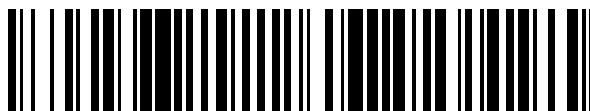


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 645**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2004** **E 04741839 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 1636592**

54 Título: **Uso de agentes moduladores de la conversión de priones**

30 Prioridad:

19.06.2003 EP 03101795

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2013

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:

**SOTO-JARA, CLAUDIO y
MAUNDRELL, KINSEY**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 401 645 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

Uso de agentes moduladores de la conversión de priones

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere al uso de la apolipoproteína B o apolipoproteína E o fragmentos o miméticos de la misma para el diagnóstico, la detección, el pronóstico y la identificación de moduladores de la replicación de la proteína priónica. Más específicamente, la invención proporciona el uso de moduladores de la apolipoproteína B o fragmentos de la misma para modular la replicación de la proteína priónica que está implicada en la patogénesis de encefalopatías espongiformes transmisibles y otras enfermedades priónicas.

Antecedentes de la invención

- 10 La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en seres humanos y la tembladera y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en animales son algunas de las enfermedades que pertenecen al grupo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), también conocidas como enfermedades priónicas (*Prusiner, 1991*). Estas enfermedades se caracterizan por un periodo de incubación extremadamente largo, seguido de una patología clínica breve e invariablemente fatal (*Roos y col., 1973*). Hasta la fecha no existe tratamiento.

- 15 Aunque estas enfermedades son relativamente raras en los seres humanos, el riesgo de transmisibilidad de la EEB a los seres humanos a través de la cadena alimentaria ha llamado la atención de las autoridades de salud pública y de la comunidad científica (*Soto y col., 2001*). La ECJ variante (ECJv) es una nueva enfermedad, descrita por primera vez en marzo de 1996 (*Will y col., 1996*). A diferencia de los casos típicos de ECJ esporádica (ECJe), esta forma variante afecta a pacientes jóvenes (edad media 27 años) y presenta un curso relativamente largo de la enfermedad (promedio de 14 meses frente a 4,5 meses en la ECJ tradicional). La primera hipótesis que se planteó fue que podía existir una
20 relación entre la ECJv y la EEB debido a la coincidencia de estas dos EET en espacio y tiempo (*Bruce, 2000*). Las evidencias más recientes y convincentes provienen de estudios que muestran que las características de transmisión de la EEB y la ECJv a ratones son siempre idénticas, indicando claramente que se deben al mismo agente causante (*Bruce y col., 1997*). Además, se ha demostrado ahora que los ratones transgénicos que portan un gen humano o bovino son susceptibles a la EEB y la ECJv (*Scott y col., 1999*). Tampoco se ha propuesto ninguna otra hipótesis plausible para la aparición de la ECJv, y la intensa vigilancia de la ECJ en cinco países europeos con una baja exposición al agente de la EEB no ha identificado casos adicionales. En conclusión, la causa más probable de la ECJv es la exposición al agente de la EEB, probablemente por contaminación de la dieta con tejido afectado del sistema nervioso central bovino.

- 30 La naturaleza del agente transmisible ha sido objeto de una apasionada controversia. Investigaciones adicionales han indicado que el agente de las EET difiere significativamente de los virus y otros agentes convencionales en que no parece contener ácidos nucleicos (*Prusiner, 1998*). Además, los procedimientos fisicoquímicos que inactivan la mayoría de los virus, como la alteración de ácidos nucleicos, han resultado ineficaces para reducir la infectividad del patógeno de las EET. Por el contrario, se ha descubierto que los procedimientos que degradan proteínas inactivan el patógeno (*Prusiner, 1991*). Por consiguiente, la teoría que propone que el agente transmisible no es un virus ni otro agente infeccioso previamente conocido, sino un agente no convencional formado únicamente por una proteína, cuenta recientemente con una amplia aceptación (*Prusiner, 1998*). Esta nueva clase de patógenos se denominó "prión", que es la abreviatura para "partícula proteica infecciosa" (proteinaceous infectious particle). En las EET los priones se componen principalmente de una proteína mal plegada denominada PrP^{Sc} (por "scrapie" PrP), que es una versión modificada después de la traducción de una proteína normal llamada PrP^C (*Cohen y col., 1998*). No se han detectado
40 diferencias químicas que distingan a estas dos isoformas de la PrP, y la conversión parece implicar un cambio conformacional por medio del cual disminuye el contenido de hélices α en la proteína normal y aumenta la cantidad de hojas β (*Pan y col., 1993*). Los cambios estructurales preceden a alteraciones en las propiedades bioquímicas: la PrP^C es soluble en detergentes no desnaturalizantes, la PrP^{Sc} es insoluble; la PrP^C es digerida fácilmente por proteasas (denominada también proteína priónica sensible a proteasas) mientras que la PrP^{Sc} es parcialmente resistente, dando
45 lugar a la formación de un fragmento truncado en el extremo N-terminal, conocido como PrPres (proteína priónica resistente a proteasas) (*Cohen y col., 1998*).

- Experimentos en los que se silenció el gen endógeno de la PrP cuando los animales eran tanto resistentes a la enfermedad priónica como incapaces de generar nuevas partículas infecciosas apoyan la idea de que la PrP^C endógena está involucrada en el desarrollo de la infección (*Bueler y col., 1993*). Además, está claro que en el tiempo transcurrido
50 entre la inoculación con la proteína infecciosa y la aparición de los síntomas clínicos se produce un drástico aumento en la cantidad de PrP^{Sc}.

Estos hallazgos sugieren que la PrP^C endógena adquiere la conformación de la PrP^{Sc} por acción de una forma infecciosa de la molécula PrP (*Soto y col., 2001*). Se supone que los priones se replican cuando la PrP^{Sc} del inóculo

- infeccioso interactúa específicamente con la PrP^C del hospedador, catalizando su conversión en la forma patógena de la proteína. La especificidad por la secuencia primaria en la transmisión de priones (*Telling y col., 1994*) y la generación *in vitro* de moléculas similares a la PrP^{Sc} al mezclar PrP^C purificada con PrP^{Sc} (*Saborio y col., 2001*) sugieren la existencia de una asociación física entre las dos isoformas durante el proceso infeccioso. Sin embargo, no se conoce el mecanismo exacto subyacente a la conversión.
- Las investigaciones con transgenes quiméricos han demostrado que es probable que la PrP^C y la PrP^{Sc} interactúen en un dominio central delimitado por los codones 96 y 169 (*Prusiner, 1996*), y se ha probado que péptidos sintéticos de la PrP que abarcan la región 109-141 son capaces de unirse a la PrP^C y de competir con la interacción de la PrP^{Sc} (*Chabry y col., 1998*).
- En base a los datos obtenidos con animales transgénicos se ha propuesto que para la propagación de los priones son esenciales otros factores cerebrales adicionales presentes en el hospedador (*Telling y col., 1995*). Se ha demostrado previamente que la conversión de los priones no se produce en condiciones experimentales cuando se mezclan e incuban PrP^C purificada y PrP^{Sc} (*Saborio y col., 1999*), pero que la actividad de conversión se recupera cuando se vuelven a añadir las demás proteínas celulares a la muestra (*Saborio y col., 1999*). Este hallazgo proporciona evidencias directas de que son esenciales otros factores presentes en el cerebro para catalizar la propagación de los priones.
- La observación de que la reducción de colesterol reduce la formación de PrP^{Sc} mientras que la reducción de esfingolípidos aumenta la formación de PrP^{Sc} ha sugerido que las "balsas lipídicas" (dominios lipídicos en las membranas que contienen esfingolípidos y colesterol) pueden ser el lugar de la reacción de conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, que implica bien una proteína asociada a las balsas o bien lípidos seleccionados de las balsas (*Fantini y col., 2002*). Sin embargo, el papel de las balsas lipídicas en la infectividad de los priones sigue sin estar claro.
- Se han desarrollado varios métodos de detección de priones *in vitro* en una muestra. El conjunto de métodos de detección conocidos incluye métodos de detección de la PrP^{Sc} mediante portadores de ligandos específicos seleccionados entre aminoglucanos, fibronectina y apolipoproteína A (documento WO 02/065133); métodos en los que se usan los anticuerpos monoclonales seleccionados entre Gø138, 3B5 y 12F10 (*Schulz y col., 2000*); métodos basados en la formación de un complejo entre la PrP^{Sc} y la apolipoproteína H (documento WO 03/005037); o métodos basados en la amplificación de PrP^{Sc} *in vitro* denominada amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA, por sus siglas en inglés), descrita en *Saborio y col., 2001* y *Lucassen y col., 2003*.
- La apolipoproteína B es el componente proteico principal de las dos lipoproteínas aterogénicas conocidas, las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) y los remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Se considera que la concentración de apolipoproteína B refleja directamente el número de partículas aterogénicas en la sangre y se ha propuesto como parámetro para determinar el riesgo de aterosclerosis. Se cree que la biogénesis de la apolipoproteína B muestra regulación por translocación (*Lingappa y col., 1997*).
- La apolipoproteína E es un componente de varias lipoproteínas plasmáticas, tales como quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) y lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) (*Lehninger y col., 1993*).
- Recientemente, la apolipoproteína E ha surgido como factor de riesgo genético principal para la enfermedad de Alzheimer, un trastorno neurodegenerativo (documento US 6,022,683), y está regulada por incremento en el líquido cerebroespinal de pacientes con la ECJ variante y la enfermedad de Alzheimer en comparación con pacientes con la ECJ esporádica (*Choe y col., 2002*). El fenotipo 4/4 de la apolipoproteína E está asociado a un mayor riesgo de desarrollo de cardiopatías coronarias y de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (*Golaz y col., 1995*). Se ha descubierto que la expresión del gen de la apolipoproteína E está aumentada en los astrocitos asociados a las lesiones neuropatológicas en un modelo animal de tembladera (*Dietrich y col., 1991*).
- Se ha descubierto que la apolipoproteína E reconoce un motivo estructural compartido de amiloides y priones que, una vez inducido, puede acelerar la adopción de una conformación de hoja beta (*Baumann y col., 2000*).
- Las apolipoproteínas B y E son ligandos para el receptor de LDL y son conocidas por su papel destacado en el transporte de colesterol y el metabolismo de lipoproteínas plasmáticas a través de interacciones con el receptor de LDL. La apolipoproteína B es especialmente capaz de formar un complejo con un receptor de LDL. (*Segrest y col., 2001*; *Clavey y col., 1991*).
- Un planteamiento para el tratamiento y la prevención de enfermedades priónicas ha consistido en el desarrollo de agentes para bloquear la transformación de PrP^C en PrP^{Sc}. Algunos agentes propuestos fueron el colorante Rojo Congo (documento US 5,276,059), péptidos de crecimiento nervioso (documento US 5,134,121), fragmentos de proteínas priónicas (documento US 6,355,610), compuestos que reducen la liberación de apolipoproteína E en el tejido cerebral

(documento US 2002/0155426), agentes terapéuticos que impiden la interacción de la apolipoproteína E4 con la proteína relacionada con el receptor de LDL neuronal (documento WO 97/14437), compuestos que aumentan los niveles de apolipoproteína E (documento WO 99/15159) y péptidos que rompen las hojas beta (documento US 5,948,763).

Sería deseable desarrollar nuevos métodos para identificar e inhibir el/los factor(es) de conversión de priones.

5 *Resumen de la invención*

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar el uso de péptidos o proteínas en un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra.

Asimismo es un objetivo de la invención proporcionar el uso de péptidos o proteínas en un ensayo de cribado para identificar compuestos que modulan la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}.

- 10 Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar una sustancia que sea adecuada para tratar y/o prevenir y/o retrasar la progresión de los trastornos relacionados con priones, especialmente la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).

En un primer aspecto, la invención proporciona el uso de la apolipoproteína B en un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra.

- 15 En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de la apolipoproteína B en un ensayo de cribado para la identificación de compuestos que modulan la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}.

En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de un modulador, preferentemente un inhibidor o un antagonista, de la apolipoproteína B para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad priónica, especialmente la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).

- 20 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para el diagnóstico o la detección de una enfermedad priónica en un sujeto que se sospecha sufre de una enfermedad de este tipo, que comprende (i) poner una muestra de dicho sujeto en contacto con la apolipoproteína B, (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra.

- 25 En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para la determinación de un marcador que predisponga a un sujeto a una enfermedad priónica, que comprende (i) medir el nivel de apolipoproteína B y (ii) correlacionar dicho nivel de proteína obtenido en dicha etapa de medición con la presencia de una enfermedad priónica.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra, comprendiendo el ensayo (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B, (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra.

- 30 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método para la identificación de un compuesto que modula, preferentemente inhibe o antagoniza, la transición de PrP^C a PrP^{Sc}, que comprende: (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto; (ii) poner la muestra obtenida en las etapas (i)a y (i)b en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la cantidad de PrP^{Sc} (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto.

- 35 En un octavo aspecto, la invención proporciona un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra, comprendiendo el ensayo (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B; (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra.

- 40 En un noveno aspecto, la invención proporciona un ensayo de selección para la identificación de un compuesto que modula, preferentemente inhibe o antagoniza, la transición de PrP^C a PrP^{Sc}, que comprende: (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto; (ii) poner la muestra obtenida en las etapas (i)a y (i)b en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la cantidad de PrP^{Sc} (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto.

Descripción detallada de la invención

Los párrafos siguientes proporcionan definiciones de diferentes términos con la intención de que se apliquen uniformemente a toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, salvo que una definición que indique expresamente lo contrario proporcione una definición diferente.

- 5 La expresión "enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker", abreviada con "GSS", se refiere a una forma de la enfermedad priónica humana hereditaria. La enfermedad se produce por un trastorno autosómico dominante. Los miembros de la familia que heredan el gen mutante sucumben a la GSS.

- 10 El término "prión" hace referencia a una partícula transmisible conocida por causar un grupo de enfermedades conformacionales transmisibles (encefalopatías espongiformes) en seres humanos y animales. El término "prión" es una contracción de las palabras "proteína" e "infección", y las partículas se componen mayoritaria, si no exclusivamente, de moléculas PrP^{Sc}.

- 15 Los "priones" son distintos de bacterias, virus y viroides. Los priones conocidos incluyen aquellos que infectan animales para causar tembladera, una enfermedad degenerativa transmisible del sistema nervioso de ovejas y cabras, así como encefalopatías espongiformes bovinas (EEB), o la enfermedad de las vacas locas, y encefalopatías espongiformes felinas en gatos. Cuatro enfermedades priónicas conocidas por afectar a seres humanos son el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker (GSS) y el insomnio familiar fatal (IFF) (*Prusiner, 1991*). Como se usa en la presente memoria, el término prión incluye todas las formas de priones que causen todas o cualquiera de estas u otras enfermedades en cualquier animal usado, en particular en seres humanos y animales domésticos y de granja.

- 20 La expresión "balsas lipídicas" se refiere a pequeñas plataformas, revisadas recientemente (*Simons y col., 2000*), compuestas por esfingolípidos y colesterol en la cara exoplasmática externa y conectadas a colesterol en la cara citoplasmática interna de la bicapa. Las balsas lipídicas se pueden aislar por ser insolubles en ciertos detergentes, como Triton X-100, a 4°C. Por lo tanto, las balsas se pueden purificar en forma de membranas insolubles en detergentes (MID) o membranas resistentes a detergentes (MRD) por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Las balsas están enriquecidas en proteínas ancladas a GPI, así como en proteínas implicadas en la transducción de señales y el tráfico intracelular. En las neuronas, las balsas lipídicas actúan de plataformas para la transducción de señales iniciada por varias clases de factores neurotróficos (*Tsui-Pierchala y col., 2002*). En el ejemplo n° 2, apartado c, se proporciona un ejemplo de la extracción de balsas lipídicas.

- 25 La expresión "factor de conversión de priones" se refiere a un factor que comprende proteínas, lípidos, enzimas o receptores y que actúa de cofactor o factor auxiliar implicado en el proceso de conversión de PrP^C en PrP^{Sc} y favorece el inicio y/o la progresión de la enfermedad priónica.

- 30 Las expresiones "preparación normalizada de priones", "preparación de priones" y similares se usan en la presente memoria indistintamente para describir una composición que contiene priones, obteniéndose la composición, por ejemplo, a partir de tejido cerebral de mamíferos que contiene sustancialmente el mismo material genético que el relacionado con las proteínas PrP, por ejemplo de tejido cerebral de un conjunto de mamíferos que presentan signos de enfermedad priónica o, por ejemplo, una composición que se obtiene a partir de células infectadas de forma crónica por priones.

- 35 Las expresiones "sensible a infección", "sensible a infección por priones" y similares se usan para un material procedente de un mamífero, incluidas las células, que se puede infectar con una cantidad y tipo de prión que se espera cause una enfermedad priónica o síntomas de la misma.

- 40 Por analogía, las expresiones "resistente a infección", "resistente a infección por priones" y similares se usan para un material de un mamífero, incluidas las células, que presenta la característica de ser resistente cuando se infecta con una cantidad y tipo de prión que se espera cause una enfermedad priónica o síntomas de la misma y de permanecer sin infectar incluso después de varias inoculaciones de material priónico infeccioso.

- 45 El término "muestra" se refiere a un extracto biológico de un mamífero, que incluye muestras de células, líquido corporal, material genético tal como homogenado cerebral, células, balsas lipídicas o péptidos y proteínas purificados.

- 50 La expresión "tiempo de incubación" hace referencia al tiempo transcurrido desde la inoculación de un animal con un prión hasta que el animal desarrolle los primeros síntomas detectables de la enfermedad como resultado de la infección, así como al tiempo transcurrido desde la inoculación de material de un mamífero, por ejemplo homogenado cerebral, células, balsas lipídicas de células, con un prión hasta que la infección por priones sea detectable, por ejemplo a través

de la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}. Un experto en la técnica conoce varios métodos de detección de infecciones por priones y de conversión de PrP.

El término "fracción" o "fragmento" se refiere a cualquier fragmento de la cadena polipeptídica del compuesto propiamente dicho, solo o en combinación con moléculas o restos relacionados unidos a él, por ejemplo restos de azúcares o fosfatos, o agregados del polipéptido o péptido original. Tales moléculas también pueden ser el resultado de otras modificaciones que normalmente no alteran la secuencia primaria, por ejemplo la derivatización química *in vivo* o *in vitro* de péptidos (acetilación o carboxilación), las realizadas por modificación del patrón de fosforilación (introducción de restos fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina) o de glucosilación (por exposición del péptido a enzimas que afectan a la glucosilación, por ejemplo enzimas glucosilantes o desglucosilantes) de un péptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento posteriores.

Los términos "modulador" o "compuesto modulador" se refieren a moléculas que modifican las funciones y/o propiedades (como la unión al receptor, la afinidad lipídica, la interacción enzimática, la organización estructural, la síntesis, el metabolismo) de la proteína natural. Los "moduladores" o "compuestos moduladores" incluyen "agonistas" y "antagonistas". Los "moduladores" incluyen péptidos, proteínas o fragmentos de los mismos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos y anticuerpos.

El término "miméticos" se refiere a moléculas que mimetizan las funciones y/o propiedades (como la unión al receptor, la afinidad lipídica, la interacción enzimática, la organización estructural, la síntesis, el metabolismo) de una proteína natural. Estos compuestos poseen, por ejemplo, la propiedad de potenciar una propiedad de la proteína natural (es decir, de producir, cuando el compuesto se añade a la proteína natural, la misma actividad que la que se obtiene aumentando la concentración de la proteína natural) o de mostrar la misma propiedad que la proteína natural (es decir, de producir la misma actividad cuando el compuesto sustituye a la proteína natural). Los "miméticos" incluyen péptidos, proteínas o fragmentos de los mismos, peptidomiméticos y compuestos orgánicos. En los documentos US 2002028175 y WO 2004043403 se describen ejemplos de miméticos de la apolipoproteína E.

Los términos "inhibidor" o "antagonista" se refieren a moléculas que alteran parcialmente o reducen las funciones y/o propiedades (como la unión al receptor, la afinidad lipídica, la interacción enzimática, la organización estructural, la síntesis, la secreción, el metabolismo) de la proteína natural. Los "inhibidores" o "antagonistas" incluyen péptidos, proteínas o fragmentos de los mismos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos y anticuerpos. En *Choi y col., 1997* y *Wang y col., 2000* se describen ejemplos de anticuerpos de la apolipoproteína B. Ejemplos de antagonistas de la apolipoproteína pueden ser antagonistas que alteran o reducen la función de las apolipoproteínas B en la ruta de transporte de colesterol. En los documentos US 6,369,075, US 6,197,972, WO 03002533 y WO 03045921 se describen ejemplos de compuestos que alteran la secreción o síntesis de apolipoproteína B. Otros "moduladores" o "antagonistas" pueden ser moduladores del receptor de LDL, preferentemente antagonistas del receptor de LDL, tales como anticuerpos contra el receptor de LDL. En el documento WO 0168710 se proporcionan ejemplos de anticuerpos monoclonales contra el receptor de LDL.

La expresión "ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas", o "ensayo PMCA", es un ensayo para el diagnóstico o la detección de enfermedades conformacionales que comprende un sistema de amplificación cíclica para incrementar los niveles del conformero patógeno, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 02/04954.

El término "marcador" para una enfermedad se refiere a un parámetro o valor biológico que incluye un carácter genético, mutación(es) proteica(s) hereditaria(s), el nivel de una proteína o una enzima en sangre que difiere del valor medio en una población heterogénea de individuos y cuya presencia se correlaciona con la presencia de dicha enfermedad con una significación estadística. Un "marcador" para una enfermedad o afección se define típicamente como un cierto nivel de corte de dicha variable biológica. Un "marcador" proporciona la base para determinar el riesgo (probabilidad de aparición) de una enfermedad en un sujeto.

El término "complejo" incluye la formación de una entidad por interacción de varias moléculas, varias proteínas, varios péptidos entre sí o con un receptor. Estas interacciones pueden ser reversibles y/o transitorias. Estas interacciones pueden inducir cambios en las propiedades de las moléculas, proteínas, péptidos o receptores que interactúan.

Por "cantidad eficaz" se entiende una concentración de péptido(s) que es capaz de ralentizar o inhibir la formación de depósitos de PrP^{Sc} o de disolver depósitos preformados. Estas concentraciones pueden ser determinadas de forma rutinaria por los expertos en la materia. Los expertos en la materia también apreciarán que la dosis puede depender de la estabilidad del péptido administrado. Un péptido menos estable puede requerir una administración en múltiples dosis.

La preparación de anticuerpos es conocida por el experto en la materia. Se denomina "anticuerpo" a un anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo anti-anti-Id o un fragmento del mismo que reconozca y se una específicamente a la Apo B o Apo E y a fragmentos de la misma. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se obtienen mediante la generación de líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos

- monoclonales capaces de reconocer y unirse específicamente a la Apo B y/o a fragmentos de la misma. Más específicamente, estos anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer y unirse específicamente a la Apo B. Un anticuerpo monoclonal se puede preparar de manera convencional, por ejemplo cultivando un hibridoma clonado que comprenda células de bazo de un mamífero inmunizado con ApoBh y una célula linfocítica homogénea o heterogénea en medio líquido o abdomen de mamífero para permitir que el hibridoma produzca y acumule el anticuerpo monoclonal. Preferentemente, el anticuerpo reconoce y se une específicamente a fragmentos que reconocen Apo B-LDL.
- 5 La presente invención proporciona compuestos capaces de controlar, es decir, incrementar y/o inhibir la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} en enfermedades priónicas.
- 10 La actividad de los compuestos de la invención de controlar la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} en enfermedades priónicas se puede detectar usando, por ejemplo, un ensayo *in vitro*, como el que se describe en *Saborio y col., 2001*, que mide la capacidad de los compuestos de la invención para modular la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} . Los resultados se indican en los ejemplos.
- En una realización, la invención proporciona el uso de la apolipoproteína B en un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra.
- 15 En otra realización de la invención, la apolipoproteína B usada en un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra se une y/o forma un complejo con el receptor de LDL.
- En otra realización, la invención proporciona el uso de la apolipoproteína B en un ensayo de cribado para la identificación de compuestos que modulan la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} .
- 20 En otra realización más de la invención, la apolipoproteína B usada en un ensayo de cribado para la identificación de compuestos que modulan la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} se une y/o forma un complejo con el receptor de LDL.
- En otra realización más de la invención, el ensayo es un ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA).
- En una realización preferida de la invención, el ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) usa homogenado cerebral normal como fuente de PrP^{C} normal y factor de conversión de priones.
- 25 En una realización preferida de la invención, el ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) usa lisados celulares o balsas lipídicas extraídas de células de neuroblastoma sensibles a la infección por priones, como la línea N2a, descrita en el ejemplo 2, y equivalentes, como una fuente de PrP^{C} normal y un factor de conversión de priones. Las fracciones de balsas lipídicas también se pueden purificar directamente a partir del cerebro y servir como fuente de sustrato para la PMCA.
- 30 En una realización preferida, la invención proporciona el uso de la apolipoproteína B en un ensayo para la detección de PrP^{C} en una muestra, en el que el ensayo es un ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) que usa balsas lipídicas procedentes de la línea celular de neuroblastoma N2a sensible a infección como una fuente de PrP normal y sustrato.
- 35 En otra realización, la invención proporciona el uso de un modulador, preferentemente un inhibidor o un antagonista, de la apolipoproteína B para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad priónica, especialmente la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ). El modulador modifica, por ejemplo, las funciones y/o propiedades de la apolipoproteína B o de un fragmento de la misma.
- En otra realización de la invención, el modulador, preferentemente un inhibidor o un antagonista, de la apolipoproteína B modifica, preferentemente inhibe, la unión y/o la formación de un complejo entre la apolipoproteína B y el receptor de LDL. Un ejemplo de tal modulador puede ser un modulador del receptor de LDL, como un antagonista del receptor de LDL, tal como un anticuerpo del receptor de LDL.
- 40 En una realización preferida de la invención, el modulador es un antagonista de la apolipoproteína B.
- En otra realización preferida de la invención, el modulador es un anticuerpo producido contra la apolipoproteína B.
- En otra realización preferida de la invención, el modulador es un anticuerpo producido contra la apolipoproteína B.

En una realización de la invención, la invención proporciona un método para el diagnóstico o la detección de una enfermedad priónica en un sujeto que se sospecha sufre de una enfermedad de este tipo, que comprende (i) poner una muestra de dicho sujeto en contacto con apolipoproteína B, (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra. La muestra del sujeto incluye un extracto biológico de un mamífero, tal como una muestra de células, material genético, líquido corporal, homogenado cerebral, células y balsas lipídicas.

En otra realización de la invención, la invención proporciona un método para la determinación de un marcador que predisponga a un sujeto a una enfermedad priónica, que comprende (i) medir el nivel de apolipoproteína B en dicha muestra; (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) correlacionar dicho nivel de proteína obtenido en dicho paso de medición con la presencia de una enfermedad priónica. El marcador incluye un parámetro o valor biológico, tal como un carácter genético, mutación(es) proteica(s) hereditaria(s), el nivel de una proteína o enzima en sangre.

En otra realización de la invención, la invención proporciona un método para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra, comprendiendo el ensayo (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B, (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra. La muestra puede ser una preparación biológica en la cual se ha de detectar la presencia de priones por razones de control de calidad y/o una muestra extraída de un sujeto que se sospecha sufre de una enfermedad de este tipo, que incluye un extracto biológico de un mamífero, tal como una muestra de células, material genético, líquido corporal, homogenado cerebral, células y balsas lipídicas.

En otra realización de la invención, la invención proporciona un método para identificar en una muestra un compuesto que modula, preferentemente inhibe o antagoniza, la transición de PrP^C a PrP^{Sc}, que comprende: (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B, (ii) poner en contacto la muestra obtenida en la etapa (i) (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto; (iii) poner la muestra obtenida en las etapas (ii)a y (ii)b en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iv) determinar la cantidad de PrP^{Sc} (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto. El modulador incluye anticuerpos, inhibidores de la unión de apolipoproteínas B que incluye la unión al receptor de LDL, y/o su secreción y/o síntesis.

Otra realización más de la presente invención consiste en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad priónica, tal como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), en la que el método comprende la administración de una dosis eficaz del modulador antes mencionado de un péptido o una proteína, seleccionándose el péptido o la proteína de la apolipoproteína B, a un sujeto que lo necesite, y en la que el sujeto puede ser un ser humano o un animal.

En un método de uso preferido de los moduladores, preferentemente inhibidores, la administración de los moduladores se realiza por inyección o infusión a intervalos periódicos. La administración de un compuesto de la invención puede comenzar antes de detectarse cualquier síntoma en el paciente y deberá continuar después.

Los compuestos moduladores antes mencionados de la presente invención pueden administrarse por cualquier medio que logre la finalidad pretendida. Por ejemplo, la administración se puede realizar por numerosas vías diferentes que incluyen, sin limitación, la subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intranasal, oral, rectal, transdérmica, intranasal o bucal. Preferentemente, los compuestos de la invención se administran por inyección o infusión subcutánea, intramuscular o intravenosa.

La administración parenteral se puede realizar por inyección en bolo o por perfusión gradual a lo largo del tiempo. Un régimen típico para prevenir, suprimir o tratar los trastornos relacionados con priones comprende (1) la administración de una cantidad eficaz en una o dos dosis de alta concentración de modulador en el intervalo de 0,5 a 10 mg de péptido, más preferentemente de 0,5 a 10 mg de péptido, o (2) la administración de una cantidad eficaz del péptido en múltiples dosis de menor concentración de compuestos moduladores en el intervalo de 10 a 1000 µg, más preferentemente de 50 a 500 µg, a lo largo de un periodo de tiempo de hasta e inclusive varios meses a varios años. Se entiende que la dosis administrada dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del paciente, en su caso del tratamiento concurrente, la frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosis total requerida para cada tratamiento se puede administrar mediante múltiples dosis o en una dosis única.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la materia. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma

hidrosoluble, por ejemplo sales hidrosolubles. Además se pueden administrar suspensiones del compuesto activo en forma de suspensiones oleosas apropiadas para inyección.

En otra realización de la invención, se proporciona un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra, comprendiendo el ensayo (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B; (ii) poner en contacto la muestra obtenida en la etapa (i); (iii) poner la muestra obtenida en la etapa (ii) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iv) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra. La muestra puede ser una preparación biológica en la cual se ha de detectar la presencia de priones por razones de control de calidad y/o una muestra extraída de un sujeto que se sospecha sufre de una enfermedad de este tipo, que incluye un extracto biológico de un mamífero, tal como una muestra de células, material genético, líquido corporal que incluye sangre, suero, plasma, homogenado cerebral, células y balsas lipídicas.

En otra realización de la invención se proporciona un ensayo de cribado para la identificación de un compuesto que modula, preferentemente inhibe o antagoniza, la transición de PrP^C a PrP^{Sc}, que comprende: (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto modulador; (ii) poner la muestra obtenida en las etapas (i)a y (i)b en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C, como homogenados cerebrales, lisados celulares, preparaciones de balsas lipídicas; y (iii) determinar la cantidad de PrP^{Sc} (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto modulador. El modulador incluye anticuerpos, inhibidores de la apolipoproteína B y/o de su secreción y/o síntesis.

En una realización preferida, la enfermedad priónica es la encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

En una realización preferida, la enfermedad priónica es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) esporádica, variante, familiar o iatrogénica.

La presente invención se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas, pero el contenido de la descripción comprende todas las modificaciones y sustituciones que pueda aportar un experto en la materia sin extenderse más allá del significado y el propósito de las reivindicaciones.

La invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse como que limitan de alguna manera la presente invención. Los ejemplos hacen referencia a las figuras especificadas a continuación.

Breve descripción de los dibujos:

La figura 1 muestra la replicación de priones *in vitro* en homogenado cerebral de hámster mediante el ensayo de PMCA en presencia y ausencia de un agente reductor de colesterol (ejemplo 1, apartado b). Las muestras contienen homogenado cerebral normal de hámster al 5% incubado durante 30 min a 4°C con metil-β-ciclodextrina (MβCD) 0,5, 10 o 20 mM (concentración final). Se añaden alícuotas de homogenado cerebral de tembladera para obtener una dilución de 3.200 (panel superior) y 12.800 veces (panel inferior). La mitad de las muestras se congela inmediatamente como control sin amplificación (PMCA "-") y la otra mitad se somete a 10 ciclos de PMCA (PMCA "+"). La replicación de los priones se evalúa mediante inmunotransferencia después de tratar las muestras con PK (100µg/ml durante 60 min). Los primeros carriles de cada transferencia corresponden al homogenado de cerebro normal no tratado con PK.

La figura 2 muestra el efecto de las apolipoproteínas B, E y J *in vitro* sobre la replicación de priones en homogenado cerebral de hámster mediante el ensayo de PMCA (ejemplo 1, apartado c). Las muestras que contienen homogenado cerebral normal de hámster al 5% se incuban durante 30 min a 40°C con diferentes cantidades de apolipoproteína B humana (2A), apolipoproteína E humana (2B) o apolipoproteína J murina (2C). Se añaden alícuotas de homogenado cerebral de tembladera para obtener una dilución de 3.200 (panel izquierdo) o 12.800 veces (panel derecho). La mitad de las muestras se congela inmediatamente como control sin amplificación (PMCA "-") y la otra mitad se somete a 10 ciclos de PMCA (PMCA "+"). La replicación de los priones se evalúa mediante inmunotransferencia después de tratar las muestras con PK (100µg/ml durante 60 min). Los primeros carriles de cada transferencia corresponden al homogenado de cerebro normal no tratado con PK.

La figura 3 representa las diferentes sensibilidades de los subclones de N2a a la infección por tembladera reveladas por exposición a anticuerpos monoclonales anti-PrP 6H4 (ejemplo 2, apartado b). La exposición a la proteinasa K (PK) muestra dónde se encuentra la isoforma PrP^{Sc} (resistente a proteinasa K). Los dos subclones destacados, n°23 y n°60, se eligen respectivamente como representativos de células resistentes y sensibles a la infección por priones. 'N2a' muestra células N2a sin infectar procesadas en paralelo. Los controles para la inmunotransferencia y la digestión con PK presentan 1 µl de extracto cerebral normal o de tembladera diluido en 80 µl de tampón de lisis y se procesan en paralelo.

La figura 4 muestra la caracterización de la PrP en balsas lipídicas procedentes de subclones de N2a resistentes (nº23) y sensibles (nº60) a la infección por priones (ejemplo 2, apartado c). La figura 4A muestra la cuantificación de la PrP por inmunotransferencia en balsas lipídicas extraídas de células resistentes (nº23) y sensibles (nº60) a la infección por priones. Se representa la distribución de PrP en el extracto total (carga 25 µg) (1), la capa de muestra en sacarosa después de la centrifugación (carga 25 µg) (2) y la fracción flotante de balsas lipídicas (carga 4 µg) (3). La figura 4B muestra el contenido y el patrón de glucosilación de la PrP en los dos subclones nº23 y nº60 mediante inmunotransferencia con anti-PrP. Se analizaron tres preparaciones independientes de balsas lipídicas de células resistentes (nº23) y sensibles (nº60) a la infección por priones. Se analizaron en cada caso cantidades iguales (4 µg) de proteínas de balsas. La figura 4C muestra la misma membrana después de eliminar los anticuerpos y de volver a incubarla con anti-actina, lo que confirma la similitud en la carga de proteínas.

La figura 5 representa la actividad de conversión *in vitro* de las balsas lipídicas procedentes de subclones de N2a resistentes (nº23) y sensibles (nº60) a la infección por priones usando la PMCA (ejemplo 2, apartado d). *Panel superior:* Se aíslan balsas lipídicas de células resistentes (nº23) y sensibles (nº60) a la infección por priones. Las preparaciones se mezclan en una relación 100:1 con homogenado cerebral de RML al 10% y las alícuotas se congelan inmediatamente, se incuban durante 15 h a 37°C o se someten a 15 ciclos de PMCA. Carriles 1: mezcla inicial sin digestión con PK; carriles 2: mezcla inicial digerida con 10 µg/ml de PK durante 1 h a 37°C; carriles 3: mezcla incubada a 37°C y digerida con PK como en el carril 2; carriles 4: 15 ciclos de PMCA seguidos de una digestión con PK como en el carril 2. El carril 5 muestra la migración y la reactividad cruzada de la PK sola con anti-PrP. *Panel inferior:* Después de la inmunotransferencia se tiñe la membrana con azul de Coomassie para confirmar que la digestión con la PK ha sido completa.

La figura 6 muestra el efecto inhibitor inducido por un anticuerpo policlonal anti-ApoBh sobre la replicación de priones en células sensibles a la infección por priones (ejemplo 2, apartado e).

Se cultivaron células sensibles nº60 infectadas de forma crónica en placas de cultivo de 24 pocillos en presencia de cantidades crecientes (0 a 2 mg/ml) de un anticuerpo policlonal de cabra contra la ApoB humana (Chemicon) o contra una serie correspondiente de IgG vírgenes de cabra. El nivel de replicación de la PrP se determinó mediante transferencia cuantitativa en mancha y se expresó como intensidad quimioluminiscente/mg de proteína. En el gráfico se expresa la intensidad quimioluminiscente para cada concentración de anticuerpo en porcentaje del valor obtenido sin el anticuerpo. Concentraciones más altas del anticuerpo anti-ApoBh presentan un efecto inhibitor sobre la replicación de PrP.

La figura 7 muestra separaciones bidimensionales de proteínas de balsas lipídicas procedentes de células N2a (ejemplo 3). Se aíslan balsas lipídicas de células sensibles a la infección por priones (nº60) y se precipitan 2 alícuotas de 25 µg con acetona y se procesan para el análisis bidimensional en la primera dimensión que abarca los intervalos de pH 3-10 (7A) o 6-11 (7B). Tras la separación por SDS-PAGE en la segunda dimensión se tiñeron los geles usando el kit "silver express" (Invitrogen). La flecha indica la misma proteína en ambos geles (7A y 7B) Se comparan las proteínas dentro del rectángulo mostrado en B de las balsas lipídicas del subclon sensible a la infección por priones nº60 (C) con las del subclon resistente nº23 (D). Las flechas indican proteínas que abundan más en las células resistentes.

Abreviaturas:

Apo B (apolipoproteína B); Apo E (apolipoproteína E); Apo J (apolipoproteína J); BCA (ácido bicinonínico); CHAPS (1-propanosulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)); SNC (sistema nervioso central); EEB (encefalopatía espongiiforme bovina); ECJ (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob); Dil (perclorato de 1,1-dioctadecil-3,3,3,3-tetrametilindocarbocianina); MID (membrana insoluble en detergentes); DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco); MRD (membrana resistente a detergentes); DTT (1,4-ditio-D,L-treitol); IPG (gradiente de pH inmovilizado); IEF (isoelectroenfoque); SFB (suero fetal bovino); IFF (insomnio familiar fatal); GSS (enfermedad de Gerstmann-Strassler-Scheinker); h (hora); HRP (peroxidasa de rábano picante); kDa (kilodalton); LDL (lipoproteína de baja densidad); µg (microgramo); µl (microlitro); min (minuto); MBCD (metil-β-ciclodextrina); mM (milimolar); EM (espectrometría de masa); PBS (sulfato tamponado con fosfato); PK (proteína K); PMCA (amplificación cíclica de proteínas mal plegadas); PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo); PrP (proteína priónica); PrP^C (conformero normal no patógeno de la PrP); PrP^{Sc} (isoforma patógena o "tembladera" de la PrP, que también es el marcador de enfermedades priónicas); PVDF (poli(difluoruro de vinilideno)); RPM (revoluciones por minuto); RML (Rocky Mountain Laboratory); RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa); SDS (dodecilsulfato sódico); V (voltios); vol. (volumen).

EJEMPLOS

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Los siguientes ejemplos ilustran compuestos y métodos preferidos para determinar sus actividades biológicas.

La PrP de la tembladera usada como inóculo infeccioso es la cepa RML (Rocky Mountain Laboratory).

Los anticuerpos monoclonales anti-PrP 6H4 se adquirieron de Prionics.

La proteinasa K se obtuvo de Boehringer Ingelheim y la metil-β-ciclodextrina, de Sigma.

- 5 La apolipoproteína B (Apo B) y la apolipoproteína E (Apo E) humanas purificadas y exentas de lípidos se obtuvieron de Chemicon.

Anti-apo B y anti-apo E son anticuerpos policlonales de cabra contra la Apo B humana y la Apo E humana, respectivamente, obtenidos de Chemicon y dializados contra PBS para eliminar la azida sódica.

La IgG total de cabra se adquirió de Pierce y se dializó contra PBS.

- 10 La línea celular de neuroblastoma de ratón N2a se obtuvo de la ATCC.

La Apo J murina (Apo J) se obtuvo internamente como se describe en el documento PCT/EP2004/05037.

La LDL marcada con Dil se obtuvo de Molecular Probes (L-3482).

EJEMPLO 1: Replicación de priones *in vitro* en homogenado cerebral mediante el ensayo de PMCA:

- 15 La influencia del colesterol y de algunas de las apolipoproteínas sobre la replicación de priones *in vitro* se analiza mediante un ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) (*Saborio y col., 2001*) en el que se usa homogenado cerebral de hámster como fuente de PrP^C y factores de conversión como sigue.

a) Preparación del cerebro:

- 20 Tras la decapitación se obtienen cerebros de hámsteres dorados de Siria sanos o infectados con la cepa de la tembladera adaptada 263 K que se congelan inmediatamente en hielo seco y se conservan a -80°C hasta su uso. Los cerebros se homogeneizan en PBS que contiene inhibidores de proteasas (mezcla CompleteTM de Boehringer Mannheim) a una concentración final de 1x. Se añaden detergentes (Triton X-100 al 0,5%, SDS al 0,05%, concentraciones finales) y las muestras se clarifican por centrifugación a baja velocidad (10.000 g) durante 1 min usando una centrifuga de Eppendorf (modelo 5415).

- 25 Se añaden diluciones (3.200 veces y 12.800 veces) del homogenado cerebral de tembladera directamente al homogenado cerebral sano para desencadenar la replicación de priones. 60 µl de estas mezclas se congelan inmediatamente y otros 60 µl se incuban a 37°C con agitación. Cada hora se realiza un ciclo de sonicación (5 pulsos de 1 s cada uno) usando un microsonicador (Bandelin Electronic, modelo Sonoplus) en el que la sonda se sumerge en la muestra y el nivel de energía se fija al 40%. Estos ciclos se repiten 10 veces.

b) Señal de PMCA en presencia y ausencia de un agente reductor de colesterol:

- 30 En estas condiciones se observa un drástico aumento en la intensidad de la señal de PrP^{Sc} después de 10 ciclos de PMCA (figura 1, carriles 2 y 3). Cuando se trata homogenado cerebral normal durante 30 min con metil-β-ciclodextrina (MβCD) 10 y 20 mM (pero no 5 mM), se observa una inhibición completa de la replicación de priones (figura 1, carriles 6-9), como se obtiene en modelos de ratón, en cultivos celulares e *in vitro*, lo que indica que la reducción de colesterol ejerce un efecto perjudicial sobre la replicación de los priones (*Taraboulos y col., 1995*).

- 35 c) Señal de PMCA en presencia de apolipoproteínas

A la preparación de PMCA sin ciclodextrina se añaden respectivamente Apo B humana (figura 2A) y Apo E humana (figura 2B) purificadas y exentas de lípidos a diferentes concentraciones (8 y 16 µg de ApoBh, 1 y 10 µg de ApoEh). Las muestras se incuban durante 15 min a 4°C, y a continuación se congela la mitad de cada muestra y la otra mitad se somete a ciclos de PMCA.

- 40 Se observa un aumento de la replicación de priones *in vitro* tanto en la dilución del homogenado cerebral de tembladera de 3.200 veces como en la de 12.800 veces y tanto con Apo B como con Apo E.

Por el contrario, la adición de apolipoproteína J (a concentraciones de 1, 2 y 4 μ g), un componente apolipoproteico de HDL, no presenta ningún efecto sobre la señal de PMCA (figura 2C).

Estos datos muestran el efecto de las apolipoproteínas B y E implicadas en la conversión de priones.

EJEMPLO 2: Replicación de priones *in vitro* en balsas lipídicas de células sensibles a la infección por priones mediante PMCA:

Se usa la línea celular de neuroblastoma de ratón N2a por su susceptibilidad a ser infectada con PrP^{Sc}. *Baron y col., 2002* y *Enari y col., 2001* han demostrado que existen sublíneas de N2a sensibles a la infección por priones y resistentes a la infección por priones. Se aíslan balsas lipídicas de la línea sensible a la infección por priones y se usan como sustrato para el ensayo de PMCA. El efecto de un antagonista de la apolipoproteína B en la conversión de priones se estudia a través de la capacidad que posee el antagonista de la apolipoproteína B para inhibir la capacidad de replicación de priones que presentan las líneas celulares N2a sensibles a la infección por priones.

a) Preparación de células N2a:

Se derivan subclones de la línea celular de neuroblastoma de ratón parental N2a a partir de células individuales mediante dilución límite. Un cultivo en crecimiento (medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Gibco nº 41966-029) que contiene un 10% de suero fetal bovino (SFB) y está suplementado con L-glutamato 2 mM y antibióticos convencionales (penicilina y estreptomina)) se diluye a una densidad de 5 células/ml, y se transfieren 100 μ l a los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos y se cultivan durante 1 semana.

Los cultivos individuales se examinan bajo microscopio para determinar aquellos pocillos que contienen un solo foco de células en crecimiento. Los cultivos derivados de una sola célula se transfieren después a placas de 24 pocillos y se someten cada 3 o 4 días a pases seriados a una dilución de 1:15 para conservar cultivos madre. Se aísla un total de 63 cultivos, y todos se ensayan respecto a su sensibilidad a la infección por la cepa RML de PrP^{Sc}. Para ello se añaden 4 μ l de un extracto de cerebro al 10% infectado en fase tardía por pocillo de células recién sometidas a un pase y los cultivos se dejan durante otros 4 días para que alcancen una confluencia del 100%. A continuación, las células se someten a pases seriados en ausencia de PrP^{Sc}. Los ensayos muestran que toda traza del inóculo inicial desaparece tras el pase 4.

Los cultivos individuales se ensayan respecto a la presencia de PrP^{Sc} en este pase y en pases posteriores.

b) Aislamiento de células resistentes a la infección por priones mediante transferencia en mancha de cultivos celulares:

La presencia de PrP^{Sc} en los 63 cultivos de células individuales se ensaya mediante el procedimiento de transferencia en mancha de cultivos celulares, en el que la lisis y la digestión con proteinasa K (PK) se realizan directamente en la placa de cultivo. La PrP^{Sc} resistente a PK se detecta mediante transferencia en mancha a membranas de PVDF y exposición a un anticuerpo anti-PrP de la siguiente manera:

Las células infectadas se cultivan durante 3 o 4 días en placas de 24 pocillos y se lavan una vez con PBS. Se añaden a cada pocillo 40 μ l de DNasa I (1.000 U/ml en H₂O) a temperatura ambiente durante 5 min y, seguidamente, 40 μ l de una solución de proteinasa K (20 μ g/ml en Tris/HCl 100 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, 1% de Triton X-100, 1% de desoxicolato sódico). Las placas se incuban durante 1 h a 37°C con agitación suave. La digestión con proteinasa K se detiene mediante la adición de 2 μ l de una solución que contiene 80 μ g/ml de PMSF, Tris-HCl 10 mM, pH 8,8, y 1 mg/ml de azul de bromofenol. Se aplican alícuotas de 20 μ l en manchas sobre membranas de PVDF equilibradas con una solución desgasificada que contiene glicina 192 mM, Tris 25 mM, 20% de metanol. Después, las membranas se transfieren durante 10 min a tiocianato de guanidina 3 M, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, para desnaturalizar las proteínas, se lavan en agua y se procesan como para la inmunotransferencia usando anti-PrP 6H4 (Prionics). Las uniones inespecíficas se bloquean por incubación durante 1 h con leche disuelta al 5% en PBS. La membrana se expone después al anticuerpo primario específico anti-PrP 6H4 y, seguidamente, a un anticuerpo secundario conjugado con HRP, diluido cada uno de forma apropiada en PBS, 0,3% de Tween 20. Las inmunotransferencias se revelan mediante ECLTM (Amersham) según las instrucciones del proveedor.

La señal de quimioluminiscencia de las membranas se analiza después directamente usando Kodak Imagestation 440CF. La señal de luminiscencia se normalizó en cada condición por posibles diferencias en el crecimiento celular. El contenido total de proteínas en un lisado paralelo no tratado con proteinasa K se determina usando el ensayo BCA (Biorad), y los resultados se expresan como intensidad/ μ g de proteína.

De los 63 subclones analizados, 9 resultaron ser capaces de replicar la PrP^{Sc}, si bien con diferentes eficacias (figura 3). Los 54 subclones restantes eran resistentes a la infección. Se seleccionaron las líneas celulares más sensibles a la

infección por priones para estudiarlas adicionalmente junto con varios subclones resistentes a la infección por priones con morfologías y tiempos de duplicación similares. Los autores han seleccionado dos de estas líneas celulares: n°23, un clon resistente a la infección por priones, y n°60, un clon sensible a la infección por priones.

Estas dos líneas celulares se han mantenido en cultivo durante más de un año y se han infectado con RML en muchas ocasiones diferentes a lo largo de este periodo: en cada ocasión, el subclon n°60 era altamente infectable mientras que el subclon n°23 era totalmente resistente. Los subclones sensibles a la infección por priones se pueden mantener como cultivo celular infectado de forma crónica mediante pases seriados a diluciones de 1:15 o 1:20 cada 3 o 4 días respectivamente.

No se han observado por microscopía diferencias morfológicas evidentes entre células resistentes o sensibles, ni entre células no infectadas e infectadas.

Para validar la relevancia clínica de este modelo celular de la replicación de PrP se inyectaron mediante inyección estereotáctica extractos de células N2a infectadas de forma crónica o tampón solo en el hipocampo de ratones normales. La inyección de extractos de N2a dio como resultado el inicio de los síntomas clínicos de la tembladera al cabo de 140 días y la muerte prematura, mientras que la inyección del testigo no tuvo efecto alguno sobre la fisiología o la supervivencia. Esto indica que el modelo basado en células para la replicación de priones usando células N2a sensibles a la infección por priones genera tembladera por PrP infecciosa, lo que confirma que la conversión de PrP en células es un buen modelo para el proceso que ocurre *in vivo*.

c) Aislamiento de balsas lipídicas:

Numerosos laboratorios (*Simons y col., 2000; Hooper y col., 1999*) han descrito procedimientos para el aislamiento de balsas lipídicas basados en la resistencia a la solubilización en Triton X-100 frío seguido de la flotación en gradientes de sacarosa. El aislamiento de balsas lipídicas de las dos líneas celulares seleccionadas anteriormente se realiza de la siguiente manera:

Se lavan cultivos subconfluentes de células N2a en PBS y se recogen por centrifugación a 1.000 x g durante 5 min. Típicamente se combinan placas de 3 x 15 cm, lo que equivale a aproximadamente 8×10^7 células. Las células sedimentadas se resuspenden en 1 ml de tampón de balsas enfriado en hielo (Triton X-100 al 1% en PBS que contiene sulfato de cobre 10 μ M y una mezcla de inhibidores de proteasas Complete (Boehringer)). Las células se rompen mediante siete pasadas a través de una aguja 22G y seguidamente se incuban durante 30 min a 4°C con agitación suave. Se añaden 2 volúmenes de sacarosa al 60% en PBS y el lisado se transfiere a un tubo de centrifuga SW41. El lisado se cubre cuidadosamente con 7 ml de sacarosa al 35% y 1 ml de sacarosa al 15% en PBS y se centrifuga durante 20 h a 35.000 rpm. Las balsas lipídicas se recuperan en el 1 ml superior del gradiente. Las membranas se concentran por adición de 10 volúmenes de PBS frío y centrifugación a 100.000 g durante 2 h. De forma alternativa, para la electroforesis bidimensional en gel, las proteínas de la fracción de balsas lipídicas se recuperan en presencia de 5 vol. de acetona durante 2 h a -80°C. Los precipitados de acetona se recogen por centrifugación a 14.000 g durante 20 min y se lavan dos veces en etanol al 70%.

Tanto en las células sensibles como en las resistentes, alrededor del 1 al 2% de las proteínas del lisado total se recupera en la fracción de balsa flotante. Como muestra la inmunotransferencia (figura 4A), mientras que la PrP es apenas detectable en el extracto celular total, está muy enriquecida en las balsas, dejando la capa de muestra totalmente exenta de PrP después de la centrifugación.

El clon n°60 sensible a la infección por priones y el clon n°23 resistente a la infección por priones se comparan mediante inmunotransferencia con anti-PrP (figura 4B). Se vuelven a incubar tres pares independientes diferentes de preparaciones de balsas que contienen cada una 50 μ g de proteínas totales de balsa con un anticuerpo anti-actina, lo que confirma la uniformidad de la carga de proteína PrP (figura 4C).

Los resultados indican que el nivel de PrP en las preparaciones de balsas lipídicas procedentes de los dos tipos celulares es indistinguible. Además, la distribución entre las isoformas no glucosiladas, mono- y diglucosiladas, así como la segregación hacia la fracción de membrana resistente a detergentes mostrada en la figura 4A, es idéntica, lo que sugiere que ninguno de estos factores parece responsable de los fenotipos diferentes.

El ADNc de la PrP de ambas líneas celulares se amplificó por RT-PCR de la siguiente manera:

Se prepara ARN total de células N2a usando Trizol (Gibco) y el ADNc de la PrP de ratón se transcribe inversamente con Omniscript (Qiagen) usando el protocolo suministrado por el fabricante. El cebador específico para la síntesis de ADNc es 5' TCAATTGAAAGAGCTACAGGTG 3'. El ADNc priónico se amplifica usando las condiciones de PCR normales en presencia de los cebadores 5' ACCAGTCCAATTTAGGAGAGCC 3' (hebra superior) y 5'

AGACCACGAGAATGCGAAGG 3' (hebra inferior). El producto de la PCR se secuenció por completo en el ABI3700 automático usando los reactivos y el protocolo suministrados por el fabricante.

Estos datos revelan que el ARNm de la PrP es el natural en ambos casos y que ambas llevan una metionina en la posición 129, que en los seres humanos es el sitio de polimorfismo frecuente.

- 5 Por lo tanto, los niveles de expresión, los patrones de glucosilación, la localización intracelular y las secuencias primarias de la PrP^C en ambos tipos celulares son indistinguibles y, por consiguiente, son otros factores celulares los responsables de la diferente respuesta a la PrP^{Sc}.

d) Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) *in vitro* en balsas lipídicas de células sensibles a la infección por priones:

- 10 Las balsas lipídicas obtenidas en el apartado c se aíslan de los subclones sensibles a la infección por priones (subclones nº60), se recogen por centrifugación como se ha descrito anteriormente y se resuspenden en tampón de conversión para PMCA a una concentración de 2 a 2,5 mg/ml (PBS que contiene una concentración final de NaCl 300 mM, 0,5% de Triton X-100, 0,05% de SDS).

- 15 Un homogenado cerebral de ratón al 10% infectado con RML se añade directamente a la preparación de balsas a una dilución de 1:100, respecto al contenido de proteína, y alícuotas de la mezcla se congelan inmediatamente, se incuban durante 15 h a 37°C o se someten a 15 ciclos de PMCA (5 pulsos de sonicación de 0,1 s, seguidos de una incubación de 1 h a 37°C).

- 20 Después se tratan alícuotas de 20 µl de muestra con 10 µg/ml de proteinasa K durante 1 h a 37°C. Los lípidos se eliminan precipitando las proteínas resistentes a PK con 5 vol. de acetona durante 2 h a -80°C. Los precipitados de acetona se recogen por centrifugación a 14.000 g durante 20 min, se lavan dos veces en etanol al 70% y se analizan por inmunotransferencia con anti-PrP 6H4 (figura 5).

- 25 En comparación con la mezcla no tratada con PK (carriles 1 y 5), todas las muestras digeridas muestran una modificación del peso molecular característico de la forma truncada en el extremo terminal y resistente a la PK, PrP₂₇₋₃₀. Cabe señalar que el anticuerpo 6H4 también presenta poca reactividad cruzada con la PK, que migra a 30 kDa, próxima a la forma diglucosilada de la PrP digerida con la PK. Teniendo esto en cuenta, el análisis de los datos muestra que el nivel inicial de la PrP resistente a PK procedente del extracto cerebral diluido, que está presente en las mezclas no amplificadas, es apenas detectable en estas condiciones (carriles 2).

- 30 Se observa un ligero aumento de la señal cuando la MRD sensible a la infección por priones (nº60) se incubaba a 37°C durante 15 h (carril 3 del nº60), aunque el mayor incremento de la PrP resistente a PK se observa cuando esta muestra se somete a 15 ciclos de PMCA (carril 4 del nº60). Esto indica que todos los factores necesarios para la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} residen en las balsas lipídicas de las células N2a sensibles a la infección por priones. Curiosamente, en el análisis paralelo en el que se usó la MRD de la línea celular nº23 resistente a la infección por priones, no se observó ninguna amplificación *in vitro* (carril 4 del nº23), lo que indica que la capacidad de las balsas lipídicas para convertir la proteína priónica *in vitro* refleja la actividad observada en las células intactas.

- 35 e) Efecto de un anticuerpo producido contra la apolipoproteína B sobre la replicación de priones en células N2a sensibles a la infección por priones:

- 40 Se cultivaron células sensibles infectadas de forma crónica en placas de 24 pocillos en presencia de un anticuerpo policlonal de cabra producido contra la Apo B humana (Chemicon) a concentraciones crecientes de 0 a 2 mg/ml en DMEM (Gibco nº 41966-029) que contenía los suplementos 1 x B27 (Gibco nº 17504-044) y antibióticos convencionales (penicilina y estreptomycin)

Se incubó una serie paralela de cultivos en presencia del mismo intervalo de concentraciones de IgG total de una cabra virgen. Los resultados muestran que concentraciones de anticuerpo anti-ApoBh superiores a 0,5 mg/ml dan lugar a una inhibición progresiva de la replicación de PrP, como lo revela la transferencia cuantitativa en mancha (figura 6).

Estos datos demuestran el papel de la apolipoproteína B en la conversión de priones.

- 45 **EJEMPLO 3: Análisis proteómico de balsas lipídicas de células resistentes y sensibles a la infección por priones:**

Puesto que las dos preparaciones celulares son indistinguibles en cuanto a su contenido en PrP, se realizó una comparación de proteínas más completa usando la electroforesis bidimensional en gel para mostrar diferencias en otras proteínas que pudieran subrayar la diferencia en la actividad de conversión entre los dos subclones.

Las preparaciones para el gel bidimensional se prepararon de la siguiente manera:

- 5 Las proteínas precipitadas con acetona (véase el apartado c) se resuspenden en 20 µl de SDS al 1%, DTT al 0,23% y se calientan a 95°C durante 5 min. Una vez enfriada la preparación a temperatura ambiente, se añaden 25 µl de una solución (urea 9 M, CHAPS 4%, DTT 65 mM, base Tris 35 mM).

- 10 Quince minutos más tarde se añaden a la mezcla 85 µl de una solución que contiene urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 100 mM. Al cabo de otros 15 min, se elimina el material no solubilizado por centrifugación a 14.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se aplica directamente sobre una tira de IPG de 7 cm y se deja que se rehidrate durante la noche. Para el IEF se incrementa el voltaje progresivamente de 300 V a 3,5 kV y la electroforesis se realiza a un total de 20 kVh. Las proteínas se separan en la segunda dimensión usando geles de un solo pocillo con gradiente de 4-12% (Novex) y se tiñen con el kit Silver Express (Invitrogen) según las instrucciones suministradas.

- 15 El análisis mediante geles bidimensionales revela la fracción de proteínas que se recupera en las balsas lipídicas (aproximadamente 1-2% de proteína en el lisado de células N2a) como un subconjunto reproducible de proteínas celulares totales en el que se pueden visualizar varios cientos de especies por tinción con plata (figura 7A y B).

Se comparan los patrones bidimensionales de las preparaciones aisladas de células sensibles y resistentes a la infección por priones. El análisis se centra en varias proteínas identificadas en el intervalo básico del gel que abundan más en las MRD de células resistentes a la infección por priones (flechas en las figuras 7C y D).

- 20 Después de una electroforesis a escala preparativa, las dos proteínas señaladas con flechas se escindieron y se procesaron para la secuenciación mediante EM. Se obtuvo un péptido triptico idéntico de ambas proteínas con una masa monisotópica de 1234,6. La secuencia N-terminal de este péptido triptico es: ENFAGEATLQR (SEC ID N°: 3). Todos los aminoácidos del péptido se identifican en el espectro de EM/EM de iones precursores de doble carga a m/z 618,30

- 25 y mediante su análisis Mascot.

- 30 La búsqueda en la base de datos identificó esta proteína sin lugar a dudas como apolipoproteína B (Apo B). Puesto que el peso molecular de la Apo B de longitud completa excede de los 500 kDa mientras que estas dos manchas migran con pesos moleculares estimados de 40 kDa y 30 kDa, los autores suponen que estos últimos son fragmentos generados en la célula o durante la preparación de las muestras. La secuencia corresponde a los aminoácidos 3548-3558 de la proteína Apo B humana, que solo están presentes en la ApoB-100 pero no en la forma truncada ApoB-48.

Estos datos sugieren que los fragmentos con un peso molecular de o aproximadamente de 30 a 40 kDa que comprenden la SEC ID N°: 3 pueden desempeñar un papel en la ruta de conversión de priones.

EJEMPLO 4: Unión e internalización del receptor de LDL fluorescente en células resistentes y sensibles:

- 35 Los subclones de N2a n°23 (sensibles a la infección por priones) y n° 60 (resistentes a la infección por priones) se cultivaron durante 2 días en placas de 24 pocillos en medio DMEM convencional que contenía 10% de SFB y después se transfirieron durante 1 h al mismo medio (300 µl) que contenía 1% de SFB. Para visualizar la unión a la superficie celular, las placas se colocaron en hielo para inhibir la endocitosis y se añadieron 3 µl de Dil-LDL fluorescente (Molecular Probes) durante 30 min. La unión de LDL se visualizó mediante microscopía de fluorescencia. Para estudiar la captación de LDL en cada uno de los subclones, las células se incubaron antes del examen microscópico con 3 µl de Dil-LDL durante 2 h a 37°C.

En paralelo se incubaron cultivos de control con LDL acetilada acoplada a Dil, que no se une al receptor de LDL, o con Hoechst para visualizar los núcleos celulares.

- 45 La unión o captación de Dil-LDL fluorescente es similar en las células resistentes a la infección por priones y en las sensibles a la infección por priones, lo que sugiere que el nivel del receptor de LDL es similar en estos dos tipos celulares.

Referencias

- Aizawa y col., Brain R. 768 (1-2), 208-14, 1997;
- Baron y col., The EMBO Journal, 21, 5, 1031-1040, 2002;
- Baumann y col., Biochem J., 349, 77-8, 2000;
- Bruce y col., Nature, 389, 498-501, 1997;
- 5 Bueler y col., Cell 73, 1339-1347, 1993;
- Chabry y col., J. Biol. Chem. 273, 13203-13207, 1998;
- Choe y col., Electrophoresis, 23, 2242-2246, 2002;
- Choi y col., J. Lip. Res., 38(1)77-85, 1997;
- Clavey y col., Annales d'Endocrinologie, 52, 459-463, 1991 ;
- 10 Cohen y col., Ann. Rev. Biochem. 67, 793-819, 1998;
- Dietrich y col., Journal of virology, 65(9), 4759-476, 1991;
- Enari y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9295-9299, 2001;
- Fantini y col., Expert Reviews in Molecular Medicine, diciembre 20, 1-22, 2002;
- Golaz y col., Electrophoresis, 16, 1184-118, 1995;
- 15 Hooper y col., Mol. Memb. Biol. 16, 145-156, 1999;
- Lehninger y col., Principles of Biochemistry, 2ª ed. Nueva York: Worth Publishers, 1993;
- Lingappa y col., Membrane proteins, Kyushu Univ. Press Japon, 1997, págs. 93-100, XP001183818 & Internat. Symposium ISSN : 0003-4266
- Lucassen y col., Biochemistry, 42, 4127-4135, 2003 ;
- 20 Pan y col., Prey. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 90, 10962-10966, 1993;
- Prusiner, Science 252, 1515-1522, 1991;
- Prusiner, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, 13363-13383, 1998;
- Roos y col., Brain 96, 1-20, 1973;
- Saborio y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 470-475, 1999;
- 25 Saborio y col., Nature, 411, 810-813, 2001;
- Schulz y col., American Journal of Pathology, 156(1), 51-56, 2000;
- Segrest y col., Journal of Lipid Research, 42, 1346-1367, 2001;
- Simons y col, Molecular Cell Biology 1, pág. 31-41, 2000;
- Scott y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96, 15137-15142, 1999;
- 30 Soto y col., Trends Mol. Med. 7, 109-114, 2001;

- Taraboulos y col., The Journal of Cell Biology, 129 (1), 121-132, 1995;
- Telling y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 9936-9940, 1994;
- Tsui-Pierchala y col., Trends Neurosci. 25, 412-417, 2002;
- Wang y col., Aeterioscler. Thromb. Vas. Biol., 20(5), 1301-8, 2000;
- 5 Will y col., Lancet 347, 925, 1996;
- Yamada y col, Ann Clin. Lab. Sci. 27(4), 77-85, 1997;
- US 5,134,121
- US 5,276,059
- US 5,948,763
- 10 US 6,022,683
- US 6,197,972
- US 6,355,610
- US 6,552,922
- US 20020128175
- 15 US 20020155426
- WO 97/14437
- WO 99/15159
- WO 0168710
- WO 0204954
- 20 WO 02065133
- WO 03002533
- WO 03005037
- WO 03045921
- WO 2004043403

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.V.

<120> USO DE AGENTES MODULADORES DE LA CONVERSIÓN DE PRIONES

<130> WO/845

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4563

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu Met Leu
20 25 30

Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe Lys His
35 40 45

Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser Gly Val
50 55 60

Pro Gly Thr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys Lys Val
65 70 75 80

Glu Leu Glu Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr Ser Gln
85 90 95

Cys Thr Leu Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys Ala Leu
100 105 110

Leu Lys Lys Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Ala Met Ser Arg
115 120 125

Tyr Glu Leu Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe Leu Tyr
130 135 140

Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg Gly Ile
145 150 155 160

Ile Ser Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val

ES 2 401 645 T3

165	170	175
Leu Phe Leu Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe Thr Val		
180	185	190
Lys Thr Arg Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu Arg Asp		
195	200	205
Leu Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile Ser Pro		
210	215	220
Leu Ala Leu Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu Ile Ser		
225	230	235
Ser Ser Gln Ser Cys Gln Tyr Thr Leu Asp Ala Lys Arg Lys His Val		
245	250	255
Ala Glu Ala Ile Cys Lys Glu Gln His Leu Phe Leu Pro Phe Ser Tyr		
260	265	270
Asn Asn Lys Tyr Gly Met Val Ala Gln Val Thr Gln Thr Leu Lys Leu		
275	280	285
Glu Asp Thr Pro Lys Ile Asn Ser Arg Phe Phe Gly Glu Gly Thr Lys		
290	295	300
Lys Met Gly Leu Ala Phe Glu Ser Thr Lys Ser Thr Ser Pro Pro Lys		
305	310	315
Gln Ala Glu Ala Val Leu Lys Thr Leu Gln Glu Leu Lys Lys Leu Thr		
325	330	335
Ile Ser Glu Gln Asn Ile Gln Arg Ala Asn Leu Phe Asn Lys Leu Val		
340	345	350
Thr Glu Leu Arg Gly Leu Ser Asp Glu Ala Val Thr Ser Leu Leu Pro		
355	360	365
Gln Leu Ile Glu Val Ser Ser Pro Ile Thr Leu Gln Ala Leu Val Gln		
370	375	380
Cys Gly Gln Pro Gln Cys Ser Thr His Ile Leu Gln Trp Leu Lys Arg		
385	390	395
Val His Ala Asn Pro Leu Leu Ile Asp Val Val Thr Tyr Leu Val Ala		
405	410	415

ES 2 401 645 T3

Leu Ile Pro Glu Pro Ser Ala Gln Gln Leu Arg Glu Ile Phe Asn Met
 420 425 430
 Ala Arg Asp Gln Arg Ser Arg Ala Thr Leu Tyr Ala Leu Ser His Ala
 435 440 445
 Val Asn Asn Tyr His Lys Thr Asn Pro Thr Gly Thr Gln Glu Leu Leu
 450 455 460
 Asp Ile Ala Asn Tyr Leu Met Glu Gln Ile Gln Asp Asp Cys Thr Gly
 465 470 475 480
 Asp Glu Asp Tyr Thr Tyr Leu Ile Leu Arg Val Ile Gly Asn Met Gly
 485 490 495
 Gln Thr Met Glu Gln Leu Thr Pro Glu Leu Lys Ser Ser Ile Leu Lys
 500 505 510
 Cys Val Gln Ser Thr Lys Pro Ser Leu Met Ile Gln Lys Ala Ala Ile
 515 520 525
 Gln Ala Leu Arg Lys Met Glu Pro Lys Asp Lys Asp Gln Glu Val Leu
 530 535 540
 Leu Gln Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ser Pro Gly Asp Lys Arg Leu Ala
 545 550 555 560
 Ala Tyr Leu Met Leu Met Arg Ser Pro Ser Gln Ala Asp Ile Asn Lys
 565 570 575
 Ile Val Gln Ile Leu Pro Trp Glu Gln Asn Glu Gln Val Lys Asn Phe
 580 585 590
 Val Ala Ser His Ile Ala Asn Ile Leu Asn Ser Glu Glu Leu Asp Ile
 595 600 605
 Gln Asp Leu Lys Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser Gln Leu
 610 615 620
 Pro Thr Val Met Asp Phe Arg Lys Phe Ser Arg Asn Tyr Gln Leu Tyr
 625 630 635 640
 Lys Ser Val Ser Leu Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys Ile Glu
 645 650 655

ES 2 401 645 T3

Gly Asn Leu Ile Phe Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Met
 660 665 670
 Leu Lys Thr Thr Leu Thr Ala Phe Gly Phe Ala Ser Ala Asp Leu Ile
 675 680 685
 Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu Ala Leu
 690 695 700
 Phe Gly Lys Gln Gly Phe Phe Pro Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Tyr
 705 710 715 720
 Trp Val Asn Gly Gln Val Pro Asp Gly Val Ser Lys Val Leu Val Asp
 725 730 735
 His Phe Gly Tyr Thr Lys Asp Asp Lys His Glu Gln Asp Met Val As n
 740 745 750
 Gly Ile Met Leu Ser Val Glu Lys Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Lys
 755 760 765
 Glu Val Pro Glu Ala Arg Ala Tyr Leu Arg Ile Leu Gly Gl u Glu Leu
 770 775 780
 Gly Phe Ala Ser Leu His Asp Leu Gln Leu Leu Gly Lys Leu Leu Leu
 785 790 795 800
 Met Gly Ala Arg Thr Leu Gln Gly Ile Pro Gln Me t Ile Gly Glu Val
 805 810 815
 Ile Arg Lys Gly Ser Lys Asn Asp Phe Phe Leu His Tyr Ile Phe Met
 820 825 830
 Glu Asn Ala Phe Glu Leu Pro Thr Gly Al a Gly Leu Gln Leu Gln Ile
 835 840 845
 Ser Ser Ser Gly Val Ile Ala Pro Gly Ala Lys Ala Gly Val Lys Leu
 850 855 860
 Glu Val Ala Asn Met Gln Ala Glu Leu Val Ala Lys Pro Ser Val Ser
 865 870 875 880
 Val Glu Phe Val Thr Asn Met Gly Ile Ile Ile Pro Asp Phe Ala Arg
 885 890 895

ES 2 401 645 T3

Ser Gly Val Gln Met Asn Thr Asn Phe Phe His Glu Ser Gly Leu Glu
 900 905 910
 Ala His Val Ala Leu Lys Ala Gly Lys Leu Lys Phe Ile Ile Pro Ser
 915 920 925
 Pro Lys Arg Pro Val Lys Leu Leu Ser Gly Gly Asn Thr Leu His Leu
 930 935 940
 Val Ser Thr Thr Lys Thr Glu Val Ile Pro Pro Leu Ile Glu Asn Arg
 945 950 955 960
 Gln Ser Trp Ser Val Cys Lys Gln Val Phe Pro Gly Leu Asn Tyr Cys
 965 970 975
 Thr Ser Gly Ala Tyr Ser Asn Ala Ser Ser Thr Asp Ser Ala Ser Tyr
 980 985 990
 Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Arg Leu Glu Leu Glu Leu Arg Pro Thr
 995 1000 1005
 Gly Glu Ile Glu Gln Tyr Ser Val Ser Ala Thr Tyr Glu Leu Gln
 1010 1015 1020
 Arg Glu Asp Arg Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val Thr Gln
 1025 1030 1035
 Ala Glu Gly Ala Lys Gln Thr Glu Ala Thr Met Thr Phe Lys Tyr
 1040 1045 1050
 Asn Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Glu Val Gln Ile Pro Asp
 1055 1060 1065
 Phe Asp Val Asp Leu Gly Thr Ile Leu Arg Val Asn Asp Glu Ser
 1070 1075 1080
 Thr Glu Gly Lys Thr Ser Tyr Arg Leu Thr Leu Asp Ile Gln Asn
 1085 1090 1095
 Lys Lys Ile Thr Glu Val Ala Leu Met Gly His Leu Ser Cys Asp
 1100 1105 1110
 Thr Lys Glu Glu Arg Lys Ile Lys Gly Val Ile Ser Ile Pro Arg
 1115 1120 1125
 Leu Gln Ala Glu Ala Arg Ser Glu Ile Leu Ala His Trp Ser Pro

ES 2 401 645 T3

1130		1135		1140
Ala Lys Leu Leu Leu Gln Met Asp Ser Ser Ala Thr Ala Tyr Gly		1150		1155
1145				
Ser Thr Val Ser Lys Arg Val Ala Trp His Tyr Asp Glu Glu Lys		1165		1170
1160				
Ile Glu Phe Glu Trp Asn Thr Gly Thr Asn Val Asp Thr Lys Lys		1180		1185
1175				
Met Thr Ser Asn Phe Pro Val Asp Leu Ser Asp Tyr Pro Lys Ser		1195		1200
1190				
Leu His Met Tyr Ala Asn Arg Leu Leu Asp His Arg Val Pro Glu		1210		1215
1205				
Thr Asp Met Thr Phe Arg His Val Gly Ser Lys Leu Ile Val Ala		1225		1230
1220				
Met Ser Ser Trp Leu Gln Lys Ala Ser Gly Ser Leu Pro Tyr Thr		1240		1245
1235				
Gln Thr Leu Gln Asp His Leu Asn Ser Leu Lys Glu Phe Asn Leu		1255		1260
1250				
Gln Asn Met Gly Leu Pro Asp Phe His Ile Pro Glu Asn Leu Phe		1270		1275
1265				
Leu Lys Ser Asp Gly Arg Val Lys Tyr Thr Leu Asn Lys Asn Ser		1285		1290
1280				
Leu Lys Ile Glu Ile Pro Leu Pro Phe Gly Gly Lys Ser Ser Arg		1300		1305
1295				
Asp Leu Lys Met Leu Glu Thr Val Arg Thr Pro Ala Leu His Phe		1315		1320
1310				
Lys Ser Val Gly Phe His Leu Pro Ser Arg Glu Phe Gln Val Pro		1330		1335
1325				
Thr Phe Thr Ile Pro Lys Leu Tyr Gln Leu Gln Val Pro Leu Leu		1345		1350
1340				
Gly Val Leu Asp Leu Ser Thr Asn Val Tyr Ser Asn Leu Tyr Asn		1360		1365
1355				

ES 2 401 645 T3

Trp Ser Ala Ser Tyr Ser Gly Gly Asn Thr Ser Thr Asp His Phe
1370 1375 1380

Ser Leu Arg Ala Arg Tyr His Met Lys Ala Asp Ser Val Val Asp
1385 1390 1395

Leu Leu Ser Tyr Asn Val Gln Gly Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Asp
1400 1405 1410

His Lys Asn Thr Phe Thr Leu Ser Cys Asp Gly Ser Leu Arg His
1415 1420 1425

Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser His Val Glu Lys Leu
1430 1435 1440

Gly Asn Asn Pro Val Ser Lys Gly Leu Leu Ile Phe Asp Ala Ser
1445 1450 1455

Ser Ser Trp Gly Pro Gln Met Ser Ala Ser Val His Leu Asp Ser
1460 1465 1470

Lys Lys Lys Gln His Leu Phe Val Lys Glu Val Lys Ile Asp Gly
1475 1480 1485

Gln Phe Arg Val Ser Ser Phe Tyr Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Leu
1490 1495 1500

Ser Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg Leu Asn Gly Glu Ser
1505 1510 1515

Asn Leu Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Thr Asn Gln Ile
1520 1525 1530

Thr Gly Arg Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Thr Ser Thr Ser
1535 1540 1545

Asp Leu Gln Ser Gly Ile Ile Lys Asn Thr Ala Ser Leu Lys Tyr
1550 1555 1560

Glu Asn Tyr Glu Leu Thr Leu Lys Ser Asp Thr Asn Gly Lys Tyr
1565 1570 1575

Lys Asn Phe Ala Thr Ser Asn Lys Met Asp Met Thr Phe Ser Lys
1580 1585 1590

ES 2 401 645 T3

Gln Asn	Ala Leu	Leu Arg	Ser	Glu Tyr	Gln Ala	Asp	Tyr Glu	Ser
1595			1600			1605		
Leu Arg	Phe Phe	Ser Leu	Leu	Ser Gly	Ser Leu	Asn	Ser His	Gly
1610			1615			1620		
Leu Glu	Leu Asn	Ala Asp	Ile	Leu Gly	Thr Asp	Lys	Ile Asn	Ser
1625			1630			1635		
Gly Ala	His Lys	Ala Thr	Leu	Arg	Ile Gly	Gln Asp	Gly Ile	Ser
1640			1645			1650		
Thr Ser	Ala Thr	Thr Asn	Leu	Lys Cys	Ser Leu	Leu	Val Leu	Glu
1655			1660			1665		
Asn Glu	Leu Asn	Ala Glu	Leu	Gly Leu	Ser Gly	Ala	Ser Met	Lys
1670			1675			1680		
Leu Thr	Thr Asn	Gly Arg	Phe	Arg Glu	His Asn	Ala	Lys Phe	Ser
1685			1690			1695		
Leu Asp	Gly Lys	Ala Ala	Leu	Thr Glu	Leu Ser	Leu	Gly Ser	Ala
1700			1705			1710		
Tyr Gln	Ala Met	Ile Leu	Gly	Val Asp	Ser Lys	Asn	Ile Phe	Asn
1715			1720			1725		
Phe Lys	Val Ser	Gln Glu	Gly	Leu Lys	Leu Ser	Asn	Asp Met	Met
1730			1735			1740		
Gly Ser	Tyr Ala	Glu Met	Lys	Phe Asp	His Thr	Asn	Ser Leu	Asn
1745			1750			1755		
Ile Ala	Gly Leu	Ser Leu	Asp	Phe Ser	Ser Lys	Leu	Asp Asn	Ile
1760			1765			1770		
Tyr Ser	Ser Asp	Lys Phe	Tyr	Lys Gln	Thr Val	Asn	Leu Gln	Leu
1775			1780			1785		
Gln Pro	Tyr Ser	Leu Val	Thr	Thr Leu	Asn Ser	Asp	Leu Lys	Tyr
1790			1795			1800		
Asn Ala	Leu Asp	Leu Thr	Asn	Asn Gly	Lys Leu	Arg	Leu Glu	Pro
1805			1810			1815		

ES 2 401 645 T3

Leu Lys 1820 Leu His Val Ala Gly 1825 Asn Leu Lys Gly Ala 1830 Tyr Gln Asn
 Asn Glu 1835 Ile Lys His Ile Tyr 1840 Ala Ile Ser Ser Ala 1845 Ala Leu Ser
 Ala Ser 1850 Tyr Lys Ala Asp Thr 1855 Val Ala Lys Val Gln 1860 Gly Val Glu
 Phe Ser 1865 His Arg Leu Asn Thr 1870 Asp Ile Ala Gly Leu 1875 Ala Ser Ala
 Ile Asp 1880 Met Ser Thr Asn Tyr 1885 Asn Ser Asp Ser Leu 1890 His Phe Ser
 Asn Val 1895 Phe Arg Ser Val Met 1900 Ala Pro Phe Thr Met 1905 Thr Ile Asp
 Ala His 1910 Thr Asn Gly Asn Gly 1915 Lys Leu Ala Leu Trp 1920 Gly Glu His
 Thr Gly 1925 Gln Leu Tyr Ser Lys 1930 Phe Leu Leu Lys Ala 1935 Glu Pro Leu
 Ala Phe 1940 Thr Phe Ser His Asp 1945 Tyr Lys Gly Ser Thr 1950 Ser His His
 Leu Val 1955 Ser Arg Lys Ser Ile 1960 Ser Ala Ala Leu Glu 1965 His Lys Val
 Ser Ala 1970 Leu Leu Thr Pro Ala 1975 Glu Gln Thr Gly Thr 1980 Trp Lys Leu
 Lys Thr 1985 Gln Phe Asn Asn Asn 1990 Glu Tyr Ser Gln Asp 1995 Leu Asp Ala
 Tyr Asn 2000 Thr Lys Asp Lys Ile 2005 Gly Val Glu Leu Thr 2010 Gly Arg Thr
 Leu Ala 2015 Asp Leu Thr Leu Leu 2020 Asp Ser Pro Ile Lys 20 25 Val Pro Leu
 Leu Leu 2030 Ser Glu Pro Ile Asn 2035 Ile Ile Asp Ala Leu 2040 Glu Met Arg
 Asp Ala Val Glu Lys Pro Gln Glu Phe Thr Ile Val Ala Phe Val

ES 2 401 645 T3

2045					2050					2055				
Lys	Tyr	Asp	Lys	Asn	Gln	Asp	Val	His	Ser	Ile	Asn	Leu	Pro	Phe
2060						2065					2070			
Phe	Glu	Thr	Leu	Gln	Glu	Tyr	Phe	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Thr	Ile
2075						2080					2085			
Ile	Val	Val	Val	Glu	Asn	Val	Gln	Arg	Asn	Leu	Lys	His	Ile	Asn
2090						2095					2100			
Ile	Asp	Gln	Phe	Val	Arg	Lys	Tyr	Arg	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu
2105						2110					2115			
Pro	Gln	Gln	Ala	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asn	Ser	Phe	Asn	Trp	Glu	Arg
2120						2125					2130			
Gln	Val	Ser	His	Ala	Lys	Glu	Lys	Leu	Thr	Ala	Leu	Thr	Lys	Lys
2135						2140					2145			
Tyr	Arg	Ile	Thr	Glu	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	Ala	Leu	Asp	Asp	Ala
2150						2155					2160			
Lys	Ile	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Thr	Tyr	Met
2165						2170					2175			
Ile	Gln	Phe	Asp	Gln	Tyr	Ile	Lys	Asp	Ser	Tyr	Asp	Leu	His	Asp
2180						2185					2190			
Leu	Lys	Ile	Ala	Ile	Ala	Asn	Ile	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	Glu	Lys
2195						2200					2205			
Leu	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	His	Tyr	His	Ile	Arg	Val	Asn	Leu	Val
2210						2215					2220			
Lys	Thr	Ile	His	Asp	Leu	His	Leu	Phe	Ile	Glu	Asn	Ile	Asp	Phe
2225						2230					2235			
Asn	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Trp	Ile	Gln	Asn	Val	Asp
2240						2245					2250			
Thr	Lys	Tyr	Gln	Ile	Arg	Ile	Gln	Ile	Gln	Glu	Lys	Leu	Gln	Gln
2255						2260					2265			
Leu	Lys	Arg	His	Ile	Gln	Asn	Ile	Asp	Ile	Gln	His	Leu	Ala	Gly
2270						2275					2280			

ES 2 401 645 T3

Lys Leu Lys Gln His Ile Glu Ala Ile Asp Val Arg Val Leu Leu
 2285 2290 2295
 Asp Gln Leu Gly Thr Thr Ile Ser Phe Glu Arg Ile Asn Asp Val
 2300 2305 2310
 Leu Glu His Val Lys His Phe Val Ile Asn Leu Ile Gly Asp Phe
 2315 2320 2325
 Glu Val Ala Glu Lys Ile Asn Ala Phe Arg Ala Lys Val His Glu
 2330 2335 2340
 Leu Ile Glu Arg Tyr Glu Val Asp Gln Gln Ile Gln Val Leu Met
 2345 2350 2355
 Asp Lys Leu Val Glu Leu Thr His Gln Tyr Lys Leu Lys Glu Thr
 2360 2365 2370
 Ile Gln Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val Lys Ile Lys Asp
 2375 2380 2385
 Tyr Phe Glu Lys Leu Val Gly Phe Ile Asp Asp Ala Val Lys Lys
 2390 2395 2400
 Leu Asn Glu Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ile Glu Asp Val Asn Lys
 2405 2410 2415
 Phe Leu Asp Met Leu Ile Lys Lys Leu Lys Ser Phe Asp Tyr His
 2420 2425 2430
 Gln Phe Val Asp Glu Thr Asn Asp Lys Ile Arg Glu Val Thr Gln
 2435 2440 2445
 Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu Leu Pro Gln Lys Ala
 2450 2455 2460
 Glu Ala Leu Lys Leu Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val Ala
 2465 2470 2475
 Val Tyr Leu Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Ile Thr Leu Ile Ile
 2480 2485 2490
 Asn Trp Leu Gln Glu Ala Leu Ser Ser Ala Ser Leu Ala His Met
 2495 2500 2505

ES 2 401 645 T3

Lys	Ala	Lys	Phe	Arg	Glu	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	Arg	Asp	Arg	Met
2510						2515					2520			
Tyr	Gln	Met	Asp	Ile	Gln	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ser	Leu
2525						2530					2535			
Val	Gly	Gln	Val	Tyr	Ser	Thr	Leu	Val	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asp	Trp
2540						2545					2550			
Trp	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Thr	Asp	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr
2555						2560					2565			
Ser	Ile	Gln	Asp	Trp	Ala	Lys	Arg	Met	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Gln
2570						2575					2580			
Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Met	Pro
2585						2590					2595			
Ala	Phe	Glu	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Ala	Thr	Phe	Gln
2600						2605					2610			
Thr	Pro	Asp	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Thr	Asp	Leu	Arg	Ile	Pro	Ser
2615						2620					2625			
Val	Gln	Ile	Asn	Phe	Lys	Asp	Leu	Lys	Asn	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser
2630						2635					2640			
Arg	Phe	Ser	Thr	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Leu	Asn	Thr	Phe	His	Ile
2645						2650					2655			
Pro	Ser	Phe	Thr	Ile	Asp	Phe	Val	Glu	Met	Lys	Val	Lys	Ile	Ile
2660						2665					2670			
Arg	Thr	Ile	Asp	Gln	Met	Gln	Asn	Ser	Glu	Leu	Gln	Trp	Pro	Val
2675						2680					2685			
Pro	Asp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Leu
2690						2695					2700			
Ala	Arg	Ile	Thr	Leu	Pro	Asp	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile
2705						2710					2715			
Pro	Glu	Phe	Ile	Ile	Pro	Thr	Leu	Asn	Leu	Asn	Asp	Phe	Gln	Val
2720						2725					2730			

ES 2 401 645 T3

Pro	Asp	Leu	His	Ile	Pro	Glu	Phe	Gln	Leu	Pro	His	Ile	Ser	His
2735						2740					2745			
Thr	Ile	Glu	Val	Pro	Thr	Phe	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys
2750						2755					2760			
Ile	Gln	Ser	Pro	Leu	Phe	Thr	Leu	Asp	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Gly
2765						2770					2775			
Asn	Gly	Thr	Thr	Ser	Ala	Asn	Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile
2780						2785					2790			
Thr	Ala	Lys	Gly	Glu	Ser	Lys	Leu	Glu	Val	Leu	Asn	Phe	Asp	Phe
2795						2800					2805			
Gln	Ala	Asn	Ala	Gln	Leu	Ser	Asn	Pro	Lys	Ile	Asn	Pro	Leu	Ala
2810						2815					2820			
Leu	Lys	Glu	Ser	Val	Lys	Phe	Ser	Ser	Lys	Tyr	Leu	Arg	Thr	Glu
2825						2830					2835			
His	Gly	Ser	Glu	Met	Leu	Phe	Phe	Gly	Asn	Ala	Ile	Glu	Gly	Lys
2840						2845					2850			
Ser	Asn	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	His	Thr	Glu	Lys	Asn	Thr	Leu	Glu
2855						2860					2865			
Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ile	Val	Lys	Ile	Asn	Asn	Gln	Leu	Thr	Leu
2870						2875					2880			
Asp	Ser	Asn	Thr	Lys	Tyr	Phe	His	Lys	Leu	Asn	Ile	Pro	Lys	Leu
2885						2890					2895			
Asp	Phe	Ser	Ser	Gln	Ala	Asp	Leu	Arg	Asn	Glu	Ile	Lys	Thr	Leu
2900						2905					2910			
Leu	Lys	Ala	Gly	His	Ile	Ala	Trp	Thr	Ser	Ser	Gly	Lys	Gly	Ser
2915						2920					2925			
Trp	Lys	Trp	Ala	Cys	Pro	Arg	Phe	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	His	Glu
2930						2935					2940			
Ser	Gln	Ile	Ser	Phe	Thr	Ile	Glu	Gly	Pro	Leu	Thr	Ser	Phe	Gly
2945						2950					2955			
Leu	Ser	Asn	Lys	Ile	Asn	Ser	Lys	His	Leu	Arg	Val	Asn	Gln	Asn

ES 2 401 645 T3

2960	2965	2970
Leu Val Tyr Glu Ser Gly Ser 2975	Leu Asn Phe Ser Lys 2980	Leu Glu Ile 2985
Gln Ser Gln Val Asp Ser 2990	Gln His Val Gly His Ser 2995	Val Leu Thr 3000
Ala Lys Gly Met Ala Leu 3005	Phe Gly Glu Gly Lys 3010	Ala Glu Phe Thr 3015
Gly Arg His Asp Ala His 3020	Leu Asn Gly Lys Val 3025	Ile Gly Thr Leu 3030
Lys Asn Ser Leu Phe Phe 3035	Ser Ala Gln Pro Phe 3040	Glu Ile Thr Ala 3045
Ser Thr Asn Asn Glu Gly 3050	Asn Leu Lys Val Arg 3055	Phe Pro Leu Arg 3060
Leu Thr Gly Lys Ile Asp 3065	Phe Leu Asn Asn Tyr 3070	Ala Leu Phe Leu 3075
Ser Pro Ser Ala Gln Gln 3080	Ala Ser Trp Gln Val 3085	Ser Ala Arg Phe 3090
Asn Gln Tyr Lys Tyr Asn 3095	Gln Asn Phe Ser Ala 3100	Gly Asn Asn Glu 3105
Asn Ile Met Glu Ala His 3110	Val Gly Ile Asn Gly 3115	Glu Ala Asn Leu 3120
Asp Phe Leu Asn Ile Pro 3125	Leu Thr Ile Pro Glu 3130	Met Arg Leu Pro 3135
Tyr Thr Ile Ile Thr Thr 3140	Pro Pro Leu Lys Asp 3145	Phe Ser Leu Trp 3150
Glu Lys Thr Gly Leu Lys 3155	Glu Phe Leu Lys Thr 3160	Thr Lys Gln Ser 3165
Phe Asp Leu Ser Val Lys 3170	Ala Gln Tyr Lys Lys 3175	Asn Lys His Arg 3180
His Ser Ile Thr Asn Pro 3185	Leu Ala Val Leu Cys 3190	Glu Phe Ile Ser 3195

ES 2 401 645 T3

Gln Ser	Ile Lys Ser Phe	Asp Arg His Phe Glu Lys	Asn Arg Asn
3200		3205	3210
Asn Ala	Leu Asp Phe Val Thr	Lys Ser Tyr Asn Glu	Thr Lys Ile
3215		3220	3225
Lys Phe	Asp Lys Tyr Lys Ala	Glu Lys Ser His Asp	Glu Leu Pro
3230		3235	3240
Arg Thr	Phe Gln Ile Pro Gly	Tyr Thr Val Pro Val	Val Asn Val
3245		3250	3255
Glu Val	Ser Pro Phe Thr Ile	Glu Met Ser Ala Phe	Gly Tyr Val
3260		3265	3270
Phe Pro	Lys Ala Val Ser Met	Pro Ser Phe Ser Ile	Leu Gly Ser
3275		3280	3285
Asp Val	Arg Val Pro Ser Tyr	Thr Leu Ile Leu Pro	Ser Leu Glu
3290		3295	3300
Leu Pro	Val Leu His Val Pro	Arg Asn Leu Lys Leu	Ser Leu Pro
3305		3310	3315
His Phe	Lys Glu Leu Cys Thr	Ile Ser His Ile Phe	Ile Pro Ala
3320		3325	3330
Met Gly	Asn Ile Thr Tyr Asp	Phe Ser Phe Lys Ser	Ser Val Ile
3335		3340	3345
Thr Leu	Asn Thr Asn Ala Glu	Leu Phe Asn Gln Ser	Asp Ile Val
3350		3355	3360
Ala His	Leu Leu Ser Ser Ser	Ser Ser Val Ile Asp	Ala Leu Gln
3365		3370	3375
Tyr Lys	Leu Glu Gly Thr Thr	Arg Leu Thr Arg Lys	Arg Gly Leu
3380		3385	3390
Lys Leu	Ala Thr Ala Leu Ser	Leu Ser Asn Lys Phe	Val Glu Gly
3395		3400	3405
Ser His	Asn Ser Thr Val Ser	Leu Thr Thr Lys Asn	Met Glu Val
3410		3415	3420

ES 2 401 645 T3

Ser Val 3425	Ala Lys Thr Thr Lys 3430	Ala Glu Ile Pro Ile 3435	Leu Arg Met
Asn Phe 3440	Lys Gln Glu Leu Asn 3445	Gly Asn Thr Lys Ser 3450	Lys Pro Thr
Val Ser 3455	Ser Ser Met Glu Phe 3460	Lys Tyr Asp Phe Asn 3465	Ser Ser Met
Leu Tyr 3470	Ser Thr Ala Lys Gly 3475	Ala Val Asp His Lys 3480	Leu Ser Leu
Glu Ser 3485	Leu Thr Ser Tyr Phe 3490	Ser Ile Glu Ser Ser 3495	Thr Lys Gly
Asp Val 3500	Lys Gly Ser Val Leu 3505	Ser Arg Glu Tyr Ser 3510	Gly Thr Ile
Ala Ser 3515	Glu Ala Asn Thr Tyr 3520	Leu Asn Ser Lys Ser 3525	Thr Arg Ser
Ser Val 3530	Lys Leu Gln Gly Thr 3535	Ser Lys Ile Asp Asp 3540	Ile Trp Asn
Leu Glu 3545	Val Lys Glu Asn Phe 3550	Ala Gly Glu Ala Thr 3555	Leu Gln Arg
Ile Tyr 3560	Ser Leu Trp Glu His 3565	Ser Thr Lys Asn His 3570	Leu Gln Leu
Glu Gly 3575	Leu Phe Phe Thr Asn 3580	Gly Glu His Thr Ser 3585	Lys Ala Thr
Leu Glu 3590	Leu Ser Pro Trp Gln 3595	Met Ser Ala Leu Val 3600	Gln Val His
Ala Ser 3605	Gln Pro Ser Ser Phe 3610	His Asp Phe Pro Asp 3615	Leu Gly Gln
Glu Val 3620	Ala Leu Asn Ala Asn 3625	Thr Lys Asn Gln Lys 3630	Ile Arg Trp
Lys Asn 3635	Glu Val Arg Ile His 3640	Ser Gly Ser Phe Gln 3645	Ser Gln Val

ES 2 401 645 T3

Glu Leu Ser Asn Asp Gln Glu Lys Ala His Leu Asp Ile Ala Gly
 3650 3655 3660
 Ser Leu Glu Gly His Leu Arg Phe Leu Lys Asn Ile Ile Leu Pro
 3665 3670 3675
 Val Tyr Asp Lys Ser Leu Trp Asp Phe Leu Lys Leu Asp Val Thr
 3680 3685 3690
 Thr Ser Ile Gly Arg Arg Gln His Leu Arg Val Ser Thr Ala Phe
 3695 3700 3705
 Val Tyr Thr Lys Asn Pro Asn Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Pro Val
 3710 3715 3720
 Lys Val Leu Ala Asp Lys Phe Ile Thr Pro Gly Leu Lys Leu Asn
 3725 3730 3735
 Asp Leu Asn Ser Val Leu Val Met Pro Thr Phe His Val Pro Phe
 3740 3745 3750
 Thr Asp Leu Gln Val Pro Ser Cys Lys Leu Asp Phe Arg Glu Ile
 3755 3760 3765
 Gln Ile Tyr Lys Lys Leu Arg Thr Ser Ser Phe Ala Leu Asn Leu
 3770 3775 3780
 Pro Thr Leu Pro Glu Val Lys Phe Pro Glu Val Asp Val Leu Thr
 3785 3790 3795
 Lys Tyr Ser Gln Pro Glu Asp Ser Leu Ile Pro Phe Phe Glu Ile
 3800 3805 3810
 Thr Val Pro Glu Ser Gln Leu Thr Val Ser Gln Phe Thr Leu Pro
 3815 3820 3825
 Lys Ser Val Ser Asp Gly Ile Ala Ala Leu Asp Leu Asn Ala Val
 3830 3835 3840
 Ala Asn Lys Ile Ala Asp Phe Glu Leu Pro Thr Ile Ile Val Pro
 3845 3850 3855
 Glu Gln Thr Ile Glu Ile Pro Ser Ile Lys Phe Ser Val Pro Ala
 3860 3865 3870
 Gly Ile Val Ile Pro Ser Phe Gln Ala Leu Thr Ala Arg Phe Glu

ES 2 401 645 T3

3875	3880	3885
Val Asp Ser Pro Val Tyr Asn Ala Thr Trp Ser Ala Ser Leu Lys 3890 3895 3900		
Asn Lys Ala Asp Tyr Val Glu Thr Val Leu Asp Ser Thr Cys Ser 3905 3910 3915		
Ser Thr Val Gln Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Asn Val Leu Gly Thr 3920 3925 3930		
His Lys Ile Glu Asp Gly Thr Leu Ala Ser Lys Thr Lys Gly Thr 3935 3940 3945		
Leu Ala His Arg Asp Phe Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Lys 3950 3955 3960		
Phe Glu Gly Leu Gln Glu Trp Glu Gly Lys Ala His Leu Asn Ile 3965 3970 3975		
Lys Ser Pro Ala Phe Thr Asp Leu His Leu Arg Tyr Gln Lys Asp 3980 3985 3990		
Lys Lys Gly Ile Ser Thr Ser Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr 3995 4000 4005		
Val Gly Met Asp Met Asp Glu Asp Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn 4010 4015 4020		
Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln Ser Ser Pro Asp Lys Lys Leu Thr Ile 4025 4030 4035		
Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val Arg Glu Ser Asp Glu Glu Thr Gln 4040 4045 4050		
Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu Ala Ala Ser Gly Leu Leu Thr 4055 4060 4065		
Ser Leu Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala Thr Gly Val Leu Tyr Asp 4070 4075 4080		
Tyr Val Asn Lys Tyr His Trp Glu His Thr Gly Leu Thr Leu Arg 4085 4090 4095		
Glu Val Ser Ser Lys Leu Arg Arg Asn Leu Gln Asn Asn Ala Glu 4100 4105 4110		

ES 2 401 645 T3

Trp Val	Tyr Gln Gly Ala Ile	Arg Gln Ile Asp Asp	Ile Asp Val
4115	4120	4125	
Arg Phe	Gln Lys Ala Ala Ser	Gly Thr Thr Gly Thr	Tyr Gln Glu
4130	4135	4140	
Trp Lys	Asp Lys Ala Gln Asn	Leu Tyr Gln Glu Leu	Leu Thr Gln
4145	4150	4155	
Glu Gly	Gln Ala Ser Phe Gln	Gly Leu Lys Asp Asn	Val Phe Asp
4160	4165	4170	
Gly Leu	Val Arg Val Thr Gln	Lys Phe His Met Lys	Val Lys His
4175	4180	4185	
Leu Ile	Asp Ser Leu Ile Asp	Phe Leu Asn Phe Pro	Arg Phe Gln
4190	4195	4200	
Phe Pro	Gly Lys Pro Gly Ile	Tyr Thr Arg Glu Glu	Leu Cys Thr
4205	4210	4215	
Met Phe	Ile Arg Glu Val Gly	Thr Val Leu Ser Gln	Val Tyr Ser
4220	4225	4230	
Lys Val	His Asn Gly Ser Glu	Ile Leu Phe Ser Tyr	Phe Gln Asp
4235	4240	4245	
Leu Val	Ile Thr Leu Pro Phe	Glu Leu Arg Lys His	Lys Leu Ile
4250	4255	4260	
Asp Val	Ile Ser Met Tyr Arg	Glu Leu Leu Lys Asp	Leu Ser Lys
4265	4270	4275	
Glu Ala	Gln Glu Val Phe Lys	Ala Ile Gln Ser Leu	Lys Thr Thr
4280	4285	4290	
Glu Val	Leu Arg Asn Leu Gln	Asp Leu Leu Gln Phe	Ile Phe Gln
4295	4300	4305	
Leu Ile	Glu Asp Asn Ile Lys	Gln Leu Lys Glu Met	Lys Phe Thr
4310	4315	4320	
Tyr Leu	Ile Asn Tyr Ile Gln	Asp Glu Ile Asn Thr	Ile Phe A sn
4325	4330	4335	

ES 2 401 645 T3

Asp Tyr	Ile Pro Tyr Val	Phe	Lys Leu Leu Lys	Glu	Asn Leu Cys
4340		4345		4350	
Leu Asn	Leu His Lys Phe	Asn	Glu Phe Ile Gln	Asn	Glu Leu Gln
4355		4360		4365	
Glu Ala	Ser Gln Glu Leu	Gln	Gln Ile His Gln	Tyr	Ile Met Ala
4370		4375		4380	
Leu Arg	Glu Glu Tyr Phe	Asp	Pro Ser Ile Val	Gly	Trp Thr Val
4385		4390		4395	
Lys Tyr	Tyr Glu Leu Glu	Glu	Lys Ile Val Ser	Leu	Ile Lys Asn
4400		4405		4410	
Leu Leu	Val Ala Leu Lys	Asp	Phe His Ser Glu	Tyr	Ile Val Ser
4415		4420		4425	
Ala Ser	Asn Phe Thr Ser	Gln	Leu Ser Ser Gln	Val	Glu Gln Phe
4430		4435		4440	
Leu His	Arg Asn Ile Gln	Glu	Tyr Leu Ser Ile	Leu	Thr Asp Pro
4445		4450		4455	
Asp Gly	Lys Gly Lys Glu	Lys	Ile Ala Glu Leu	Ser	Ala Thr Ala
4460		4465		4470	
Gln Glu	Ile Ile Lys Ser	Gln	Ala Ile Ala Thr	Lys	Lys Ile Ile
4475		4480		4485	
Ser Asp	Tyr His Gln Gln	Phe	Arg Tyr Lys Leu	Gln	Asp Phe Ser
4490		4495		4500	
Asp Gln	Leu Ser Asp Tyr	Tyr	Glu Lys Phe Ile	Ala	Glu Ser Lys
4505		4510		4515	
Arg Leu	Ile Asp Leu Ser	Ile	Gln Asn Tyr His	Thr	Phe Leu Ile
4520		4525		4530	
Tyr Ile	Thr Glu Leu Leu	Lys	Lys Leu Gln Ser	Thr	Thr Val Met
4535		4540		4545	
Asn Pro	Tyr Met Lys Leu	Ala	Pro Gly Glu Leu	Thr	Ile Ile Leu
4550		4555		4560	

ES 2 401 645 T3

<210> 2
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
1          5          10          15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
20          25          30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
35          40          45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
50          55          60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
65          70          75          80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
85          90          95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
100         105         110

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
115         120         125

Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
130         135         140

Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Le u Arg
145         150         155         160

Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
165         170         175

Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Gl u Arg Gly Leu
180         185         190

Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
195         200         205

Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gl n Pro Leu Gln Glu Arg
210         215         220
```

ES 2 401 645 T3

Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
225 230 235 240

Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Gl u Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
245 250 255

Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
260 265 270

Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
275 280 285

Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
290 295 300

Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
305 310 315

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> construcción sintética

<400> 3

Glu Asn Phe Ala Gly Glu Ala Thr Leu Gln Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Uso de apolipoproteína B en un ensayo para la detección de la formación de PrP^{Sc} en una muestra.
2. Uso de apolipoproteína B en un ensayo de cribado para la identificación de compuestos que modulan la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}.
- 5 3. Uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la apolipoproteína B forma un complejo con el receptor de LDL.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ensayo es un ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA).
- 10 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ensayo es un ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) en el que se usa homogenado cerebral normal como fuente de PrP^C normal y sustrato.
6. Uso según las reivindicaciones de la 1 a la 5, en el que el ensayo es un ensayo de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA) en el que se usan balsas lipídicas de la línea celular de neuroblastoma N2a sensible a infección como fuente de PrP^C normal y sustrato.
- 15 7. Uso de un anticuerpo producido contra la apolipoproteína B para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad priónica.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad priónica es la encefalopatía espongiforme bovina (EEB).
9. Uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad priónica es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).
- 20 10. Método para el diagnóstico o la detección de una enfermedad priónica en un sujeto que se sospecha sufre una enfermedad de este tipo, que comprende (i) poner una muestra de dicho sujeto en contacto con apolipoproteína B; (ii) poner la muestra obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra.
11. Método para la determinación de un marcador que predisponga a un sujeto a una enfermedad priónica, que comprende (i) medir el nivel de apolipoproteína B en una muestra; y (ii) correlacionar dicho nivel de proteína obtenido en dicha etapa de medición con la presencia de una enfermedad priónica.
- 25 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, en el que la enfermedad priónica es la encefalopatía espongiforme bovina (EEB).
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, en el que la enfermedad priónica es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- 30 14. Método para la detección de PrP^{Sc} en una muestra, comprendiendo el ensayo (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B; (ii) poner la muestra obtenida en (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra.
- 35 15. Método para identificar en una muestra un compuesto que modula la transición de PrP^C a PrP^{Sc}, que comprende: (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B (a) en presencia de dicho compuesto modulador y (b) en ausencia de dicho compuesto; (ii) poner las mezclas obtenidas en las etapas (i)a y (i)b en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C; y (iii) determinar la cantidad de PrP^{Sc} (a) en presencia de dicho compuesto modulador y (b) en ausencia de dicho compuesto modulador.
- 40 16. Método para la detección de PrP^{Sc} en una muestra, comprendiendo el ensayo (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B; (ii) poner la mezcla obtenida en la etapa (i) en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C; y (iii) determinar la presencia y/o cantidad de PrP^{Sc} en dicha muestra.
- 45 17. Ensayo de cribado para identificar un compuesto que modula la transición de PrP^C a PrP^{Sc}, que comprende: (i) poner dicha muestra en contacto con apolipoproteína B (a) en presencia de dicho compuesto modulador y (b) en ausencia de dicho compuesto modulador; (ii) poner las mezclas obtenidas en las etapas (i)a y (i)b en contacto con PrP^C o mezclas que contienen PrP^C; y (iii) determinar la cantidad de PrP^{Sc} (a) en presencia de dicho compuesto y (b) en ausencia de dicho compuesto modulador.

Figura 1

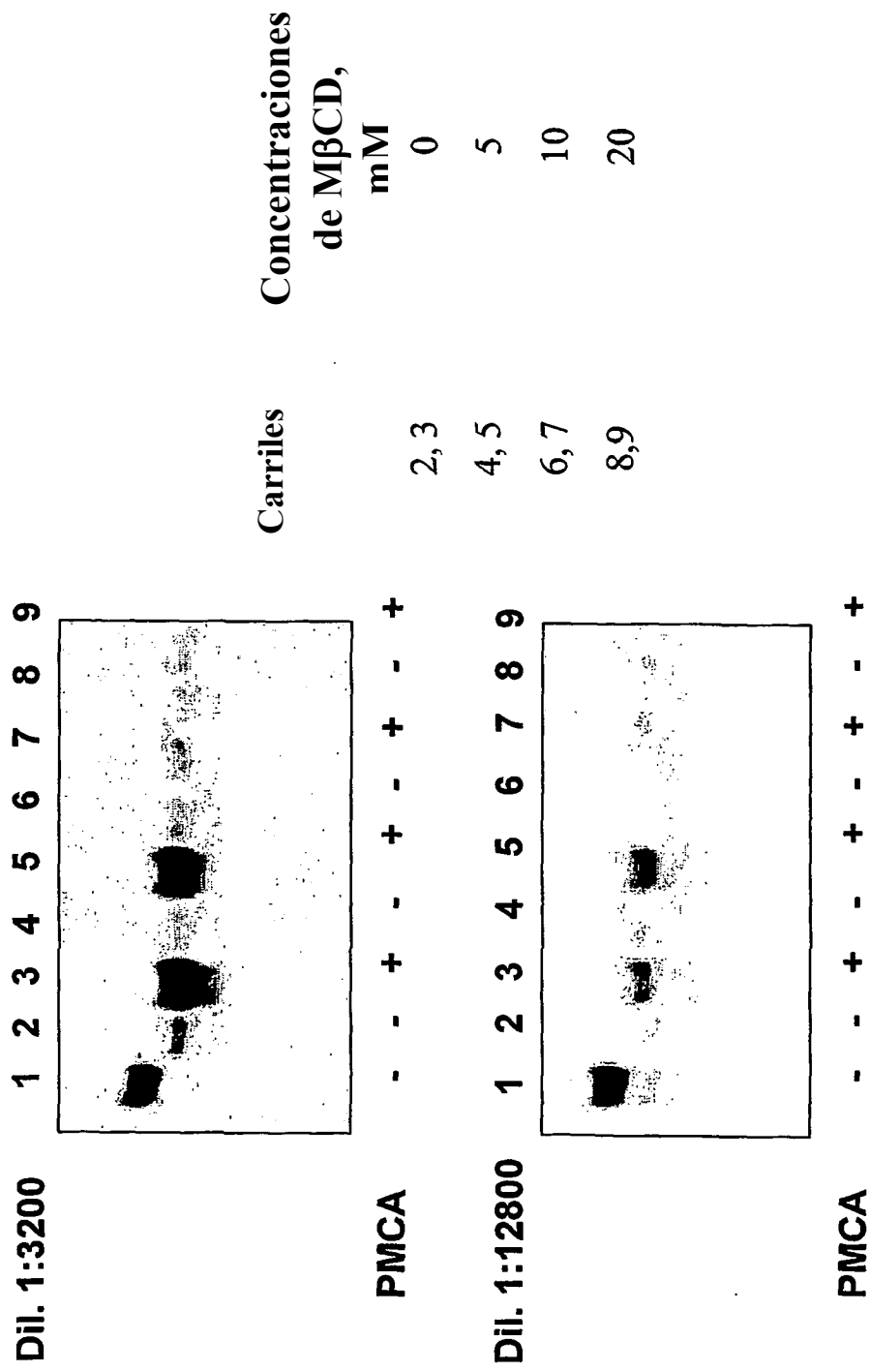


Figura 2A

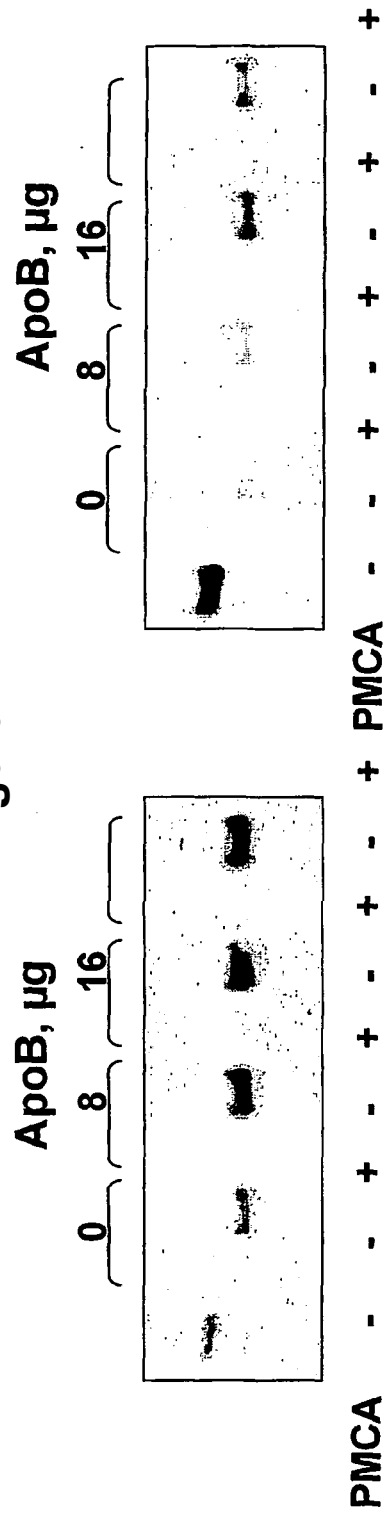


Figura 2B

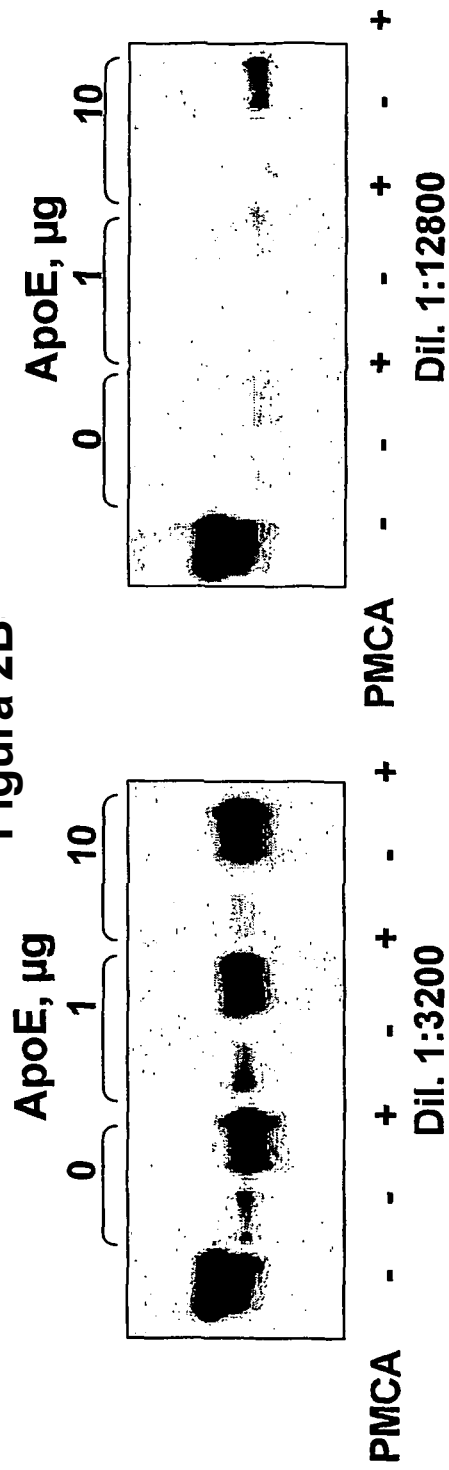


Figura 2C

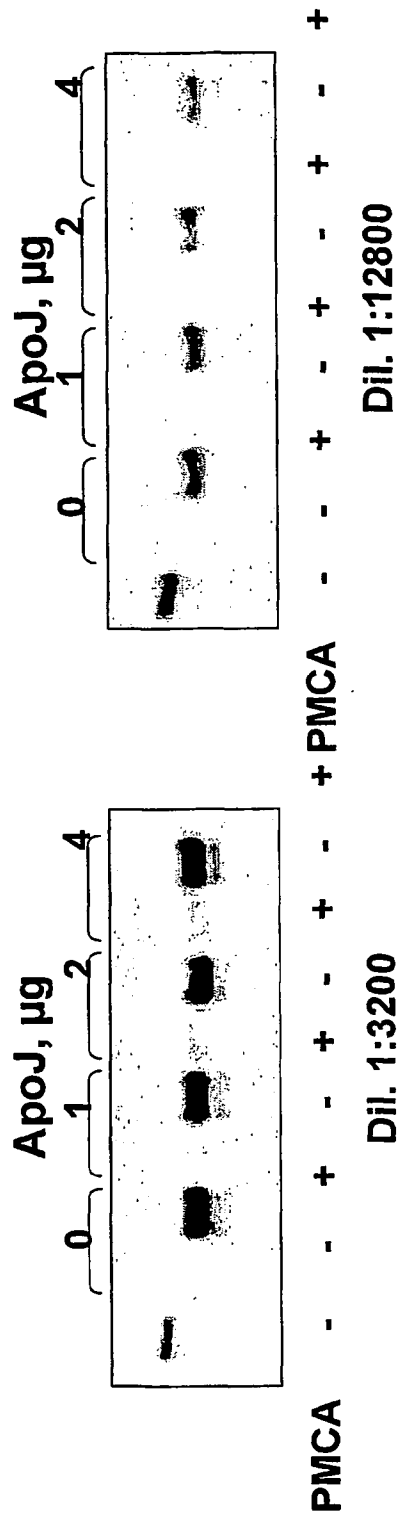


Figura 3

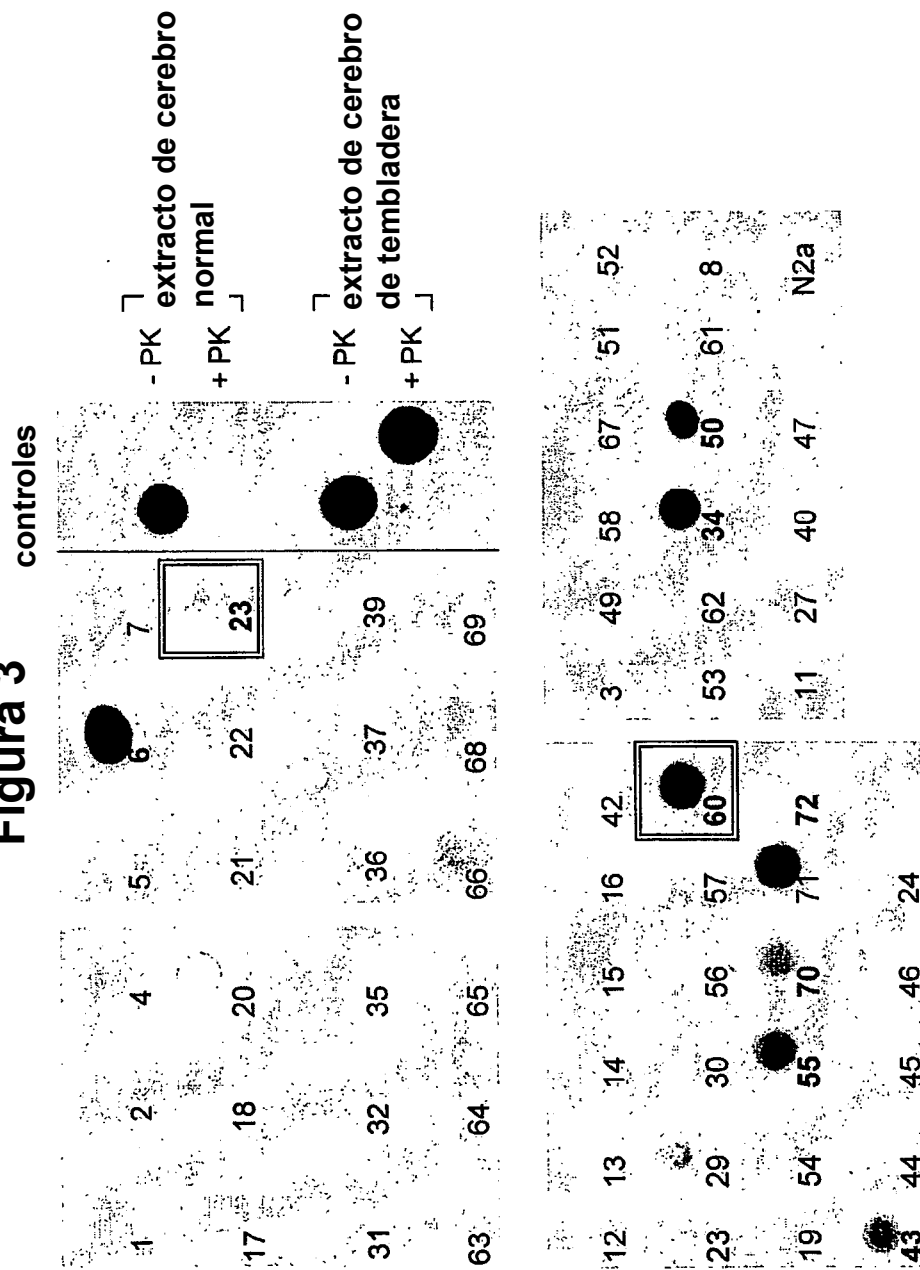


Figura 4

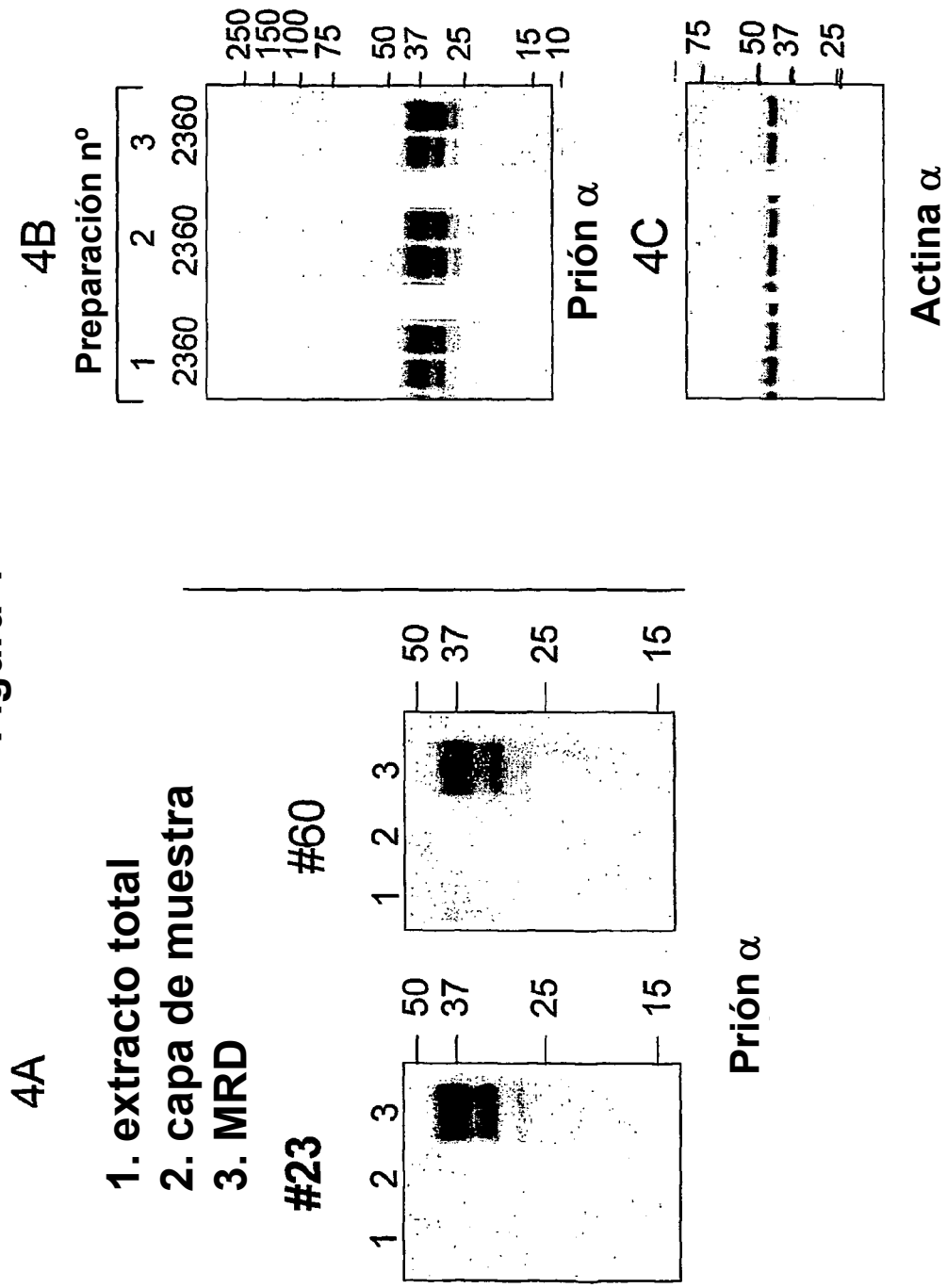


Figura 5

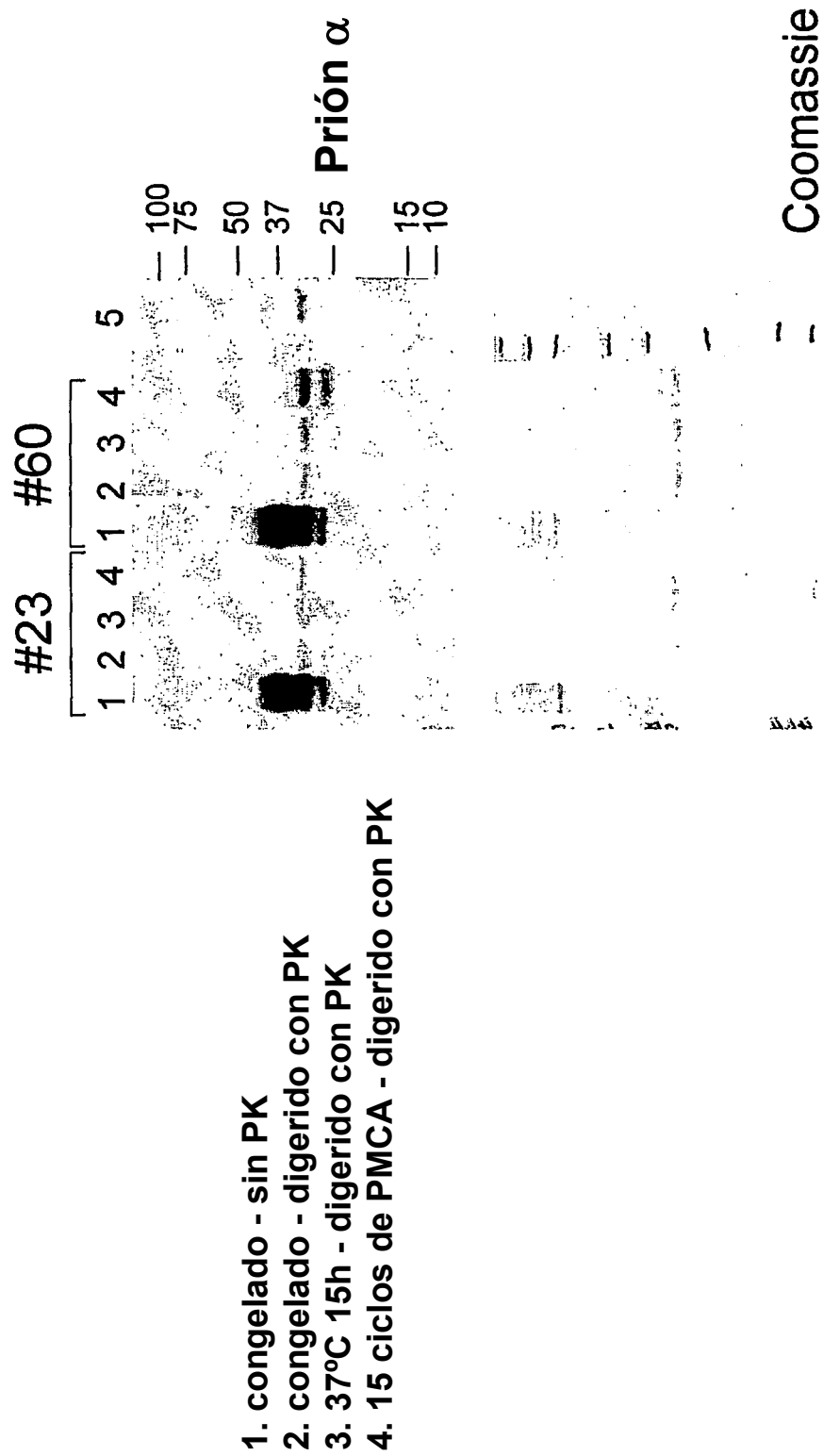


Figura 6

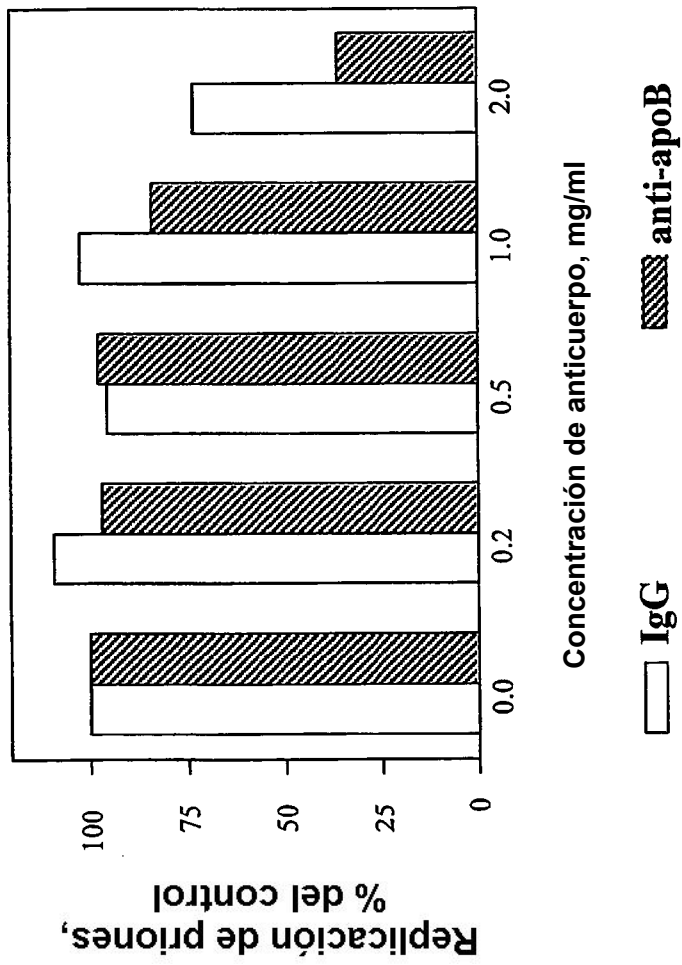


Figura 7

Figure 7

