a 4 °C con un reactivo peptídico marcado con biotina, como sigue. Se prepararon tubos que contenían 400 µl de tampón, 50 µl de extracto y 5 µl de reactivo peptídico marcado con biotina (reserva de 10 mM). Los tubos se incubaron durante un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente o durante noche a 4 °C en una plataforma de balanceo.

Después de la incubación, se añadieron 50 µl de perlas SA (Streptavidina Dynal M280 112.06) y los tubos se mezclaron mediante agitación con vórtex. Los tubos se incubaron, con balanceo (VWR, plataforma de Balanceo, Modelo 100), durante 1 hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C.

Las muestras se retiraron del agitador, se colocaron en un campo magnético para recoger las perlas magnéticas con reactivo peptídico unido y príon y se lavaron 5-6 veces usando 1 ml de tampón de ensayo. Las muestras se usaron inmediatamente o se almacenaron a -20 °C hasta la transferencia de Western o ELISA, descritos posteriormente.

B. Transferencia de Western

Se realizó análisis de transferencia de Western como sigue. Se desnaturalizaron complejos de perla-peptido-príon precipitados como se ha descrito anteriormente después del lavado final añadiendo 25-30 µl de tampón SDS (Tampón de Muestra-Tris-Glicina SDS de Novex) 2X a cada tubo. Los tubos se mezclaron por agitación en vórtex hasta que todas las perlas se suspendieron. Los tubos se hirvieron hasta que las partes superiores empezaron a abrirse, se procesaron en un gel de SDS-PAGE convencional y se transfirieron a una membrana sólida para análisis de WB.

La membrana se bloqueó durante 30 minutos en Leche/TBS-T 5% [50 ml de Tris 1 M pH 7,5; 37,5 ml de NaCl 4 M, 1-10 ml de Tween, llevan el volumen a 1 l con leche] a temperatura ambiente. Se añadieron entre 10-15 ml de anticuerpos policlonales anti-priónicos, como se describe en la Solicitud Internacional N° PCT/US03/31057, presentada el 30 de septiembre de 2003, titulada "Prion Chimeras and Uses Thereof" a una dilución 1:50 veces a la membrana y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó múltiples veces en TBS-T. Después de lavar, el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG de conejo (H+L) de cabra (Pierce) conjugado con fosfatasa alcalina (AP) se añadió a dilución 1:1000 (en TBS-T) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó múltiples veces en TBS-T. Se añadió reactivo precipitador de fosfatasa alcalina (NBT/BCIP de 1 etapa (Pierce)) y se desarrolló hasta que apareció fondo o resultó evidente la señal.

C. ELISA

Después del lavado final, los complejos de perla-peptido descritos anteriormente se desnaturalizaron con tiocianato de Guanidina y se realizaron ELISA en la proteína desnaturalizada como se ha descrito previamente en Ryou y col. (2003) Lab Invest. 83 (6): 837-43. Los valores de D.O por encima de los controles blancos (que variaban de 0,172-0,259) se consideraron positivos.

D. Resultados

Los resultados de transferencia de Western y ensayos de unión de ELISA se resumen en la Tabla 2. Brevemente, no fue necesaria digestión con proteinasa K de homogeneizados de cerebro para detectar unión específica de los reactivos peptídicos como se describe en el presente documento que se unen a PrP^{Sc}. Como se muestra en la Fig. 4, en ningún caso se observó unión con homogeneizados de cerebro de tipo silvestre, lo que indica que los reactivos peptídicos se unieron a PrP^{Sc} específicamente. Además, el análisis de transferencia de Western descrito anteriormente detectó PrP^{Sc} a una dilución de más de cuatro log mientras que el ELISA fue al menos 10X más sensible que la transferencia de Western.

Tabla 2

Reactivo peptídico (marcado con biotina en el extremo N o C terminal)	Sec Id:	Transferencia de Western ¹	ELISA A _{405nm}
³ CGG ⁵ WGQGGGTHNQWNKPSKPKT NLKHV ³ C	35	+	0,687

(continuación)

Reactivo peptídico (marcado con biotina en el extremo N o C terminal)	Sec Id:	Transferencia de Western1	ELISA A405nm
³ GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLK V	36	+	ND
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNL KHV ³	37	+	ND
C ³ GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN LKHV ³ C	40	+	ND
RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁴	44	-	ND
⁴ RPMIHFGNDWEDRYRENMYR5C	76	-	ND
³ C ⁴ RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁴ C ²	46	+	ND
QWNKPSKPKTN ⁴	50	+	0,932
QWNKPSKPKTN	14	+++	0,775
QWNKPSKPKTN ⁴ QWNKPSKPKTN	51	+++	0,923
QWNKPSKPKTNLKHV ⁴	77	++	0,839
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53	+	0,254
GGTHNQWNKPSKPKTN	54	+	0,253
⁴ AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78	insoluble	0,259
⁴ AGAAAAGAVVGGLGG	56	insoluble	0,313
⁶ AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57	+	0,901
⁶ AGAAAAGAVVGGLGG	65	++	0,635
⁴ KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS	66	+	0,533
⁴ KKRPKPGGWNTGG	67	++	0,451
⁴ KKRPKPGG	68	+++	0,765
PHGGGWGQPHGGSWGQPHGGSWG Q	69	-	0,282
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70	-	0,241
PHGGGWGQ	71	-	0,263
⁴ GPKRKGP	73	+	1,0621
⁴ WNKPSKPKT	75	-	0,247
⁴ NKPSKPK	79	-	0,24
⁴ KPSKPK	80	-	0,225
⁴ KKRPKPGGKKRPKPGG	72	+	0,522
⁴ KKRPKPGGQWNKPSKPKTN	81	+	1,247

(continuación)

Reactivo peptídico (marcado con biotina en el extremo N o C terminal)	Sec Id:	Transferencia de Western1	ELISA A405nm
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AMDDD	82	-	0,340
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AM	83	-	0,237
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AMKKK	84	+	0,268
⁴ KKKKKKKK	85	+ ³	0,530
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AMDDD	86	-	0,227
⁴ NNKQSPWPTKK	87	-	0,227
DKDKGGVGALAGAAVAAGGDKDK	88	-	0,282
⁴ QANKPSKPKTN	89	+	0,245
⁴ QWNKASKPKTN	90	-	0,283
⁴ QWNKPSKAKTN	91	-	0,256
⁴ QWNAPSKPKTN	92	-	0,230
⁴ QWNKPSAPKTN	93	-	0,250
⁴ QWNKPSKPATN	94	-	0,260
⁴ QWNKASKAKTN	95	-	0,241
⁴ KKRAKPGG	96	+	2,19
⁴ KKRPKAGG	97	+	1,24
⁴ KKRAKAGG	98	+	1,46
1: Intensidad de señal relativa evaluada visualmente. 2: Ciclado. 3: Restos GGGG añadidos/insertados en la posición indicada. 4: Restos GGG añadidos/insertados en la posición indicada. 5: Restos GG añadidos/insertados en la posición indicada. 6: Restos KKK añadidos/insertados en la posición indicada. ND = no determinado. También se realizó exploración de alanina para identificar restos implicados en unión. Los resultados se muestran en la Tabla 3.			

Tabla 3

Reactivo peptídico (marcado con biotina en el extremo N o C terminal)	SEC ID N°:	Transferencia de Western	ELISA A405nm
QWNKPSKPKTN	14	+++	0,775
QANKPSKPKTN	89	+++	0,245
QWNAPSKPKTN	92	+	0,283

(continuación)

Reactivo peptídico (marcado con biotina en el extremo N o C terminal)	SEC ID N°:	Transferencia de Western	ELISA A405nm
QWNKPSAPKTN	93	+	0,256
QWNKPSKPATN	94	+	0,230
QWNKASKPKTN	99	+/-	0,250
QWNKPSKAKTN	91	+	0,260
QWNKASKAKTN	95	-	0,241
QWAKPSKPKTN	100	ND	0,376
QWNKPAKPKTN	101	ND	0,356
QWNKPSKPKAN	102	ND	0,234
QWNKPSKPKTA	103	ND	0,262
KKRPKPGG	68	+++	0,765
AKRPKPGG	104	+	0,273
KARPKPGG	105	+	0,256
KKAPKPGG	106	+	0,268
KKRPAPGG	107	+	0,578
KKRAKPGG	96	++	2,19
KKRPKAGG	97	++	1,24
KKAPKAGG	108	+	1,46

Además, como se muestra en la Tabla 4, la unión a PrP^{Sc} por los reactivos peptídicos que tienen SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 67 y SEC ID N°: 68 se potenció adicionalmente por sustituciones en los restos de prolina por varias glicinas N-sustituidas (peptoides).

5

Tabla 4

	Transferencia de Western	ELISA A405nm
* en (GGG) ¹QWNKPSK*KTN (SEC ID N°: 14)		
Prolina	+++	0,775
N-(S)-(1-feniletil)glicina (peptóide rodeado en la FIG. 3A) (SEC ID N°: 109)	++	0,865
N-(4-hidroxifenil)glicina (peptóide rodeado en la FIG. 3B) (SEC ID N°: 110)	-	0,934
N-(ciclopropilmetil)glicina (peptóide rodeado en la FIG. 3C) (SEC ID N°: 111)	+++++	1,141
N-(isopropil)glicina (peptóide rodeado en la FIG. 3D) (SEC ID N°: 112)	ND	0,974
N-(3,5-dimetoxibencil)glicina (peptóide rodeado en la FIG. 3E) (SEC ID N°: 113)	+++	2,045
N-butilglicina (peptóide rodeado en la FIG. 3F) (SEC ID N°: 114)	++++	0,776
*en (GGG) ¹QWNK*SKPKTN (SEC ID N°: 14)		
N-(ciclopropilmetil)glicina (SEC ID N°: 115)	ND	0,498
N-(isopropil)glicina (SEC ID N°: 116)	ND	1,57

(continuación)

	Transferencia de Western	de ELISA A405nm
N-(3,5-dimetoxibencil)glicina (SEC ID N°: 117)	ND	0,823
N-butilglicina (SEC ID N°: 118)	ND	0,619
*en (GGG) ¹KKRPK*GG (SEC ID N°: 68)		
prolina	ND	0,765
N-butilglicina (SEC ID N°: 119)	ND	0,61
N-(3,5-dimetoxibencil)glicina (SEC ID N°: 120)	ND	0,631
N-(isopropil)glicina (SEC ID N°: 121)	ND	0,509
N-(ciclopropilmetil)glicina (SEC ID N°: 122)	ND	0,503
*en (GGG) ¹KKRPK*GGWNTGG (SEC ID N°: 67)		
Prolina	ND	0,451
N-butilglicina (SEC ID N°: 123)	ND	0,503
N-(3,5-dimetoxibencil)glicina (SEC ID N°: 124)	ND	0,464
N-(isopropil)glicina (SEC ID N°: 125)	ND	0,555
N-(ciclopropilmetil)glicina: (SEC ID N°: 126)	ND	0,344
(GGG) ¹QWNKX1SKX2KTN		
N-(ciclopropilmetil)glicina en X1; N-(ciclopropilmetil)glicina en X2 (SEC ID N°: 129)	ND	ND
N-(ciclopropilmetil)glicina en X1; N-(3,5-dimetoxibenzil)glicina en X2 (SEC ID N°: 130)	ND	ND
N-(ciclopropilmetil)glicina en X1; N-butilglicina en X2 (SEC ID N°: 131)	ND	ND
N-(isopropil)glicina en X1; N-(ciclopropilmetil)glicina en X2 (SEC ID N°: 132)	ND	ND
¹ El engarce GGG opcional no estaba presente en los reactivos peptídicos en los experimentos mostrados en la presente tabla.		

Además, la multimerización de reactivos peptídicos de unión a PrP^{Sc} también mejoró la afinidad por PrP^{Sc}. En particular, las repeticiones en tándem proporcionaron señales más fuertes (como se midió por transferencia de Western) que las copias únicas. Las formas MAP prederivatizadas en perlas aumentaron la unión en ciertos casos hasta 2 veces. Sin embargo, las formas MAP provocaron precipitación del péptido en solución. También se ensayaron péptidos unidos linealmente con respecto a su capacidad para potenciar la unión sin provocar precipitación

Ejemplo 3: Producción de anticuerpos

Lo siguiente proporciona un ejemplo de un protocolo que puede usarse para generar anticuerpos para los reactivos peptídicos de la invención.

Los ratones se inmunizan con una composición que comprende un reactivo peptídico como se describe en el presente documento (por ejemplo, una cualquiera de las SEC ID N°: 12-108, preferentemente una cualquiera de las SEC ID N°: 14, 35, 50, 51, 56, 57, 65, 66, 67, 68, 72, 73, 77, 81, 82) IM (intramuscular) o IP (intraperitoneal) el día 0,

5 seguido de 2 - 5 refuerzos a intervalos no más frecuentes de uno cada 2 semanas. Se recoge sangre antes de la primera inmunización y después 7 días después de cada refuerzo para supervisar la respuesta humoral al antígeno. Se toman 6 muestras de sangre oculares orbitales de cada animal (tres de cada ojo) de aproximadamente 0,2 ml o menos por extracción de sangre. El refuerzo final se suministra por inyección IV (intravenosa). Tres días después del reforzó final, los ratones se sacrifican por exposición a CO₂ o isoflurano seguido de dislocación. Después se recogen los bazos para producción de hibridomas.

Se usa adyuvante completo de Freund para la primera inyección seguido de adyuvante incompleto de Freund para las inyecciones restantes, excepto para la inyección IV. Las inyecciones IV se preparan en solución salina.

10 Aunque se han descrito realizaciones preferidas de la presente invención en cierto detalle, se entiende que pueden realizarse variaciones obvias sin alejarse del alcance de la invención como se define en el presente documento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un reactivo peptídico aislado que interacciona preferentemente con PrP^{Sc} en comparación con PrP^C, en el que dicho reactivo peptídico es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 12, 14-15, 22, 26-31, 33-37, 39-43, 45-48, 50-63, 65-69, 71-73, 77, 81-82, 84-85, 87-94, 96-101 y 103-132 o un análogo o derivado de los mismos, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
2. El reactivo peptídico de la reivindicación 1, en el que el reactivo peptídico contiene un motivo de hélice de poliprolina de tipo II.
- 10 3. El reactivo peptídico de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el reactivo peptídico contiene el motivo de secuencia PXXP, en el que P es una prolina o una glicina N sustituida y X es cualquier aminoácido.
4. El reactivo peptídico de la reivindicación 1, en el que dicho reactivo peptídico está codificado genéticamente.
- 15 5. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que el reactivo peptídico es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131, 132, 56, 57, 65, 82 y 84 o un análogo o derivado de los mismos, en los que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
- 20 6. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que el reactivo peptídico es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126 y 127 o un análogo o derivado de los mismos, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
- 25 7. El reactivo peptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el reactivo peptídico es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 128, 129, 130, 131 y 132 o un análogo o derivado de los mismos, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
- 30 8. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que el reactivo peptídico incluye la secuencia de aminoácidos (G)_n, en la que n=1, 2, 3 o 4, en el extremo N terminal y/o en el extremo C terminal.
- 35 9. El reactivo peptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7-8, en el que el reactivo peptídico es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 129, 130, 131 y 132 o un análogo o derivado de los mismos, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
- 40 10. El reactivo peptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 8, en el que el reactivo peptídico es un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen SEC ID N°: 56, 57, 65, 82 y 84 o un análogo o derivado de los mismos, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
11. El reactivo peptídico de la reivindicación 1, en el que dicho reactivo peptídico es de entre 3 y 100 restos de longitud y es un péptido que tiene la secuencia SEC ID N°: 68 o un análogo o derivado del mismo, en el que dicho derivado tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, y que incluye opcionalmente modificaciones después de la expresión del polipéptido.
12. El reactivo peptídico de la reivindicación 11, en el que el reactivo peptídico comprende un péptido o peptoide que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 66, 67, 72, 96-98, 104-108, 119-126.
- 45 13. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que uno o más restos se reemplaza con un análogo de aminoácido.
14. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que el reactivo peptídico comprende uno o más restos de glicina N sustituidos.
- 50 15. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que uno o más restos de prolina se sustituyen con restos de glicina N sustituidos.
16. El reactivo peptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 8-9 y 12, en el que el reactivo peptídico comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 119-122.

17. El reactivo peptídico de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho reactivo peptídico es:
- (a) de 6 a 10 restos de longitud;
 - (b) de 11 a 20 restos de longitud; o
 - (c) de 21 a 75 restos de longitud.
- 5 18. El reactivo peptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que el reactivo peptídico está biotinilado.
19. Un polinucleótido que codifica un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10.
- 10 20. Un complejo que comprende el reactivo peptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 y una proteína priónica patógena.
21. Un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:
- (a) poner en contacto una mezcla sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en condiciones que permitan la unión del primer reactivo peptídico con la proteína priónica patógena, si está presente, para formar un primer complejo; y
 - (b) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra por su unión con un reactivo peptídico.
- 15 22. Un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:
- (a) poner en contacto una mezcla sospechosa de contener un prión patógeno con un primer reactivo de unión a prión en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de unión a prión con la proteína priónica patógena, si está presente, para formar un primer complejo;
 - (b) que comprende opcionalmente una o ambas de las etapas de:
 - i) retirar materiales de muestra no unidos; y
 - ii) disociar dicho prión patógeno de dicho primer complejo;
 - (c) poner en contacto de ese primer complejo o prión patógeno disociado con un segundo reactivo de unión a prión en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de unión a prión con el prión patógeno, en el que dicho segundo reactivo de unión a prión comprende un marcador detectable; y
 - (d) detectar la presencia del prión patógeno, si lo hubiera, en la muestra por su unión con el segundo reactivo peptídico;
- 20 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el primer reactivo de unión a prión y/o el segundo reactivo de unión a prión son un anticuerpo antiprion, un polipéptido híbrido con motivo injertado, un polímero catiónico o aniónico, un catalizador de propagación, plasminógeno, o un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
- 25 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que el primer y segundo reactivos de unión a prión son un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
- 30 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho primer reactivo peptídico y dicho segundo reactivo peptídico son diferentes.
- 35 26. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho primer reactivo peptídico y dicho segundo reactivo peptídico son iguales.
27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, en el que dicho primer péptido está biotinilado.
- 40 28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en el que el primer reactivo de unión a prión se proporciona en un soporte sólido.
- 45 29. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en nitrocelulosa, látex de poliestireno, fluoruro de polivinilo, papel diazotizado, membranas de nailon, perlas activadas y perlas magnéticamente sensibles.
30. El procedimiento de la reivindicación 28 o reivindicación 29, que comprende las etapas de:
- (a) combinar el soporte sólido con un primer ligando marcado de forma detectable, en el que la afinidad de
- 50

- unión del primer reactivo peptídico con el primer ligando marcado de forma detectable es más débil que la afinidad de unión del primer reactivo peptídico con un prión patógeno;
- (b) combinar una muestra con el soporte sólido en condiciones que permitan que un prión patógeno, cuando está presente en la muestra, se una al primer reactivo peptídico y reemplace el primer ligando; y
- (c) detectar complejos formados entre el primer reactivo peptídico y el prión patógeno de la muestra.
31. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 30, en el que la muestra es una muestra biológica.
32. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que la muestra biológica está seleccionada del grupo que consiste en órganos, sangre completa, fracciones de sangre, componentes de sangre, plasma, plaquetas, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido cerebral, tejido del sistema nervioso, tejido muscular, médula ósea, orina, lágrimas, tejido de sistema no nervioso, órganos y/o biopsias o necropsias.
33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que la muestra biológica es sangre completa, plasma, plaquetas, fracciones de sangre o suero.
34. Un soporte sólido que comprende al menos un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
35. Un kit para detectar de la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:
- (a) un soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 34; y
- (b) otros reactivos necesarios, y,
- (c) opcionalmente, controles positivos y negativos.
36. Un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso como un medicamento.
37. El uso de un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedad priónica.
38. El uso de la reivindicación 37, en el que la enfermedad priónica es en un mamífero.
39. El uso de la reivindicación 38, en el que el mamífero es un ser humano.
40. Una composición que comprende un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
41. Una composición que comprende el polinucleótido de la reivindicación 19.
42. La composición de la reivindicación 40 o reivindicación 41, en el que la composición está adaptada para administrarse por vía intramuscular, intramucosa, intranasal, subcutánea, intradérmica, transdérmica, intravaginal, intrarrectal, oral o intravenosa.
43. El uso de un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune en un paciente que se ha tratado previamente con al menos un medicamento de la reivindicación 36, para el tratamiento o prevención de enfermedad priónica.
44. Un procedimiento para aislar una proteína priónica patógena de una muestra que comprende:
- (a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18;
- (b) poner en contacto dicha muestra con dicho soporte sólido en condiciones que permitan la unión de una proteína priónica patógena, si está presente en dicha muestra, con dicho primer reactivo peptídico, para formar un primer complejo; y
- (c) retirar materiales de muestra no unidos.
45. El procedimiento de la reivindicación 44, que comprende además la etapa de disociar dicha proteína priónica patógena de dicho primer complejo.
46. Un procedimiento para eliminar proteínas priónicas patógenas de una muestra que comprende:
- (a) proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo peptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18;
- (b) poner en contacto dicho soporte sólido con una muestra sospechosa de contener proteínas priónicas patógenas en condiciones que permitan la unión de las proteínas priónicas patógenas, si están presentes, con el reactivo peptídico; y
- (c) recuperar los materiales de muestra no unidos.

47. Un procedimiento para preparar suministro de sangre que esté sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo dicho suministro de sangre, sangre completa, plasma, plaquetas o suero, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 (a) explorar alícuotas de sangre completa, plasma, plaquetas o suero de muestras de sangre recogidas, por el procedimiento de la reivindicación 21;
- (b) eliminar muestras en las que se detecten priones patógenos, y
- (c) combinar muestras en las que no se detecten priones patógenos para proporcionar un suministro de sangre que esté sustancialmente sin priones patógenos.

48. Un procedimiento para preparar suministro de alimentos que esté sustancialmente sin priones patógenos, comprendiendo dicho procedimiento:

- 10 (a) explorar una muestra recogida de organismos vivos que entrarán en el suministro de alimentos o una muestra recogida de alimentos que se pretende que entren en el suministro de alimentos, por el procedimiento de la reivindicación 20;
- (b) eliminar muestras en las que se detecten priones patógenos; y
- 15 (c) combinar muestras en las que no se detecten priones patógenos para proporcionar un suministro de alimentos que esté sustancialmente sin priones patógenos.

FIGURA 1

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE PRIÓN

Secuencia de aminoácidos de una proteína priónica humana de longitud completa

SEC ID N° 1: MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWN
TGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGWGQPHGG
GWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNM
KHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRY
YRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTV
TTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQRG
SSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG

Secuencia de aminoácidos de una proteína priónica de ratón de longitud completa

SEC ID N° 2: MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGW
NTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGTWGQPHGGGWGQPHGGS
WGQPHGGSWGQPHGGGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKH
VAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRY
RENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVT
TTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDGR
RSSSTVLFSPPVILLISFLIFLIVG

FIGURA 2

Ser humano	--MANLGCWMLVLFVATWSDVGLCKKRPKPGG--WNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGW
Hámster	--MANLSYWLALLFVAMWTDVGLCKKRPKPGG--WNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGTW
Bovino	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGXPPGNRYPPQGGGGW
Oveja	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGW
Ratón	--MANLGYWLLALFVTMWTVDVGLCKKRPKPGG--WNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGG--TW
Alce	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGW
Gamo	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGW
Mulo	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGW
Blanco	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGW
	: : : . * : . * * : * : * : *
Ser humano	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGG--WGQGGGTHSQWNKPSKPKTN
Hámster	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGG--WGQGGGTHNQWNKPSKPKTN
Bovino	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGG--THGQWNKPSKPKTN
Oveja	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGWGQGG--SHSQWNKPSKPKTN
Ratón	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----SWGQPHGGG--WGQGGGTHNQWNKPSKPKTN
Alce	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
Gamo	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
Mulo	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
Blanco	GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
	* *
Ser humano	MKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMDE
Hámster	MKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYYRENMNRYPNQVYYRPVDQ
Bovino	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGXDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPVDQ
Oveja	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDR
Ratón	LKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQ
Alce	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQ
Gamo	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMNRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQ
Mulo	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQ
Blanco	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQ
	: * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * :
Ser humano	YSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQ-
Hámster	YNNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQKESQAYYDG
Bovino	YSNQNNFVHDCVNITVKEHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ
Oveja	YSNQNNFVHDCVNITVQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
Ratón	YSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDG
Alce	YNNQNTFVHDCVNITVQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEAYYQ-
Gamo	YNNQNTFVHDCVNITVQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEAYYQ-
Mulo	YNNQNTFVHDCVNITVQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
Blanco	YNNQNTFVHDCVNITVQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
	* *
Ser humano	-RGSSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 3)
Hámster	RRSS-AVLFSPPVILLISFLIFLMVG (SEC ID N° : 4)
Bovino	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 5)
Oveja	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 6)
Ratón	RRSSSTVLFSSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 7)
Alce	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 8)
Gamo	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 9)
Mulo	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 10)
Blanco	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEC ID N° : 11)

FIGURA 3

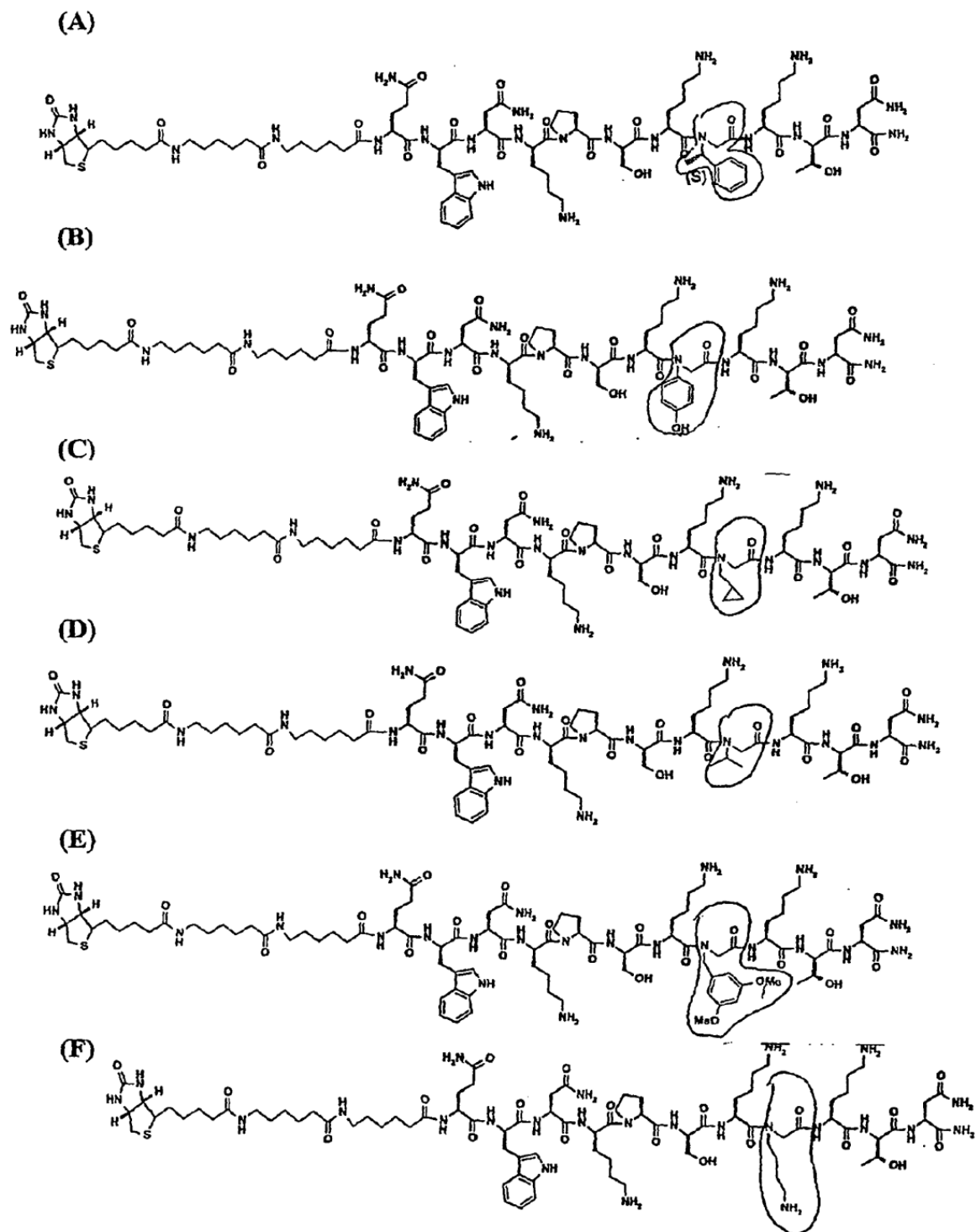


FIGURA 4: Especificidad de péptido para PrP^{Sc}
en plasma humano y cerebro de ratón

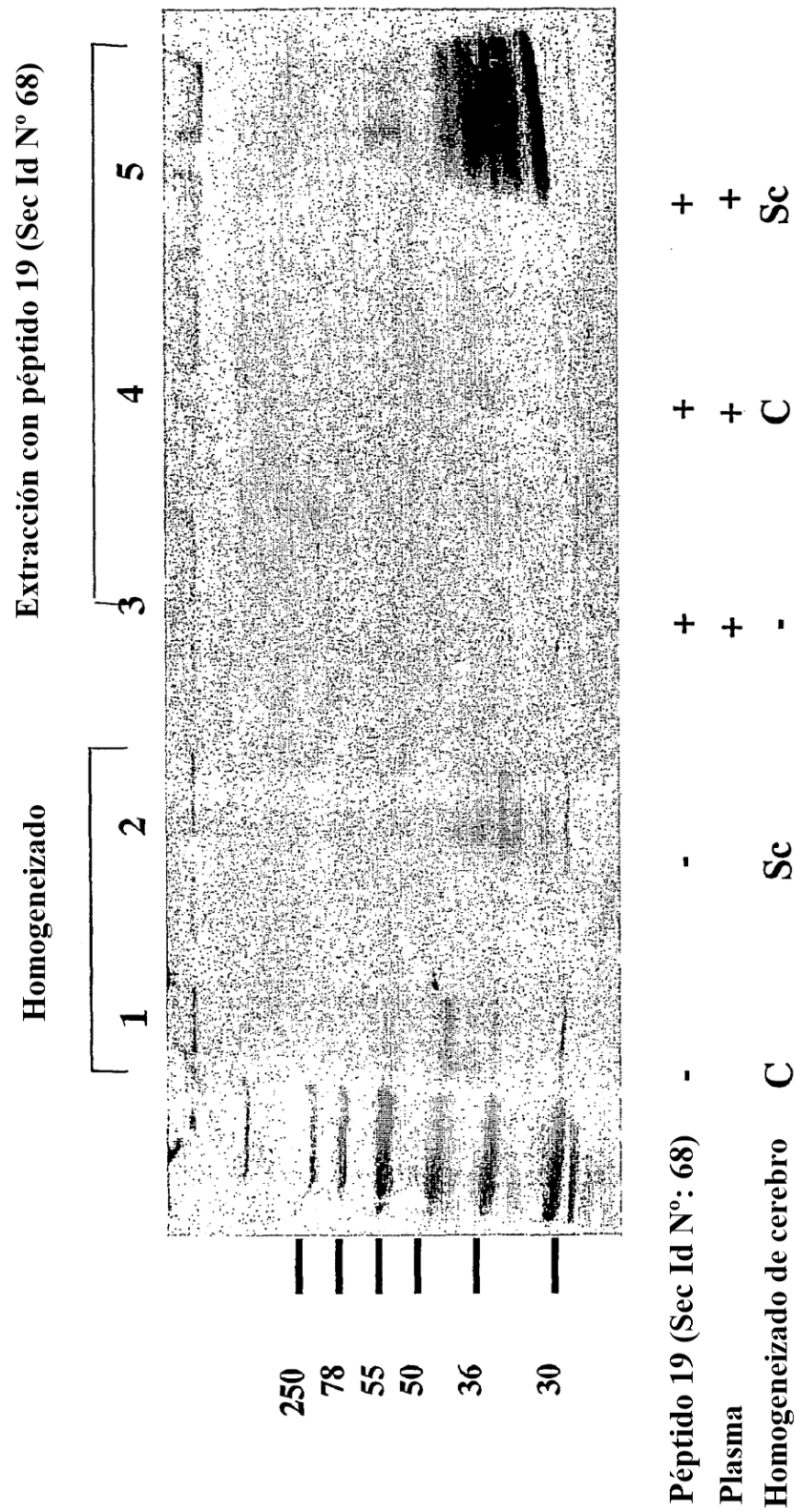


FIGURA 5

