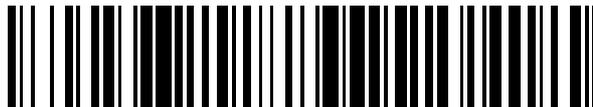


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 940**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)
C07K 7/08	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)
A61K 31/16	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2006 E 06814415 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1931695**

54 Título: **Reactivos de peptoide específicos para prión**

30 Prioridad:

09.09.2005 US 715761 P
14.10.2005 US 726686 P
13.01.2006 US 758934 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4002 Basel, CH

72 Inventor/es:

PERETZ, DAVID;
CONNOLLY, MICHAEL, D.;
ZUCKERMANN, RONALD;
GAO, MAN;
SHIMIZU, ROBERT, M. y
TIMOTEO, GULLIVER

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 404 940 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Reactivos de peptoide específicos para prión

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a reactivos de peptoide útiles en detectar y aislar priones, y en el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con priones. La invención también se refiere a complejos y composiciones que comprenden los reactivos de peptoide. También se desvelan procedimientos para preparar los reactivos de peptoide, y kits que los contienen.

ANTECEDENTES

La proteína priónica (PrP^C) es una proteína de 33-35 kD de función incierta y, en seres humanos, es transcrita por un gen sobre el brazo corto del cromosoma 20. El núcleo resistente a proteasas de 27-30 kD (prión, proteína de tembladera, o PrP^{Sc}) es el componente funcional, con varias isoformas responsables de "enfermedades por priones" que son enfermedades conformacionales de proteínas.

Las enfermedades conformacionales de proteínas se producen a partir de la transición conformacional anómala de una proteína (una proteína de enfermedad conformacional tal como PrP^C), que a su vez conduce a la auto-asociación de las formas de proteína anómalas (por ejemplo, PrP^{Sc}) produciendo deposición y lesión de tejido. Los priones (PrP^{Sc}) tienen una conformación de hoja sustancialmente plegada en vez de la estructura de hélice α de PrP^C normal, carecen de ácido nucleico detectable y generalmente no provocan una respuesta inmunitaria. En general, las enfermedades conformacionales de proteínas comparten similitudes sorprendentes en las presentaciones clínicas, normalmente una rápida progresión del diagnóstico a la muerte tras duraciones variables de incubación.

En seres humanos, las enfermedades por priones, también conocidas como "encefalopatías espongiformes transmisibles" (EET), incluyen, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), insomnio familiar letal y kuru (véase, por ejemplo, Isselbacher y col., eds. (1994). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Nueva York: McGraw-Hill, Inc.; Medori y col. (1992) *N. Engl. J. Med.* 326: 444-9). En animales, las EET incluyen tembladera de las ovejas, encefalopatía espongiforme bovina (EEB), encefalopatía transmisible del visón y enfermedad debilitante crónica de reno y alce cautivo (Gajdusek, (1990). *Subacute Spongiform Encephalopathies: Transmissible Cerebral Amyloidoses Caused by Unconventional Viruses*. En: *Virology*, Fields, ed., Nueva York: Raven Press, Ltd. (pág. 2289-2324)). Las encefalopatías espongiformes transmisibles se caracterizan por los mismos distintivos: la presencia de la conformación anormal (resistente a proteinasa K rica en beta) de la proteína priónica que transmite la enfermedad cuando se inocula experimentalmente en animales de laboratorio que incluyen primates, roedores y ratones transgénicos.

Recientemente, la rápida propagación de EEB y su correlación con elevada manifestación de EET en seres humanos ha conducido a aumentar el interés en la detección de EET en mamíferos no humanos. Las trágicas consecuencias de la transmisión accidental de estas enfermedades (véase, por ejemplo, Gajdusek, *Infectious Amyloids, and Prusiner Prions In Fields Virology*, Fields, y col., eds. Philadelphia: Lippincott-Ravin, Pub. (1996); Brown y col., *Lancet*, 340: 24-27 (1992)), dificultades de descontaminación (Asher y col. (1986) en: *Laboratory Safety: Principles and Practices*, Miller ed., (pág. 59-71) *Am. Soc. Micro.*) y la preocupación sobre EEB (*British Med. J.* (1995) 311: 1415-1421) son la base de la urgencia de tener tanto una prueba de diagnóstico que identificaría seres humanos y animales con EET como terapias para sujetos infectados.

Los priones se diferencian significativamente de las bacterias, virus y viroides. La hipótesis dominante es que, a diferencia de todos los otros patógenos infecciosos, la infección es producida por una conformación anormal de la proteína priónica, que actúa de molde y convierte conformaciones priónicas normales en conformaciones anómalas. Una proteína priónica se caracterizó por primera vez a principios de los 80 (véase, por ejemplo, Bolton, McKinley y col. (1982) *Science* 218: 1309-1311; Prusiner, Bolton y col. (1982) *Biochemistry* 21: 6942-6950; McKinley, Bolton y col. (1983) *Cell* 35: 57-62). Desde entonces se han clonado, secuenciado y expresado genes que codifican la proteína priónica completa en animales transgénicos (véase, por ejemplo, Basler, Oesch y col. (1986) *Cell* 46: 417-428.)

La característica clave de las enfermedades por priones es la formación de la proteína anormalmente moldeada (PrP^{Sc}) de la forma normal de la proteína priónica (celular o no patógena o PrP^C) (véase, por ejemplo, Zhang y col. (1997) *Biochem.* 36(12): 3543-3553; Cohen & Prusiner (1998) *Ann. Rev. Biochem.* 61: 793-819; Pan y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10962-10966; Safar y col. (1993) *J Biol. Chem.* 268: 20276-20284.) La sustancial estructura de hoja β de PrP^{Sc} con respecto a las formas de no enfermedad plegadas predominantemente de hélice α de PrP^C ha sido revelada por estudios de espectroscopía óptica y cristalografía (véase, por ejemplo, Wille y col. (2001) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 99: 3563-3568; Peretz y col. (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 614-622; Cohen & Prusiner, (1999) 5: *Structural Studies of Prion Proteins*. En *Prion Biology And Diseases*, S. Prusiner, ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (pág: 191-228). Los cambios estructurales parecen ir seguidos de

alteraciones en las propiedades bioquímicas: PrP^C es soluble en detergentes no desnaturizantes, PrP^{Sc} es insoluble; PrP^C es fácilmente digerida por proteasas, mientras que PrP^{Sc} es parcialmente resistente, produciendo la formación de un fragmento truncado del extremo amino conocido como "PrPres" (Baldwin y col. (1995); Cohen & Prusiner (1995)), forma "PrP 27-30" (27-30 kDa) o "resistente a PK" (resistente a proteinasa K). Adicionalmente, la PrP^{Sc} puede convertir PrP^C en la conformación patógena. Véase, por ejemplo, Kaneko y col. (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 92:11160-11164; Caughey (2003) *Br Med Bull.* 66: 109 - 20.

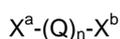
La detección de las isoformas patógenas de proteínas de enfermedades conformacionales en sujetos vivos, y muestras obtenidas de sujetos vivos, ha demostrado ser difícil. Por tanto, el diagnóstico definitivo y los tratamientos paliativos para estas afecciones transmisibles y que contienen amiloides antes de la muerte del sujeto sigue siendo un reto sustancialmente sin satisfacer. El examen histopatológico de biopsias de cerebro es arriesgado para el sujeto y lesiones y depósitos amiloides pueden perderse dependiendo de dónde se tome la muestra de biopsia. Por tanto, todavía hay riesgos involucrados con las biopsias para animales, pacientes y personal sanitario. Además, los resultados de pruebas del cerebro en animales no se obtienen normalmente hasta que el animal ha entrado en el suministro de alimentos. Por tanto, normalmente, los anticuerpos generados contra péptidos priónicos reconocen tanto PrP^{Sc} desnaturizado como PrP^C, pero no pueden reconocer selectivamente PrP^{Sc} infeccioso (sin desnaturizar) (véase, por ejemplo, Matsunaga y col. (2001) *Proteins: Structure, Function and Genetics* 44: 110-118).

Están disponibles varias pruebas para EET (véase, Soto, C. (2004) *Nature Reviews Microbiol.* 2:809, Biffiger y col. (2002) *J. Virol. Meth.* 101:79; Safar y col. (2002) *Nature Biotech.* 20:1147, Schaller y col. *Acta Neuropathol.* (1999) 98:437, Lane y col. (2003) *Clin. Chem.* 49:1774). Sin embargo, todas éstas utilizan muestras de tejido de cerebro y sólo son adecuadas como pruebas de autopsia. La mayoría de éstas también requieren tratamiento con proteinasa K de las muestras, que puede requerir tiempo, la digestión incompleta de PrP^C puede conducir a resultados positivos falsos, y la digestión de PrP^{Sc} sensible a PK puede producir resultados negativos falsos.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de composiciones y procedimientos para detectar la presencia de las proteínas priónicas patógenas en diversas muestras, por ejemplo, en muestras obtenidas de sujetos vivos, en suministros de sangre, en animales de granja y en otros suministros de alimentos humanos y animales. También sigue existiendo una necesidad de procedimientos y composiciones para diagnosticar y tratar enfermedades relacionadas con priones. La presente invención se refiere a éstos, además de a otros fines importantes.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a reactivos de peptoide que interactúan con una proteína de enfermedad conformacional tal como una proteína priónica, preferencialmente con una forma patógena con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional, que tiene una fórmula de:



en la que:

cada Q es independientemente un aminoácido o una glicina N-sustituida, y -(Q)_n- define una región de peptoide; en la que dicha región de peptoide -(Q)_n- comprende SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 ó 241.

X^a es H, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, acilo (C₁-C₆), aminoacilo (C₁₋₆), un aminoácido, un grupo protector de amino, o un polipéptido de 2 a 100 aminoácidos, en la que X^a está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador;

X^b es H, alquilo (C₁-C₆), arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, ariloxi, aralcoxi, un grupo protector de carboxi, un aminoácido, o un polipéptido de 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, en la que X^b está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.

La presente invención también se refiere a reactivos de peptoide que son poliiónicos y tienen una carga neta a pH fisiológicamente relevante. En algunas realizaciones, los reactivos de peptoide tienen una carga positiva neta a pH fisiológicamente relevante, tal como una carga de al menos 3+ o al menos 4+. La carga neta puede surgir de una o más glicinas N-sustituidas de la región de peptoide.

La presente invención se refiere además a un reactivo de peptoide que interactúa preferencialmente con una forma patógena de una proteína de enfermedad conformacional con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional, en el que el reactivo comprende una región del extremo amino, una región del extremo carboxi y al menos una región de peptoide entre la región del extremo amino y la región del extremo carboxi, en el que la región de peptoide comprende 3 a aproximadamente 30 glicinas N-sustituidas y opcionalmente

uno o más aminoácidos, como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona además un reactivo de peptoide que interacciona preferencialmente con una forma patógena de una proteína de enfermedad conformacional con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional, en el que el reactivo comprende una región de peptoide que comprende 3 a 15 glicinas N-sustituidas contiguas como se define en las reivindicaciones, y en el que la región de peptoide tiene una carga neta a pH fisiológicamente relevante. En algunas realizaciones, la carga neta es una carga positiva neta tal como una carga neta de al menos 3+ o al menos 4+ a pH fisiológicamente relevante. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide tiene una carga neta de 2+ a 6+, 3+ a 5+, o 4+ a pH fisiológicamente relevante.

Los reactivos de peptoide de la invención pueden usarse en un amplio intervalo de aplicaciones que incluyen como herramientas para aislar priones patógenos o para detectar priones patógenos en una muestra, como componentes de una composición terapéutica o profiláctica y/o para generar anticuerpos específicos para príon. Por ejemplo, los reactivos de peptoide que interaccionan preferencialmente con PrP^{Sc} con respecto a PrP^C son útiles para la detección directa de formas patógenas en muestras obtenidas de sujetos vivos o que vivieron alguna vez, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad o para cribar muestras de sangre donadas o cribar órganos para la donación de órganos. Los reactivos de peptoide de la invención pueden usarse para unirse específicamente a cualquier PrP^{Sc} en la muestra formando un complejo. El complejo puede detectarse directamente mediante procedimientos tales como espectroscopía de UV/visible, FTIR, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía Raman, espectrometría de masas, HPLC, electroforesis capilar, espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales, sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS), o puede detectarse por la unión de reactivos específicos para príon adicionales (por ejemplo, un segundo reactivo de peptoide o un reactivo de unión a príon (como se define en el presente documento)) al PrP^{Sc} en el complejo o después de la disociación del complejo.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de la presencia de un príon patógeno en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un complejo, y detectar la formación del complejo, formación del complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

El procedimiento de detección de príon patógeno en una muestra también puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, poner en contacto el primer complejo con un segundo reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

En otra realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer cualquier muestra sin unir, poner en contacto el primer complejo con un segundo reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. El primer reactivo de peptoide comprende opcionalmente un soporte sólido que ayuda en la separación del primer complejo de la muestra sin unir.

Además, el procedimiento de detección de la invención puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un segundo reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

El procedimiento de detección de príon patógeno en una muestra también puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, poner en contacto el primer complejo con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

En otra realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está

5 presente, para formar un primer complejo, extraer cualquier muestra sin unir, poner en contacto el primer complejo con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. El primer reactivo de peptoide comprende opcionalmente un soporte sólido que ayuda en la separación del primer complejo de la muestra sin unir.

10 Además, el procedimiento de detección de la invención puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

15 En otra realización, el procedimiento de detección de la invención puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un reactivo de unión a príon en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo usando un segundo reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

20 Además, el procedimiento de detección puede comprender poner en contacto la muestra con un reactivo de unión a príon en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, poner en contacto el complejo con un reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de peptoide al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. El reactivo de unión a príon se proporciona opcionalmente sobre un soporte sólido. Aún adicionalmente, el procedimiento de detección puede comprender proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de la invención, combinar el soporte sólido con un ligando detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del ligando detectablemente marcado al reactivo de peptoide, en el que el reactivo de peptoide del soporte tiene una afinidad de unión más débil por el ligando que por el príon patógeno, para formar un primer complejo, combinar la muestra con el primer complejo en condiciones que permitan la unión del príon patógeno, si está presente en la muestra, al reactivo de peptoide del primer complejo, sustituyendo así el ligando detectablemente marcado del primer complejo y formando un segundo complejo que comprende el reactivo de peptoide y el príon patógeno, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

25 La presente invención proporciona además procedimientos para detectar la presencia de un príon patógeno en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un complejo, extraer la muestra sin unir del complejo, disociar el príon patógeno del complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un segundo soporte sólido en condiciones que permitan que el príon patógeno disociado se adhiera al segundo soporte sólido; y detectar el príon patógeno disociado adherido usando un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en el que la unión del reactivo de unión a príon indica la presencia del príon patógeno. En algunas realizaciones, la disociación se lleva a cabo exponiendo el complejo a pH alto o pH bajo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de neutralizar el pH alto o el pH bajo después de la disociación. En algunas realizaciones, el príon patógeno disociado está desnaturalizado.

30 La presente invención proporciona además procedimientos para detectar la presencia de un príon patógeno en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir del primer complejo, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un segundo soporte sólido, en el que el segundo soporte sólido comprende un primer anticuerpo antipríónico, en condiciones que permitan que el príon patógeno disociado se una al primer anticuerpo antipríónico para formar un segundo complejo; y detectar el príon patógeno disociado del segundo complejo con un segundo anticuerpo antipríónico, opcionalmente detectablemente marcado, en el que la unión del segundo anticuerpo antipríónico indica la presencia del príon patógeno. En algunas realizaciones, la disociación se lleva a cabo exponiendo el primer complejo a pH alto o pH bajo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de neutralizar el pH alto o el pH bajo después de la disociación. En otras realizaciones, el príon patógeno disociado está desnaturalizado.

En todos los procedimientos anteriores que utilizan reactivos de unión a príon, los reactivos de unión a príon pueden ser, por ejemplo, anticuerpos antipríónicos.

También se describen procedimientos para tratar o prevenir infección relacionada con priones en animales.

La invención se refiere adicionalmente a la detección o aislamiento de príon en una muestra.

La invención se refiere adicionalmente a proporcionar un suministro de una muestra sustancialmente libre de priones tal como sangre o comida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Detección por ELISA de PrP^C en muestras de plasma humano. La Figura 1A muestra mediciones de ELISA (URL) para cantidades crecientes de plasma. La Figura 1B muestra una curva patrón para mediciones de ELISA (URL) usando cantidades conocidas de proteína PrP recombinante.

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

Figura 3. Esta figura representa un alineamiento de proteínas priónicas de ser humano (SEC ID N°:3), hámster sirio (hámster) (SEC ID N°:4), bovino (SEC ID N°:5), oveja (SEC ID N°:6), ratón (SEC ID N°:7), alce (SEC ID N°: 8), gamo (SEC ID N°:9), ciervo mulo (mulo) (SEC ID N°:10) y venado de cola blanca (blanco) (SEC ID N°:11). Alce, gamo, ciervo mulo y venado de cola blanca sólo varían entre sí en dos residuos, S/N128 y Q/E226 (mostrados en negrita).

Figura 4. Esta figura representa perfiles de desnaturalización de vECJ y sECJ.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Los siguientes términos seleccionados se tratarán en el contexto usado en el presente documento. Formas tanto en plural como en singular de un término están incluidas independientemente de la forma tratada.

“Príon”, “proteína priónica” “proteína PrP” y “PrP” se usan indistintamente para referirse a tanto la forma de la proteína priónica patógena (también denominada proteína de la tembladera, forma de proteína patógena, isoforma patógena, príon patógeno y PrP^{Sc}) como la forma de príon no patógeno (también denominada forma de proteína celular, isoforma celular, isoforma no patógena, proteína priónica no patógena y PrP^C), además de la forma desnaturalizada y diversas formas recombinantes de la proteína priónica que pueden no tener ni la conformación patógena ni la conformación celular normal. “Proteína de enfermedad conformacional” se refiere a las formas de proteína patógena y no patógena de una proteína asociada a una enfermedad conformacional en la que la estructura de la proteína ha cambiado (por ejemplo, desplegado o agregado), produciendo una conformación anormal tal como polimerización de fibrillas o de amiloides no deseada en el contexto de hoja plegada beta. Proteínas de enfermedad conformacional de ejemplo incluyen proteínas priónicas tales como PrP^{Sc} y PrP^C y variaciones de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (VL), el componente de proteína de la molécula de anticuerpo, que están asociados a enfermedades conformacionales tales como amiloidosis. Una lista de enfermedades con proteínas asociadas que asumen dos o más conformaciones diferentes se muestra a continuación.

Enfermedad	Proteína(s) de enfermedades conformacionales
Enfermedades por priones (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, tembladera, encefalopatía espongiforme bovina)	PrP ^{Sc}
Enfermedad de Alzheimer	APP, péptido A*, *1-antiquimotripsina, tan, componente no A*
ELA	SOD y neurofilamento
Enfermedad de Pick	Cuerpo de Pick
Enfermedad de Parkinson	Cuerpo de Lewy
Diabetes tipo 1	Amilina
Mieloma múltiple - discrasias de células plasmáticas	Cadena de IgGL
Polineuropatía amiloidótica familiar	Transtiretina
Carcinoma medular de tiroides	Procalcitonina
Insuficiencia renal crónica	Beta2-microglobulina
Insuficiencia cardíaca congestiva	Factor natriurético auricular
Amiloidosis cardíaca senil y sistémica	Transtiretina
Inflamación crónica	amiloide A del suero

Enfermedad	Proteína(s) de enfermedades conformacionales
Aterosclerosis	ApoA1
Amiloidosis familiar	Gelsolina

El uso de los términos “prión” “proteína priónica” “proteína PrP” “PrP” o “proteína de enfermedad conformacional” no pretende limitarse a polipéptidos que tienen las secuencias exactas a aquellas descritas en el presente documento. Es fácilmente evidente que los términos engloban proteínas de enfermedades conformacionales de cualquiera de las especies identificadas o sin identificar (por ejemplo, humana, bovina) o enfermedades (por ejemplo, Alzheimer, Parkinson, etc.). Véanse, por tanto, las solicitudes de patente del mismo solicitante nº de serie de EE.UU. 10/917.646, presentada el 13 de agosto de 2004, nº de serie de EE.UU. 11/056.950, presentada el 11 de febrero de 2005 y solicitud internacional PCT/US2004/026363, presentada el 13 de agosto de 2004, todas tituladas “Reactivos de péptido específicos para prión”. Un experto habitual en la materia en vista de las enseñanzas de la presente divulgación y la materia puede determinar regiones correspondientes a las secuencias desveladas en el presente documento en cualquier otra proteína priónica, usando, por ejemplo, programas de comparación de secuencias (por ejemplo, herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos (BLAST)) o identificación y alineamiento de características o motivos estructurales.

“Patógeno” significa que la proteína produce en realidad la enfermedad, o la proteína está asociada a la enfermedad y, por tanto, está presente cuando la enfermedad está presente. Por tanto, una proteína patógena, como se usa en el presente documento, no es necesariamente una proteína que es el agente causante específico de una enfermedad. Formas patógenas de una proteína pueden o pueden no ser infecciosas. Un ejemplo de una proteína patógena de enfermedad conformacional es PrP^{Sc}. Por consiguiente, el término “no patógena” describe una proteína que no produce normalmente la enfermedad o no está normalmente asociada a la enfermedad causante. Un ejemplo de una proteína de enfermedad conformacional no patógena es PrP^C.

“Interaccionar” en referencia a un reactivo de peptoide que interacciona con una proteína, por ejemplo, un fragmento de proteína, significa que el reactivo de peptoide se une específicamente, no específicamente o en alguna combinación de unión específica y no específica a la proteína priónica. Un reactivo de peptoide se dice que “interacciona preferencialmente” con una proteína priónica patógena si se une con mayor afinidad y/o mayor especificidad a la forma patógena que a isoformas no patógenas. Un reactivo de peptoide que interacciona preferencialmente con una proteína priónica patógena también se denomina en el presente documento un reactivo de peptoide específico para prión patógeno. En algunas realizaciones, la elevada afinidad y/o especificidad es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces. Debe entenderse que una interacción preferencial no requiere necesariamente la interacción entre un aminoácido específico o residuos sustitutos de aminoácidos y/o motivos de cada péptido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los reactivos de peptoide de la invención interaccionan preferencialmente con isoformas patógenas pero, sin embargo, pueden ser capaces de unirse a isoformas no patógenas a un nivel débil, todavía detectable (por ejemplo, 10% o menos de la unión mostrada con el polipéptido de interés). Normalmente, la débil unión, o la unión de fondo, es fácilmente discernible de la interacción preferencial con el compuesto o polipéptido de interés, por ejemplo, usando controles apropiados. En general, los peptoides de la invención se unen a priones patógenos en presencia de un exceso de 10⁶ veces de formas no patógenas.

“Afinidad” o “afinidad de unión” en términos del reactivo de peptoide que interacciona con una proteína de enfermedad conformacional se refiere a la fuerza de unión y puede expresarse cuantitativamente como una constante de disociación (K_d). La afinidad de unión puede determinarse usando técnicas muy conocidas por un experto habitual en la materia.

“Enfermedad relacionada con priones” se refiere a una enfermedad producida en conjunto o en parte por una proteína priónica patógena (por ejemplo, PrP^{Sc}), por ejemplo, pero sin limitación, tembladera, encefalopatías espongiiformes bovinas (EEB), enfermedad de las vacas locas, encefalopatías espongiiformes felinas, kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob de nueva variante (nvECJ), enfermedad debilitante crónica (CWD), enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e insomnio familiar letal (FFI).

El término “desnaturalizar” o “desnaturalizado” tiene el significado convencional que se aplica a la estructura de proteínas y significa que la proteína ha perdido su estructura secundaria y terciaria nativa. Con respecto a la proteína priónica patógena, una proteína priónica patógena “desnaturalizada” ya no retiene la conformación patógena nativa y, por tanto, la proteína ya no es “patógena”. La proteína priónica patógena desnaturalizada tiene una conformación similar o idéntica a la proteína priónica no patógena desnaturalizada. Sin embargo, para fines de claridad en el presente documento, el término “proteína priónica patógena desnaturalizada” se usará para referirse a la proteína priónica patógena que es capturada por el reactivo de peptoide como la isoforma patógena y posteriormente se desnaturaliza.

“pH fisiológicamente relevante” se refiere a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5; o aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0; o normalmente aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.

“Alifático” se refiere a un resto de hidrocarburo de cadena lineal o ramificado. Grupos alifáticos pueden incluir heteroátomos y restos de carbonilo.

5 “Alquilo”, tanto si se usa solo o como parte de otro grupo, se refiere a una cadena de hidrocarburo alifático e incluye, pero no se limita a, cadenas lineales y ramificadas que contienen de 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, o 1 a 3 átomos de carbono, a menos que se especifique explícitamente de otro modo. Por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, etc., están englobados por el término “alquilo”.

10 “Alquenilo” está previsto que denote grupos alquilo que contienen al menos un doble enlace, por ejemplo, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, o 2 a 4 átomos de carbono, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, vinilo, alilo, 2-metil-alilo, 4-but-3-enilo, 4-hex-5-enilo, 3-metil-but-2-enilo y similares.

15 “Alquinilo” está previsto que denote grupos alquilo que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, por ejemplo, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, o 2 a 4 átomos de carbono. Grupos alquinilo de ejemplo incluyen etinilo, propinilo y similares.

“Alcoxi”, tanto si se usa solo o como parte de otro grupo, tiene su significado normal de un grupo de fórmula -O-alquilo, por ejemplo, metoxi, en la que alquilo es como se define en el presente documento.

20 “Halo” o “halógeno”, cuando se usa solo o como parte de otro grupo, tiene su significado normal de elementos del grupo VII, por ejemplo, F, Cl, Br y I.

25 “Ariilo” cuando se usa solo o como parte de otro grupo, significa un sistema de hidrocarburo aromático, por ejemplo, de 6 a 20, 6 a 14, o 6 a 10 átomos de carbono de anillo, por ejemplo, de 1, 2 ó 3 anillos, por ejemplo, fenilo, bencilo, naftilo, naftaleno, antraceno, fenantrenilo, antraceno, pirenilo y similares. También incluidos en la definición de ariilo están sistemas aromáticos que contienen uno o más anillos carbocíclicos o heterocíclicos no aromáticos fusionados, por ejemplo, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno e indano. El grupo ariilo que contiene un anillo no aromático fusionado puede unirse mediante la porción aromática o la porción no aromática.

30 “Ariil-alquilo” o “aralquilo” significa un grupo de fórmula -alquil-ariilo, en la que ariilo y alquilo tienen las definiciones en el presente documento.

35 “Ariiloxi” tiene su significado normal de un grupo de fórmula -O-ariilo, por ejemplo, hidroxifenilo, en la que ariilo es como se define en el presente documento.

“Aralcoxi” tiene su significado normal de un grupo de fórmula -O-alquil-ariilo, por ejemplo, metoxifenilo, en la que alcoxi y ariilo son como se definen en el presente documento.

40 “Cicloalquilo”, tanto si se usa solo o como parte de otro grupo, tiene su significado normal de un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo cíclico, por ejemplo, un resto de hidrocarburo saturado mono, bi-, tri-cíclico, fusionado, unido por puentes o espiro, por ejemplo, de 3-10 átomos de carbono, por ejemplo, ciclopropilo. El término “cicloalquil-ariilo” está previsto que denote un grupo de fórmula -ariil-cicloalquilo en la que ariilo y cicloalquilo son como se definen en el presente documento. “Cicloalquilalquilo” está previsto que denote un grupo de fórmula -alquil-cicloalquilo, por ejemplo, un grupo ciclopropilmetilo o ciclohexilmetilo, en la que alquilo y cicloalquilo son como se definen en el presente documento.

45 Como se usa en el presente documento, grupos “heteroarilo” se refieren a un heterociclo aromático que tiene al menos un miembro de anillo de heteroátomo tal como azufre, oxígeno o nitrógeno. Grupos heteroarilo incluyen sistemas monocíclicos y policíclicos (por ejemplo, que tienen 2, 3 ó 4 anillos condensados). Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen sin limitación piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, furilo (furanilo), quinolilo, isoquinolilo, tienilo, imidazolilo, tiazolilo, indolilo, pirrilo, oxazolilo, benzofurilo, benzotienilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, indazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, benzotienilo, purinilo, carbazolilo, bencimidazolilo, indolinilo, y similares. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y en otras realizaciones de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 átomos de carbono.

50 En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo contiene 3 a aproximadamente 14, 3 a aproximadamente 7, o 5 a 6 átomos formadores de anillo. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene 1 a aproximadamente 4, 1 a aproximadamente 3, o 1 a 2 heteroátomos.

60 Como se usa en el presente documento, “heterocicloalquilo” se refiere a heterociclos no aromáticos que incluyen grupos alquilo, alquenilo y alquinilo ciclados en los que uno o más de los átomos de carbono formadores de anillo están sustituidos con un heteroátomo tal como un átomo de O, N o S. Grupos “heterocicloalquilo” de ejemplo incluyen morfolino, tiomorfolino, piperazinilo, tetrahidrofurano, tetrahidrotienilo, 2,3-dihidrobenzofurilo, 1,3-benzodioxol, benzo-1,4-dioxano, piperidinilo, pirrolidinilo, isoxazolidinilo, isotiazolidinilo, pirazolidinilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, imidazolidinilo, y similares. También está incluido en la definición de heterocicloalquilo restos que tienen uno o más anillos aromáticos fusionados (es decir, que tienen un enlace en común) con el anillo heterocíclico no aromático, por ejemplo, ftalimidilo, naftalimidilo y benzoderivados de heterociclos tales como grupos indoleno e

- 5 isoindoleno. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y en otras realizaciones de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 átomos de carbono, En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo contiene 3 a aproximadamente 14, 3 a aproximadamente 7, o 5 a 6 átomos formadores de anillo. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo tiene 1 a aproximadamente 4, 1 a aproximadamente 3, o 1 a 2 heteroátomos. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 3 dobles enlaces. En algunas realizaciones, el grupo heterocicloalquilo contiene 0 a 2 dobles o triples enlaces.
- 10 "Heteroarilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-heteroarilo en la que alquilo y heteroarilo son como se definen en el presente documento..
- 15 "Acilo" se refiere a un grupo de fórmula -C(O)-alquilo. En algunas realizaciones, el grupo acilo tiene de 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, o 1 a 4 átomos de carbono.
- "Aminoacilo" se refiere a un grupo de fórmula -C(O)-alquil-amino en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- 20 "Alquilamino" se refiere a un grupo de fórmula -NH-alquilo en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- "Dialquilamino" se refiere un grupo de fórmula -N(alquilo)₂ en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- 25 "Haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con uno o más halógenos, en el que alquilo y halógeno son como se definen en el presente documento.
- "Alcoxialquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-alcoxi en la que alquilo y alcoxi son como se definen en el presente documento.
- 30 "Carboxialquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-COOH en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- "Carbamilo" se refiere a un grupo de fórmula -C(O)NH₂.
- 35 "Carbamilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-C(O)NH₂ en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- "Guanidinoalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-NHC(=NH)NH₂ en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- 40 "Tiol" se refiere a un grupo de fórmula -SH.
- "Alquiltiol" se refiere a un grupo de fórmula -S-alquilo en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- 45 "Alquiltioalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-S-alquilo en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- "Imidazolilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-imidazolilo en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- 50 "Piperidilalquilo" se refiere a un grupo de fórmula -alquil-piperidinilo en la que alquilo es como se define en el presente documento.
- 55 "Naftilalquilo" significa un grupo de fórmula -alquil-naftilo, por ejemplo, (8'-naftil)metilo, en la que naftilo tiene su significado normal y alquilo es como se define en el presente documento.
- "Indolilalquilo" significa un grupo de fórmula -alquil-indol, por ejemplo, 3'-indoliletilo y 3'-indolilmetilo, en la que indol tiene su significado normal y alquilo es como se define en el presente documento.
- 60 "Heterociclo que contiene N" se indica para referirse a cualquier grupo heteroarilo o heterocicloalquilo que contiene al menos un átomo de N formador de anillo. Grupos heterociclico que contienen N de ejemplo incluyen piridinilo, imidazolilo, piperidinilo, piperazinilo, pirrolilo, indolilo, y similares.
- "Heterocicilalquilo que contiene N" se indica para referirse a alquilo sustituido con heterocicilalquilo que contiene N.
- 65 "Amino" y "amino primario" se refieren a NH₂. "Amino secundario" se refiere a NHR y "amino terciario" se refiere a NR₂ en la que R es cualquier sustituyente adecuado.

“Amonio” se indica para referirse al grupo $-N(R)_3^+$ en la que R puede ser cualquier resto apropiado tal como alquilo, cicloalquilo, arilo, cicloalquilalquilo, arilalquilo, etc.

“Aminoácido” se refiere a cualquiera de los veinte α -aminoácidos que se producen naturalmente y genéticamente codificados o derivados protegidos de los mismos. Derivados protegidos de aminoácidos pueden contener uno o más grupos protectores sobre el resto amino, resto carboxi, o resto de cadena lateral.

Ejemplos de grupos protectores de amino incluyen formilo, tritilo, ftalimido, tricloroacetilo, cloroacetilo, bromoacetilo, yodoacetilo y grupos de bloqueo de tipo uretano tales como benciloxicarbonilo, 4-fenilbenciloxicarbonilo, 2-metilbenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 4-fluorobenciloxicarbonilo, 4-clorobenciloxicarbonilo, 3-clorobenciloxicarbonilo, 2-clorobenciloxicarbonilo, 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, 4-bromobenciloxicarbonilo, 3-bromobenciloxicarbonilo, 4-nitrobenciloxicarbonilo, 4-cianobenciloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, 2-(4-xenil)-isopropoxicarbonilo, 1,1-difenilet-1-iloxicarbonilo, 1,1-difenilprop-1-iloxicarbonilo, 2-fenilprop-2-iloxicarbonilo, 2-(p-toluil)-prop-2-iloxicarbonilo, ciclopentaniloxi-carbonilo, 1-metilciclopentaniloxicarbonilo, ciclohexaniloxicarbonilo, 1-metilciclohexaniloxicarbonilo, 2-metilciclohexaniloxicarbonilo, 2-(4-toluilsulfonyl)-etoxicarbonilo, 2-(metilsulfonyl)etoxicarbonilo, 2-(trifenilfosfina)-etoxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo (“Fmoc”), 2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, 1-(trimetilsililmetil)prop-1-eniloxicarbonilo, 5-bencisoxalilmetoxicarbonilo, 4-acetoxibenciloxicarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo, 2-etinil-2-propoxicarbonilo, ciclopropilmetoxicarbonilo, 4-(decicloxi)benciloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, 1-piperidiloxicarbonilo y similares; grupo benzoilmetilsulfonyl, 2-nitrofenilsulfonyl, óxido de difenilfosfina y grupos protectores de amino similares.

Ejemplos de grupos protectores de carboxi incluyen metilo, p-nitrobencilo, p-metilbencilo, p-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,4,6-trimetoxibencilo, 2,4,6-trimetilbencilo, pentametilbencilo, 3,4-metilendioxiobencilo, benzhidrido, 4,4'-dimetoxibenzhidrido, 2,2',4,4'-tetrametoxibenzhidrido, t-butilo, t-amilo, tritilo, 4-metoxitritilo, 4,4'-dimetoxitritilo, 4,4',4''-trimetoxitritilo, 2-fenilprop-2-ilo, trimetilsililo, t-butildimetilsililo, fenacilo, 2,2,2-tricloroetilo, .beta.-(di(n-butil)metilsilil)etilo, p-toluenosulfonyletilo, 4-nitrobencilsulfonyletilo, alilo, cinnamilo, 1-(trimetilsililmetil)prop-1-en-3-ilo y restos similares.

Las especie de grupo protector empleada no es crítica, mientras que el grupo protector derivatizado puede eliminarse selectivamente en el punto apropiado sin interrumpir el resto de la molécula. Otros ejemplos de grupos protectores se encuentran en E. Haslam, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, (J. G. W. McOmie, ed., 1973), en el Capítulo 2; y T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, (1991), en el Capítulo 7.

“Peptoides” se usa generalmente para referirse a un mimético de péptido que contiene al menos uno, preferentemente dos o más, sustitutos de aminoácidos, preferentemente glicinas N-sustituidas. Los peptoides se describen, entre otros, en la patente de EE.UU. nº 5.811.387.

“Glicina N-sustituída” se refiere a un residuo de fórmula $-(NR-CH_2-CO)-$ en la que cada R es un resto de no hidrógeno tal como aquellos independientemente seleccionados de alquilo (C_2-C_6), haloalquilo (C_1-C_6), alqueno (C_2-C_6), alquino (C_2-C_6), cicloalquil (C_6-C_{10})-arilo, aminoalquilo (C_1-C_6), amonioalquilo (C_1-C_6), hidroxialquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6)-alquilo (C_1-C_6), carboxi, carboxialquilo (C_2-C_6), carbamilo, carbamilalquilo (C_2-C_6), guanidino, guanidinoalquilo (C_1-C_6), amidino, amidinoalquilo (C_1-C_6), tiol, alquil (C_1-C_6)-tiol, alquiltioalquilo de 2-10 átomos de carbono, heterociclilo que contiene N, heterocicilalquilo (C_1-C_6) que contiene N, imidazolilo, imidazolilalquilo de 4-10 átomos de carbono, piperidilo, piperidilalquilo de 5-10 átomos de carbono, indolilo, indolilalquilo de 9-15 átomos de carbono, naftilo, naftilalquilo de 11-16 átomos de carbono y arilalquilo (C_1-C_6); en la que cada resto R está opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, hidroxilo y alcoxi (C_1-C_6).

En algunas realizaciones de $-(NR-CH_2-CO)-$, R es alquilo (C_2-C_6), haloalquilo (C_1-C_6), alqueno (C_2-C_6), alquino (C_2-C_6), cicloalquil (C_6-C_{10})-arilo, aminoalquilo (C_1-C_6), hidroxialquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6)-alquilo (C_1-C_6), carboxi, carboxialquilo (C_2-C_6), carbamilo, carbamilalquilo (C_2-C_6), guanidino, guanidinoalquilo (C_1-C_6), tiol, alquil (C_1-C_6)-tiol, alquiltioalquilo de 2-10 átomos de carbono, imidazolilo, imidazolilalquilo de 4-10 átomos de carbono, piperidilo, piperidilalquilo de 5-10 átomos de carbono, indolilo, indolilalquilo de 9-15 átomos de carbono, naftilo, naftilalquilo de 11-16 átomos de carbono, difenilalquilo (C_1-C_6) o arilalquilo (C_1-C_6); en la que cada resto R está opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, hidroxilo y alcoxi (C_1-C_6).

En algunas realizaciones de $-(NR-CH_2-CO)-$, R es alquilo (C_2-C_6), aminoalquilo (C_1-C_6), hidroxialquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_6)-alquilo (C_1-C_6), guanidinoalquilo (C_1-C_6), indolilalquilo de 9-15 átomos de carbono, naftilalquilo de 11-16 átomos de carbono, difenilalquilo (C_1-C_6) o arilalquilo (C_1-C_6), sustituido con 1-3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, hidroxilo o alcoxi (C_1-C_6).

En algunas realizaciones de $-(NR-CH_2-CO)-$, R es un resto que está cargado a pH fisiológicamente relevante. Ejemplos de R positivamente cargado a pH fisiológicamente relevante incluyen, por ejemplo, aminoalquilo (C_1-C_6), amonioalquilo (C_1-C_6), guanidino, guanidinoalquilo (C_1-C_6), amidino, amidinoalquilo (C_1-C_6), heterociclilo que contiene N y heterocicilalquilo (C_1-C_6) que contiene N, en la que cada resto R está opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, metoxi C_1-C_3 y alquilo C_1-C_3 .

En algunas realizaciones de $-(NR-CH_2-CO)-$, R es un resto que es neutro a pH fisiológicamente relevante. Ejemplos de R neutro a pH fisiológicamente relevante incluyen, por ejemplo, alquilo (C_2-C_6), haloalquilo (C_1-C_6), alqueno (C_2-C_6), alquino (C_2-C_6), cicloalquil (C_6-C_{10})-arilo, alcoxi (C_1-C_6)-alquilo (C_1-C_6), alquiltioalquilo de 2-10 átomos de carbono, difenilalquilo (C_1-C_6) y arilalquilo (C_1-C_6). Otros ejemplos incluyen etilo, prop-1-ilo, prop-2-ilo, 1-metilprop-1-ilo, 2-metilprop-1-ilo, 3-fenilprop-1-ilo, 3-metilbutilo, bencilo, 4-cloro-bencilo, 4-metoxi-bencilo, 4-metil-bencilo, 2-metiltioet-1-ilo y 2,2-difeniletilo.

En algunas realizaciones de $-(NR-CH_2-CO)-$, R es aminoalquilo (C_1-C_6) (por ejemplo, aminobutilo).

Otras glicinas N-sustituidas de ejemplo incluyen aquellas en las que R es etilo, prop-1-ilo, prop-2-ilo, 1-metilprop-1-ilo, 2-metilprop-1-ilo, 3-fenilprop-1-ilo, 3-metilbutilo, bencilo, 4-hidroxibencilo, 4-cloro-bencilo, 4-metoxi-bencilo, 4-metil-bencilo, 2-hidroxietilo, mercaptoetilo, 2-aminoetilo, ácido 3-propiónico, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, 2-metiltioet-1-ilo, carboximetilo, 2-carboxietilo, carbamilmetilo, 2-carbamiletilo, 3-guanidinoprop-1-ilo, imidazolimetilo, 2,2-difeniletilo o indol-3-il-etilo.

También se incluyen sales, ésteres y formas protegidas (por ejemplo, N-protegidas con Fmoc o Boc, etc.) de las glicinas N-sustituidas.

Procedimientos para la preparación de sustitutos de aminoácidos, que incluyen glicinas N-sustituidas, se desvelan, entre otros, en la patente de EE.UU. nº 5.811.387.

“Monómero” o “subunidad” se refiere a una molécula que puede ligarse a otros monómeros para formar una cadena, por ejemplo, un péptido. Aminoácidos y glicinas N-sustituidas son monómeros de ejemplo. Cuando están ligados con otros monómeros, un monómero puede denominarse un “residuo”.

“Reactivo de peptoide” como se usa en el presente documento se refiere a un polímero similar a péptido en el que uno o más residuos comprenden una glicina N-sustituída, como se describe adicionalmente en el presente documento, y que interaccionan preferencialmente con la forma patógena de una proteína de enfermedad conformacional, particularmente con una proteína priónica patógena. El enlace de cada una de las glicinas N-sustituidas en una cadena lineal o ramificada opcionalmente junto con aminoácidos y/u otros sustitutos de aminoácidos puede producir “reactivos de peptoide” como se describen en el presente documento. Los enlaces normalmente constituyen enlaces peptídicos (es decir, amidas).

“Péptido” se refiere a un compuesto de amida que comprende al menos dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico, es decir, por el enlace del grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxilo de otro aminoácido. Péptido se usa en el presente documento indistintamente con “oligopéptido” o “polipéptido”, y ningún polímero de tamaño particular está implicado por el uso de estos términos. Longitudes no limitantes de péptidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen péptidos de 3 a 5 residuos de longitud, 6 a 10 residuos de longitud (o cualquier número entero entremedias), 11 a 20 residuos de longitud (o cualquier número entero entremedias), 21 a 75 residuos de longitud (o cualquier número entero entremedias), 75 a 100 (o cualquier número entero entremedias), o polipéptidos de más de 100 residuos de longitud. Normalmente, péptidos útiles en la presente invención pueden tener una longitud máxima adecuada para la aplicación prevista. El péptido puede estar entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100, aproximadamente 2 y aproximadamente 50, aproximadamente 2 y aproximadamente 20, aproximadamente 2 y aproximadamente 10, aproximadamente 2 y aproximadamente 8, o aproximadamente 2 y aproximadamente 5 residuos de longitud.

La “similitud” entre un aminoácido en un péptido y su sustituto de aminoácido no necesita ser exacta. Por ejemplo, puede sustituirse lisina con un residuo de glicina N-sustituída (por ejemplo, $-(NR-CH_2-CO)-$) en la que R es un grupo aminoalquilo tal como aminometilo, 2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, 5-aminopentilo o 6-aminohexilo. La serina puede sustituirse, por ejemplo, con grupos hidroxialquilo tales como hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 2-hidroxipropilo, y similares. En general, como enfoque inicial, un aminoácido convencional puede sustituirse con un análogo de glicina N-sustituída que tiene una cadena lateral de carácter similar, por ejemplo, hidrófoba, hidrófila, polar, no polar, aromática, etc. Más pruebas y optimización del péptido sustituido con aminoácidos puede hacerse por los procedimientos desvelados en el presente documento.

Un “resto conjugado” es una molécula covalentemente unida al reactivo de peptoide. Restos conjugados de ejemplo incluyen moléculas efectoras, sustratos, marcas, agentes de reticulación, ligantes, andamiaje polimérico, agente antigénico, molécula espaciadora, y similares. La unión de grupos conjugados con péptidos y análogos de los mismos está muy documentada en la técnica anterior. El resto conjugado puede unirse directamente al reactivo de peptoide o unirse mediante un resto de enlace. En algunas de tales realizaciones, el resto conjugado está unido al reactivo de peptoide en la región del extremo amino o la región del extremo carboxi. En otras realizaciones, el resto conjugado está unido a una subunidad del extremo tal como una subunidad del extremo amino o una subunidad del extremo carboxi. En algunas de tales realizaciones, el resto conjugado es un agente de reticulación o ligante. En algunas realizaciones, el resto conjugado comprende biotina o un grupo mercapto. En algunas realizaciones, el resto conjugado comprende una marca detectable. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende dos o más conjugados.

Los términos “marca”, “marcada”, “marca detectable” y “detectablemente marcada” se refieren a una molécula que puede detectar, que incluye, pero no se limita a, isótopos radiactivos, agentes fluorescentes, agentes luminiscentes, agentes quimioluminiscentes, enzimas, sustratos de enzima, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soles metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos), nanopartículas fluorescentes, nanopartículas de oro, y similares. El término “agente fluorescente” se refiere a una sustancia o una parte de la misma que puede presentar fluorescencia en el intervalo detectable tal como un fluoróforo. Ejemplos particulares de marcas que pueden usarse con la invención incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo de Texas, luminol, ésteres de acridinio, NADPH, beta-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina y ureasa. La marca también puede ser una marca de epítipo (por ejemplo, una marca His-His), un anticuerpo o un oligonucleótido amplificable o de otro modo detectable.

El término “compuesto efector” incluye cualquier compuesto que se une a un sitio de receptor biológico y efectúa un acontecimiento bioquímico después de unirse así. Por tanto, compuesto efector incluye fármaco farmacéutico, además de insecticidas, pero no se limita a ninguno de los dos.

El término “agente de reticulación” se refiere a restos que tienen funcionalidades que pueden formar enlaces covalentes con otras moléculas o andamiajes poliméricos. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen aquellos que tienen una o más funcionalidades terminales mercapto, hidroxilo, amino, carboxilo, y similares. En algunas realizaciones, el agente de reticulación tiene al menos una funcionalidad mercapto.

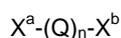
El término “ligante” se refiere a un resto que puede unirse, mediante interacciones no covalentes, con otra molécula o sustancia tal como un andamiaje polimérico. Un ejemplo ligante es biotina o derivado de la misma.

Un “resto de ligador”, “resto de enlace” o “ligador” se refiere a un resto que une el resto conjugado con el reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, el resto de ligador es un grupo que tiene al menos una región de enlace con la fórmula $-\{NH(CH_2)_mC(O)\}_p-$ en la que m es 1 a 10 y p es 1 a 5. En algunas realizaciones, el resto de ligador comprende al menos un residuo de aminoácido hexanoico (Ahx) o fragmento del mismo. Tales restos pueden potenciar adicionalmente la interacción del reactivo de peptoide con las proteínas priónicas y/o adicionalmente potenciar la detección de proteínas priónicas.

Reactivos de peptoide

La presente invención proporciona reactivos de peptoide que interaccionan con proteínas de enfermedades conformacionales tales como proteínas priónicas, complejos, composiciones y kits que contienen los reactivos de peptoide y procedimientos de uso de los mismos para la detección y aislamiento de proteínas de enfermedades conformacionales tales como PrP^{Sc}. Los reactivos de peptoide de la invención pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención de enfermedades conformacionales de proteína, por ejemplo, enfermedades por priones tales como EET, además de en un procedimiento para proporcionar un suministro de sangre o suministro de alimentos que esté sustancialmente libre de príon patógeno.

La invención proporciona un reactivo de peptoide que interacciona preferencialmente con una forma patógena de una proteína de enfermedad conformacional con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional que tiene una fórmula de:



en la que:

cada Q es independientemente un aminoácido o una glicina N-sustituida, y $-(Q)_n-$ define una región de peptoide; en la que dicha región de peptoide $-(Q)_n-$ comprende SEC ID N^o: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 ó 241.

X^a es H, alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, acilo (C₁-C₆), aminoacilo (C₁₋₆), un aminoácido, un grupo protector de amino, o un polipéptido de 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, en la que X^a está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador; y

X^b es H, alquilo (C₁-C₆), arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, alcoxi (C₁-C₆), ariloxi, aralcoxi, un grupo protector de carboxi, un aminoácido, o un polipéptido de 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, en la que X^b está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.

En algunas realizaciones, X^a es acilo (C₁-C₆) o aminoacilo (C₁₋₆), cada uno opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.

En algunas realizaciones, X^a es acilo (C₁-C₆) o aminoacilo (C₁₋₆), cada uno opcionalmente sustituido con un resto

ES 2 404 940 T3

- conjugado seleccionado de un reactivo de reticulación o de unión, cada uno opcionalmente unido mediante un resto de ligador.
- 5 En algunas realizaciones, X^a es acilo (C_1-C_6) o aminoacilo (C_{1-6}), cada uno opcionalmente sustituido con un resto conjugado seleccionado de biotina o mercapto, en la que el resto conjugado está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.
- 10 En algunas realizaciones, X^b es un aminoácido opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.
- En algunas realizaciones, X^b es amino, alquilamino, dialquilamino.
- En algunas realizaciones, X^b es amino.
- 15 En algunas realizaciones, n es aproximadamente 5 a aproximadamente 15; 5 a aproximadamente 10; ó 6.
- En algunas realizaciones, n es 4 a 10, 4 a 8, 5 a 7 ó 6.
- 20 En algunas realizaciones, X^b es un aminoácido opcionalmente sustituido con un resto conjugado y n es 6.
- En algunas realizaciones, el resto de ligador contiene una región que tiene la fórmula $-\{NH(CH_2)_mC(O)\}_p-$.
- En algunas realizaciones, m es 1 a 10.
- 25 En algunas realizaciones, m es 1 a 8.
- En algunas realizaciones, m es 5.
- En algunas realizaciones, p es 1 a 5.
- 30 En algunas realizaciones, p es 1 a 3.
- En algunas realizaciones, p es 1 ó 2.
- 35 En algunas realizaciones, X^b es un aminoácido opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador, y n es 6.
- En algunas realizaciones, X^b es amino, alquilamino o dialquilamino; X^a es H, alquilo (C_1-C_6), acilo (C_1-C_6), aminoacilo (C_{1-6}), un aminoácido, o un grupo protector de amino, en la que X^a está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador; y n es 6.
- 40 En algunas realizaciones, X^b es amino, alquilamino, o dialquilamino; X^a es H, alquilo (C_1-C_6), acilo (C_1-C_6), aminoacilo (C_{1-6}), un aminoácido, o un grupo protector de amino, en la que X^a está sustituido con un resto conjugado seleccionado de un agente de reticulación o ligante, en la que el resto conjugado está opcionalmente unido mediante un resto de ligador; y n es 6.
- 45 En algunas realizaciones, X^b es amino, alquilamino, o dialquilamino; X^a es H, alquilo (C_1-C_6), acilo (C_1-C_6), aminoacilo (C_{1-6}), un aminoácido, o un grupo protector de amino, en la que X^a está sustituido con un resto conjugado que comprende biotina o mercapto, en la que el resto conjugado está opcionalmente unido mediante un resto de ligador en la que al menos una parte de el resto de ligador tiene la fórmula $-\{NH(CH_2)_mC(O)\}_p-$; n es 6; m es 1 a 10; y p es 1 a 5.
- 50 En algunas realizaciones, la región de peptoide $-(Q)_n-$ es polliónica a pH fisiológicamente relevante.
- 55 En algunas realizaciones, la región de peptoide $-(Q)_n-$ es polcatiónica a pH fisiológicamente relevante.
- En algunas realizaciones, la región de peptoide $-(Q)_n-$ es polianiónica a pH fisiológicamente relevante.
- 60 En algunas realizaciones, la región de peptoide $-(Q)_n-$ tiene una carga neta de al menos 3+ a pH fisiológicamente relevante.
- En algunas realizaciones, la región de peptoide $-(Q)_n-$ tiene una carga neta de al menos 4+ a pH fisiológicamente relevante.
- 65 En algunas realizaciones, la región de peptoide $-(Q)_n-$ tiene una carga neta de 2+ a 6+ a pH fisiológicamente relevante.

- En algunas realizaciones, la región de peptóide $-(Q)_n-$ tiene una carga neta de 3+ a 5+ a pH fisiológicamente relevante.
- 5 En algunas realizaciones, la región de peptóide $-(Q)_n-$ tiene una carga neta de 4+ a pH fisiológicamente relevante.
- En algunas realizaciones, la región de peptóide $-(Q)_n-$ comprende al menos 3 glicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante.
- 10 En algunas realizaciones, en la que la región de peptóide $-(Q)_n-$ comprende al menos 4 glicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante.
- En algunas realizaciones, la región de peptóide $-(Q)_n-$ comprende de 2 a 6 glicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante.
- 15 En algunas realizaciones, la región de peptóide $-(Q)_n-$ comprende de 3 a 5 glicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante.
- En algunas realizaciones, la región de peptóide $-(Q)_n-$ comprende 4 glicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante.
- 20 En algunas realizaciones, todas las glicinas N-sustituidas de la región de peptóide están contiguas.
- En algunas realizaciones, el reactivo de peptóide comprende al menos un resto conjugado.
- 25 En algunas realizaciones, el reactivo de peptóide comprende al menos un resto conjugado unido mediante un resto de ligador.
- También se desvela un reactivo de peptóide que interacciona preferencialmente con una forma patógena de una proteína de enfermedad conformacional con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional en la que el reactivo de peptóide comprende una región del extremo amino, una región del extremo carboxi y al menos una región de peptóide entre la región del extremo amino y la región del extremo carboxi en la que la región de peptóide comprende aproximadamente 3 a aproximadamente 30 glicinas N-sustituidas y opcionalmente uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, la región de peptóide comprende aproximadamente 4 a aproximadamente 30 o aproximadamente 5 a aproximadamente 30 glicinas N-sustituidas. En algunas de tales realizaciones, la región de peptóide comprende aproximadamente 4 a aproximadamente 30, o aproximadamente 5 a aproximadamente 30 glicinas N-sustituidas y una subregión de peptóide seleccionada de:
- 30
- 35
- (a) -AABA-;
- 40 (b) -AABAB-
- (c) -ABACC-;
- (d) -AAAAA-;
- 45 (e) -ABCBA-;
- (f) -AABCA-; o
- 50 (g) -ABABA-;
- en las que A, B, y C son cada uno glicinas N-sustituidas diferentes, y cada secuencia de la subregión es leída de izquierda a derecha en la dirección del extremo amino al extremo carboxi.
- 55 En algunas realizaciones, la región de peptóide comprende de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 100%, aproximadamente el 75 a aproximadamente el 100%, o el 100% de glicinas N-sustituidas.
- En algunas realizaciones, la región de peptóide tiene aproximadamente 5 a aproximadamente 50, aproximadamente 5 a aproximadamente 30, aproximadamente 5 a aproximadamente 15, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, o 6 subunidades de longitud.
- 60
- En algunas realizaciones, el reactivo de peptóide tiene una longitud total de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 subunidades.
- 65 En algunas realizaciones, al menos una región de peptóide es superior a aproximadamente el 50%, superior a

aproximadamente el 75%, o superior a aproximadamente el 90% de la longitud total del reactivo de peptoide.

En algunas realizaciones, todas las glicinas N-sustituidas están contiguas en la región de peptoide.

- 5 En algunas realizaciones, las glicinas N-sustituidas de la región de peptoide tienen la fórmula $-(NR-CH_2-CO)-$ en la que R es como se define en todo el presente documento.

En algunas realizaciones, la región de peptoide es poliónica a pH fisiológicamente relevante y tiene características según cualquiera de las realizaciones descritas en todo el presente documento para regiones de peptoide cargadas.

- 10 También se desvela un reactivo de peptoide que interacciona preferencialmente con una forma patógena de una proteína de enfermedad conformacional con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional, en el que el reactivo comprende una región de peptoide que comprende 3 a 15 glicinas N-sustituidas contiguas, y en el que la región de peptoide tiene una carga neta a pH fisiológicamente relevante.
- 15 En algunas realizaciones, la carga neta es una carga positiva neta tal como una carga neta de al menos 3+ o al menos 4+ a pH fisiológicamente relevante. En algunas realizaciones, el propio reactivo de peptoide tiene una carga neta de 2+ a 6+, 3+ a 5+, o 4+ a pH fisiológicamente relevante.

- 20 En algunas realizaciones, al menos dos, al menos 3, o al menos 4 de las glicinas N-sustituidas contiguas de la región de peptoide están cargadas a pH fisiológicamente relevante. En otras realizaciones, al menos dos de las glicinas N-sustituidas contiguas de la región de peptoide comprenden al menos un resto seleccionado de amino primario, amino secundario, amino terciario, amonio (amino cuaternario), guanidino, amidino, o heterociclilo que contiene N.

- 25 En todavía otras realizaciones, al menos dos de las glicinas N-sustituidas contiguas de la región de peptoide comprenden al menos un N-sustituyente seleccionado de amino primario, amino secundario, amonio, guanidino, amidino, o heterociclilo que contiene N.

- 30 En todavía otras realizaciones, al menos dos de las glicinas N-sustituidas contiguas comprenden un N-sustituyente que es un grupo R según las definiciones proporcionadas en el presente documento.

En todavía otras realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una región de peptoide de 6 glicinas N-sustituidas contiguas y el propio reactivo de peptoide tiene una carga neta de 3+ o 4+ a pH fisiológicamente relevante.

- 35 La invención también proporciona procedimientos para la preparación de los reactivos de peptoide y para usar los reactivos de peptoide para detectar proteínas priónicas patógenas, procedimientos para el aislamiento de proteínas priónicas patógenas usando los reactivos de peptoide y procedimientos para la eliminación o reducción de proteínas priónicas patógenas de muestras.

- 40 Un "reactivo de peptoide" se refiere a una molécula de peptoide que tiene una región del extremo amino, una región del extremo carboxi y al menos una "región de peptoide" entre la región del extremo amino y la región del extremo carboxi. La región del extremo amino se refiere a una región sobre el lado del extremo amino del reactivo que normalmente no contiene ninguna glicina N-sustituida. La región del extremo amino puede ser H, alquilo, alquilo sustituido, acilo, un grupo protector de amino, un aminoácido, un péptido, o similares. En algunas realizaciones, la
- 45 región del extremo amino se corresponde con X^a . La región del extremo carboxi se refiere a una región sobre el extremo carboxi del peptoide que no contiene ninguna glicina N-sustituida. La región del extremo carboxi puede incluir H, alquilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino, un grupo protector de carboxi, un aminoácido, un péptido, o similares. En algunas realizaciones, la región del extremo carboxi se corresponde con X^b . En algunas
- 50 realizaciones, el reactivo de peptoide tiene una longitud total de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 subunidades; aproximadamente 5 a aproximadamente 30 subunidades; aproximadamente 5 a aproximadamente 15 subunidades; o aproximadamente 6 a aproximadamente 9 subunidades. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide es un amida del extremo carboxi. La región de peptoide generalmente se refiere a una parte del reactivo de peptoide en la que al menos tres de los aminoácidos en su interior están sustituidos con glicinas N-sustituidas.

- 55 La "región de peptoide" (también designada " $-(Q)_n$ -" en el presente documento) puede identificarse como la región que empieza con y que incluye la glicina N-sustituida más próxima al extremo amino y que termina con y que incluye la glicina N-sustituida más próxima al extremo carboxi. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al menos
- 60 aproximadamente el 99%, o el 100% de glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 100%; aproximadamente el 50 a aproximadamente el 100%; aproximadamente el 75 a aproximadamente el 100% de glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende el 100% de glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide es superior a aproximadamente el 50% (por ejemplo, aproximadamente el 50-100%) de la longitud total del reactivo de
- 65 peptoide. En algunas realizaciones, la región de peptoide es superior a aproximadamente el 60% (por ejemplo, aproximadamente el 60-100%) de la longitud total del reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, la región de

peptoide es superior a aproximadamente el 75% (por ejemplo, aproximadamente el 75-100%) de la longitud total del reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, la región de peptoide es superior a aproximadamente el 90% (por ejemplo, aproximadamente el 90-100%) de la longitud total del reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, la región de peptoide es el 100% de la longitud total del reactivo de peptoide.

5

Las regiones de peptoide de la invención se definen en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos 3 glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos 4 glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos 5 glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos 6 glicinas N-sustituidas. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende 3 a aproximadamente 30; aproximadamente 5 a aproximadamente 30 glicinas N-sustituidas; y opcionalmente uno o más aminoácidos. En algunas realizaciones, la región de peptoide tiene aproximadamente 5 a aproximadamente 50, 5 a aproximadamente 30, 5 a aproximadamente 15, 5 a aproximadamente 10, 5 a aproximadamente 9, 5 a aproximadamente 8, o 5 a aproximadamente 7 subunidades de longitud. En algunas realizaciones, la región de peptoide tiene aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 subunidades de longitud. En algunas realizaciones, la región de peptoide tiene 6 subunidades de longitud. En algunas realizaciones, todas las glicinas N-sustituidas en la región de peptoide están contiguas. En algunas realizaciones, todas las subunidades de la región de peptoide son glicinas N-sustituidas.

20

En otras realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una región de peptoide de 4 a 12, 4 a 10, 4 a 9, 4, a 8, 5 a 7, o 6 glicinas N-sustituidas contiguas.

25

Según algunas realizaciones, la región de peptoide puede ser poliiónica a pH fisiológicamente relevante. Por el término "poliiónico" se indica que la región de peptoide comprende dos o más residuos que están cargados a pH fisiológicamente relevante. En algunas realizaciones, la región de peptoide es policatiónica o polianiónica a pH fisiológicamente relevante. En otras realizaciones, la región de peptoide tiene una carga neta de al menos 3+ o al menos 4+ a pH fisiológicamente relevante. En todavía otras realizaciones, la región de peptoide tiene una carga neta de 2+ a 6+, 3+ a 5+, o 4+ a pH fisiológicamente relevante.

30

Ejemplos no limitantes de residuos de glicina N-sustituida que están cargados incluyen N-(5-aminopentil)glicina, N-(4-aminobutil)glicina, N-(3-aminopropil)glicina, N-(2-aminoetil)glicina, N-(5-guanidinopentil)glicina, N-(4-guanidinobutil)glicina, N-(3-guanidinopropil)glicina y N-(2-guanidinoetil)glicina.

35

En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos 3 o al menos 4 glicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende de 2 a 6, 3 a 5, o 4 aminoglicinas N-sustituidas que están positivamente cargadas a pH fisiológicamente relevante.

40

En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende residuos que tienen la fórmula $-(NR-CH_2-CO)-$ en la que al menos 3, al menos 4, 2 a 6, 3 a 5, o 4 de los residuos están cargados a pH fisiológicamente relevante.

45

En algunas realizaciones, los residuos cargados de la región de peptoide tienen la fórmula $-(NR-CH_2-CO)-$ en la que R está seleccionado independientemente de aminoalquilo (C_1-C_6), amonioalquilo (C_1-C_6), guanidino, guanidinoalquilo (C_1-C_6), amidino, amidinoalquilo (C_1-C_6), heterociclilo que contiene N y heterociclilalquilo (C_1-C_6) que contiene N, en la que cada resto R está opcionalmente sustituido con 1-3 sustituyentes independientemente seleccionados de halógeno, metoxi C_1-C_3 y alquilo C_1-C_3 . En algunas realizaciones, R es aminoalquilo (C_1-C_6) tal como aminobutilo.

50

En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide tiene una carga neta de al menos 3+ o al menos 4+ a pH fisiológicamente relevante. En todavía otras realizaciones, el reactivo de peptoide tiene una carga neta de 2+ a 6+, 3+ a 5+, o 4+ a pH fisiológicamente relevante.

55

La región de peptoide del reactivo de peptoide comprende al menos una subregión de peptoide, que se refiere a una secuencia de glicinas N-sustituidas contiguas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 o más residuos. En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende al menos una subregión de peptoide independientemente seleccionada de:

(a) -AABA-;

(b) -AABAB-

60

(c) -ABACC-;

(d) -AAAAA-;

65

(e) -ABCBA-;

(f) -AABCA-; o

(g) -ABABA-

5 A, B, y C representan cada uno glicinas N-sustituidas diferentes. Por ejemplo, cada A que se produce en la subregión se refiere a una glicina N-sustituida particular, y cada B que se produce en la subregión se refiere a otra glicina N-sustituida particular, pero A y B son diferentes entre sí. Por consiguiente, C es una glicina N-sustituida que es diferente de tanto A como B. La secuencia de la subregión indica que es leída de izquierda a derecha en la dirección de amino a carboxi. En algunas realizaciones, si A es un residuo hidrófobo, entonces B es un residuo hidrófilo, y viceversa. En algunas realizaciones, la subregión de peptoide es homogénea, es decir, sólo comprende un tipo de glicina N-sustituida. En algunas realizaciones, si A es un residuo alifático, B es un residuo cíclico. En algunas realizaciones, si B es un residuo alifático, A es un residuo cíclico. En algunas realizaciones, tanto A como B son alifáticos. En algunas realizaciones, A y B son alifáticos y C es cíclico. En algunas realizaciones, todas las glicinas N-sustituidas son alifáticas tal como para la subregión -AABA-, por ejemplo, -(N-(2-metoxietil)glicina)₂-N-(4-aminobutil)glicina-(N-(2-metoxietil)glicina)- en la que A es N-(2-metoxietil)glicina y B es N-(4-aminobutil)glicina.

10 En algunas realizaciones, la región de peptoide comprende un tripeptoide, es decir, tres glicinas N-sustituidas contiguas. Subregiones del peptoide tripeptoide de ejemplo incluyen -(N-(2-(4-hidroxifenil)etil)glicina)₂-N-(4-guanidinobutil)glicina-, -N-(4-aminobutil)glicina-(V)₂- en la que V es N-bencilglicina o N-(2-metoxietil)glicina, -N-bencilglicina-W-N-bencilglicina- en la que W es N-(4-aminobutil)glicina o N-(2-metoxietil)glicina, y -N-(4-aminoetil)glicina-(N-(2-(4-metoxifenil)etil)glicina)₂-. En algunas realizaciones, la subregión de tripeptoide comprende al menos un residuo alifático y uno cíclico, por ejemplo, (A)₂-B, B₂-A, o B-A-B en la que A es un residuo alifático y B es un residuo cíclico.

25 En algunas realizaciones, la subregión de peptoide es un dipeptoide tal como un dipeptoide de N-(4-aminobutil)glicina-(S)-N-(1-feniletil)glicina.

30 En la presente invención, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 ó 241, mostrada más adelante en el presente documento. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 239 ó 240. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 229, 230, 235, 237, 238, 239 ó 240. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 230, 237, 238, 239 ó 240. En algunas realizaciones la invención comprende el reactivo de peptoide I, II, VII, IX, X, XIa, XIb, XIIa o XIIb. En algunas realizaciones la invención comprende el reactivo de peptoide II, IX, X, XIa, XIb, XIIa o XIIb.

35 Los reactivos de peptoide de la invención pueden manipularse en concepto sustituyendo aminoácidos de un fragmento de péptido de una proteína de enfermedad conformacional con glicinas N-sustituidas. Preferentemente, el fragmento de péptido parental puede unirse a una proteína de enfermedad conformacional. Fragmentos de péptido parental de ejemplo incluyen aquellos que tienen las secuencias de SEC ID N° 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227 y 228.

50 En algunas realizaciones, al menos un residuo de no prolina del fragmento de péptido está sustituido con una glicina N-sustituida para formar el reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, al menos tres residuos de aminoácidos del fragmento de péptido están cada uno sustituidos con glicinas N-sustituidas para formar el reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, al menos cinco residuos de aminoácidos están sustituidos con glicinas N-sustituidas.

55 En algunas de tales realizaciones, la proteína de enfermedad conformacional es una proteína priónica. Por ejemplo, el fragmento de péptido puede derivarse de cualquiera de aquellas regiones correspondientes a los residuos 23-43 ó 85-156 (por ejemplo, 23-30, 86-111, 89-112, 97-107, 113-135 y 136-156) numeradas según la secuencia de priones de ratón mostrada en SEC ID N°: 2 de las solicitudes de patente del mismo solicitante n° de serie de EE.UU. 10/917.646, presentada el 13 de agosto de 2004, n° de serie de EE.UU. 11/056.950, presentada el 11 de febrero de 2005 y solicitud internacional PCT/US2004/026363, presentada el 13 de agosto de 2004, todas tituladas "Reactivos de péptido específicos para prión".

60 En algunas realizaciones, el fragmento de péptido está seleccionado de una cualquiera de SEC ID N° 14, 50, 51, 52, 12, 72, 68 ó 115 a 219. En algunas realizaciones, el fragmento de péptido está seleccionado de una cualquiera de SEC ID N° 14, 50, 51, 52 ó 161 a 219. En algunas realizaciones, el fragmento de péptido está seleccionado de una

cualquiera de SEC ID N° 12, 72, 68 ó 115 a 160. En algunas realizaciones, el fragmento de péptido está seleccionado de una cualquiera de SEC ID N° 14, 50 ó 68.

Como punto de partida, los residuos de aminoácidos en el fragmento de péptido pueden sustituirse con glicinas N-sustituidas según un esquema de sustitución en el que residuos de aminoácidos hidrófobos se sustituyen con glicinas N-sustituidas hidrófobas y residuos de aminoácidos hidrófilos se sustituyen con glicinas N-sustituidas hidrófilas. En algunas realizaciones, monómeros de aminoácidos de péptidos pueden sustituirse con glicinas N-sustituidas según el siguiente esquema de sustitución para formar un péptido modificado:

(a) Ala, Gly, Ile, Leu, Pro y Val pueden sustituirse con N-(alquil)glicina, N-(aralquil)glicina o N-(heteroarilalquil)glicina;

(b) Asp, Asn, Cys, Gln, Glu, Met, Ser y Thr pueden sustituirse con N-(hidroxialquil)glicina, N-(alcoxi)glicina, N-(aminoalquil)glicina o N-(guanidinoalquil)glicina;

(c) Phe, Trp y Tyr pueden sustituirse con N-(aralquil)glicina, N-(heteroarilalquil)glicina, N-(hidroxialaralquil)glicina o N-(alcoxiaralquil)glicina; y

(d) Arg, His y Lys pueden sustituirse con N-(aminoalquil)glicina o N-(guanidinoalquil)glicina.

El péptido modificado puede probarse para unirse a la forma patógena de una proteína priónica según procedimientos descritos en el presente documento. Sustituciones adicionales, según el esquema anterior, de monómeros de aminoácidos con glicinas N-sustituidas pueden hacerse y volverse a probar hasta que se obtenga la unión adecuada (es decir, reactivos de peptoide que interaccionan preferencialmente con la forma patógena del prión).

Procedimientos para la preparación de peptoides se desvelan en las patentes de EE.UU. n° 5.811.387 y 5.831.005, además de procedimientos desvelados en el presente documento.

Un reactivo de peptoide de la invención comprende monómeros, multímeros, moléculas cicladas, moléculas ramificadas, ligadores y similares. También se contemplan multímeros (es decir, dímeros, trímeros y similares) de cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento o equivalentes biológicamente funcionales de los mismos. El multímero puede ser un homomultímero, es decir, compuesto de monómeros idénticos, por ejemplo, cada monómero es la misma secuencia de peptoide tal como SEC ID N°: 229, más adelante en el presente documento. Alternativamente, el multímero puede ser un heteromultímero, es decir, todos los monómeros que comprenden el multímero no son idénticos.

Los multímeros pueden formarse por la unión directa de los monómeros entre sí o con sustrato incluyendo, por ejemplo, péptidos antigénicos múltiples (MAPS) (por ejemplo, MAPS simétricos), péptidos ligados a andamiajes poliméricos, por ejemplo, un andamiaje de PEG y/o péptidos unidos en tándem con o sin unidades espaciadoras. Alternativamente, un ligador puede añadirse a los monómeros para unirlos para formar un multímero. Ejemplos no limitantes de multímeros usando ligadores incluyen, por ejemplo, repeticiones en tándem que usan ligadores de glicina, MAPS unidos mediante un ligador a un sustrato y/o péptidos linealmente ligados unidos mediante ligadores a un andamiaje. Restos de ligador pueden implicar usar unidades espaciadoras bifuncionales (tanto homobifuncionales como heterobifuncionales) como son conocidas para un experto habitual en la materia.

En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide interacciona con la proteína de enfermedad conformacional de una enfermedad relacionada con priones, en la que la forma patógena de la proteína de enfermedad conformacional es PrP^{Sc}, y la forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional es PrP^C. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide es específico para PrP^{Sc} de más de una especie, por ejemplo, el reactivo de peptoide puede ser específico para la proteína priónica de dos o más de ser humano, vaca, oveja, reno, alce, cabra, ratón o hámster. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide es específico para PrP^{Sc} de una única especie.

En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide interacciona con la forma patógena de la proteína de enfermedad conformacional con una afinidad de al menos aproximadamente 2 veces; 5 veces; 10 veces; 20 veces; 50 veces; 100 veces; 200 veces; 500 veces; o 1000 veces más que por la forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional. En algunas realizaciones, la afinidad es al menos aproximadamente 10 veces más que por la forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional. En algunas realizaciones, la afinidad es al menos 100 veces más.

La invención proporciona además un complejo que comprende uno o más reactivos de peptoide como se describen en el presente documento y una proteína priónica. En algunas realizaciones, el complejo comprende un reactivo de peptoide descrito en el presente documento y un prión patógeno. En algunas realizaciones, el prión patógeno es PrP^{Sc}. En algunas realizaciones, el complejo comprende el prión patógeno y/o un reactivo de peptoide, reactivo de unión a prión o ligando, que opcionalmente está marcado. Como se usa en el presente documento, el término "complejo" significa una asociación entre prión, patógeno o no patógeno, y un reactivo de peptoide y/o un reactivo de

unión a príon. Por tanto, un complejo no es necesariamente una asociación entre un príon y un reactivo de peptoide, y puede ser una asociación entre un príon y un reactivo de unión a príon. Las moléculas en el complejo se unirán juntas por fuerzas intermoleculares suficientes, por ejemplo, iónicas, hidrófobas, enlace de hidrógeno, van der Waals, etc., para permitir que el complejo sirva de unidad unitaria para los fines de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento

Composiciones

La presente invención proporciona además una composición que comprende un reactivo de peptoide de la invención, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende un reactivo de peptoide y una muestra tal como una muestra biológica. La muestra biológica es una muestra preparada de un organismo vivo o que vivió alguna vez. Ejemplos no limitantes de muestras biológicas son órganos (por ejemplo, cerebro, hígado y riñón), células, sangre completa, fracciones de la sangre, componentes de la sangre, plasma, plaquetas, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido de cerebro, tejido del sistema nervioso, tejido de músculo, tejido de músculo y grasa (por ejemplo, carne), médula ósea, orina, lágrimas, tejido no del sistema nervioso, alimentos que proceden de un organismo vivo o que vivió alguna vez tal como res, cerdo o ternera lechal, y cualquier otra materia orgánica tal como materiales vegetales. La muestra biológica puede obtenerse durante un procedimiento relacionado con la salud tal como una donación de sangre o cribado, biopsia, autopsia o necropsia, o durante un proceso o procedimiento durante la preparación de alimentos tal como selección de animales y matanza y prueba de aseguramiento de la calidad del producto acabado.

La invención también proporciona una composición que comprende un soporte sólido y al menos un reactivo de peptoide de la invención. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, nitrocelulosa, poliestireno, polipropileno, látex, poli(fluoruro de vinilo), papel diazotizado, membranas de nailon, perlas activadas y/o perlas magnéticamente sensibles, o poli(cloruro de vinilo); polipropileno, látex de poliestireno, policarbonato, nailon, dextrano, quitina, arena, sílice, piedra pómez, agarosa, celulosa, vidrio, metal, poliacrilamida, silicona, goma o polisacáridos; papel diazotizado; o cualquier material usado para la síntesis en fase sólida, separaciones por afinidad, purificaciones, reacciones de hibridación, inmunoensayos y otras aplicaciones tales. El soporte puede estar particulado o puede estar en forma de una superficie continua e incluir membranas, malla, placas, pellas, portaobjetos, discos, capilares, fibras huecas, agujas, alfileres, pastillas, fibras sólidas, geles (por ejemplo, geles de sílice) y perlas (por ejemplo, perlas de poro de vidrio, geles de sílice, poliestireno, perlas opcionalmente reticuladas con divinilbenceno, copoliperlas injertadas, perlas de poliacrilamida, perlas de látex, perlas de dimetilacrilamida opcionalmente reticuladas con N-N'-bis-acriloiletilendiamina, perlas magnéticas de óxido de hierro, y partículas de vidrio recubiertas con un polímero hidrófobo). En algunas de tales realizaciones, el soporte sólido está seleccionado del grupo que consiste en nitrocelulosa, látex de poliestireno, poli(fluoruro de vinilo), papel diazotizado, membranas de nailon, perlas activadas y perlas magnéticamente sensibles.

En algunas realizaciones, la composición que comprende el reactivo de peptoide es una composición farmacéutica, es decir, farmacéuticamente aceptable y farmacológicamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéutico puede ser un sólido o líquido. Un vehículo sólido puede incluir una o más sustancias que también pueden actuar de aromatizante, edulcorante, lubricante, solubilizante, agente de suspensión, carga, deslizante, ayuda de compresión, ligante o agente de disgregación de comprimidos; también puede ser un material de encapsulamiento. En polvos, el vehículo comprende un sólido finamente dividido que está en mezcla con el reactivo de peptoide finamente dividido. Vehículos adecuados son normalmente macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivos. Tales vehículos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

Un excipiente es un componente que proporciona masa, confiere características de procesamiento y compresión satisfactorias, ayuda a controlar la tasa de disolución y/o por lo demás proporciona características físicas deseables adicionales al material de núcleo. Excipientes, por ejemplo, son diluyentes, ligantes, lubricantes y disgregantes muy conocidos para aquellos expertos en la materia como se describen, por ejemplo, en the *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, American Pharmaceutical Association, Washington, D. C. y The Pharmaceutical Society of Great Britain, Londres, Inglaterra (1986), incorporados en el presente por referencia en su totalidad. Excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, material celulósico tal como hipromelosa, HPC, HEC, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, etilcelulosa, metilcelulosa, y sus derivados y sales; otros compuestos orgánicos tales como PEG, talco, lactosa y otros azúcares tales como sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y maltodextrina, goma arábica, dextrina, ácido alginico, resina de etilcelulosa, gelatina, goma guar, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, alginato de sodio, almidón, zeína, polivinilpirrolidona, copolímero de vinilpirrolidina-acetato de vinilo, copolímero de acetato de vinilo-ácido crotónico y copolímero de acrilato de etilo-ácido metacrílico; plastificantes tales como propilenglicol, glicerina, trimetilolpropano, polímeros de PEG, sebacato de dibutilo, monoglicéridos acetilados, ftalato de dietilo, triacetina, triacetato de glicerilo, citrato de acetiltriethyl y citrato de triethyl; y lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, aceites vegetales hidrogenados, laurilsulfato de magnesio, benzoato de sodio, una mezcla de benzoato de sodio y acetato sódico, cloruro sódico, leucina, y Carbowax® 4000.

Una composición farmacéutica de la invención también puede administrarse conjuntamente con otras moléculas, por ejemplo, antígenos y agentes inmunorreguladores tales como inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas que incluyen, pero no se limitan a, interleucina 2 (IL-2), IL-2 modificada (cys125-ser125), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 12 (IL-12), interferón alfa o gamma, quimiocina IP-10, y β -quimiocinas tales como RANTES, MIP1- α y MTP1- β . Cuando se administran conjuntamente, la composición puede administrarse simultáneamente o secuencialmente con la otra molécula; y, si es simultáneamente, tanto como una unidad de dosificación unitaria como una mezcla que comprende la composición y otra molécula, o como unidades de dosificación separadas y distintas, comprendiendo cada unidad la composición o la otra molécula.

Composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del reactivo de peptido. Como se usa en el presente documento, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que inducirá una respuesta protectora y/o terapéutica en el animal sin infectar, infectado, expuesto o sin exponer tal como un mamífero, por ejemplo, humano o no humano, al que se administra. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del animal que está tratándose, la edad y condición general del animal que está tratándose, la capacidad del sistema inmunitario del animal para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la gravedad de la afección que está tratándose, la composición particular seleccionada y su modo de administración, entre otros factores. Un profesional médico experto habitual puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz, además de la dosis y frecuencia(s) de administración apropiada(s), para lograr un resultado clínico óptimo. Por ejemplo, la composición de la invención puede administrarse en una dosis única, o como parte de una pauta de administración tal como múltiples dosis, y puede administrarse diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente, semi-anualmente, bianualmente y similares. Una composición farmacéutica puede administrarse por diversos modos, por ejemplo, pero sin limitación, intramuscularmente, intramucosamente, subcutáneamente, intradérmicamente, transdérmicamente, transcutáneamente, intravaginalmente, intraperitonealmente, intrarrectalmente, por vía oral, nasalmente, rectalmente, ocularmente, intestinalmente y/o intravenosamente. Una composición puede adaptarse para administración; por ejemplo, para administración por vía oral, puede estar en forma de comprimidos o cápsulas, opcionalmente entéricamente recubierta, líquida, o de liberación controlada; y para administración intranasal puede estar en forma de un spray nasal, gotas nasales, gel o polvo. La pauta de dosificación puede incluir una primera dosis y una segunda dosis. La primera dosis, tal como una dosis de sensibilización, y una segunda dosis, tal como un refuerzo, pueden administrarse mucosamente, parenteralmente, o una combinación de los mismos. Aunque se proporcionan ejemplos de vías de administración, la vía de administración apropiada, y la dosificación, son generalmente determinadas caso por caso por el médico adjunto. Tales determinaciones son rutina para un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine* (1998), Fauci y col., eds. 14^a ed. New York: McGraw Hill.)

Detección

La presente invención proporciona además procedimientos para detectar la presencia de proteínas priónicas, particularmente proteínas priónicas patógenas. Los procedimientos de detección se basan en la propiedad de los reactivos de peptido de la invención para interaccionan preferencialmente con formas de prión patógeno. Los procedimientos de detección pueden usarse, por ejemplo, con procedimientos para detectar una proteína de enfermedad conformacional, especialmente una proteína priónica patógena, en una muestra, procedimientos para diagnosticar una enfermedad relacionada con priones (por ejemplo, en animales humanos o no humanos), procedimientos para asegurar un suministro de sangre sustancialmente libre de PrP^{Sc}, suministro de hemoderivados, o suministro de alimentos, procedimientos para analizar muestras de órganos y de tejido para trasplante, procedimientos para monitorizar la descontaminación de herramientas y equipo quirúrgico, además de cualquier otra situación en la que el conocimiento de la presencia o ausencia del prión patógeno es importante.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de la presencia de un prión patógeno en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptido de la invención en condiciones que permitan la unión del reactivo de peptido al prión patógeno, si está presente, para formar un complejo, y detectar la formación del complejo, formación del complejo que es indicativa de la presencia del prión patógeno. Condiciones normales que permitan la unión del reactivo de peptido al prión patógeno se describen en los ejemplos en el presente documento. Otras condiciones de unión adecuadas pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia.

El procedimiento de detección de prión patógeno en una muestra también puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptido de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptido al prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, poner en contacto el primer complejo con un segundo reactivo de peptido de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptido al prión patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del prión patógeno. El segundo complejo puede comprender el segundo reactivo de peptido y el prión patógeno, y opcionalmente, el primer reactivo de peptido.

En otra realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptido de

la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer cualquier muestra sin unir, poner en contacto el primer complejo con un segundo reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. El primer reactivo de peptoide comprende opcionalmente un soporte sólido que ayuda en la separación del primer complejo de la muestra sin unir.

Además, el procedimiento de detección de la invención puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un segundo reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. La disociación del primer complejo puede lograrse por cualquier procedimiento convencional para romper las interacciones de unión a proteína, por ejemplo, adición de una sal o agente caotrópico, aumento en la temperatura, adición de un detergente o desnaturalizante, y rotura mecánica, y también puede comprender tratamiento a un pH alto o bajo como se describe en el presente documento.

El procedimiento de detección de príon patógeno en una muestra también puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, poner en contacto el primer complejo con un reactivo de unión a príon (descrito en el presente documento), opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. El segundo complejo puede comprender el reactivo de unión a príon y el príon patógeno, y opcionalmente, el primer reactivo de peptoide.

En otra realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer cualquier muestra sin unir, poner en contacto el primer complejo con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno. El primer reactivo de peptoide opcionalmente comprende un soporte sólido que ayuda en la separación del primer complejo de la muestra sin unir.

Además, el procedimiento de detección de la invención puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

En otra realización, el procedimiento de detección de la invención puede comprender poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir, disociar el príon patógeno del primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto el príon patógeno disociado con un reactivo de unión a príon en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo usando un segundo reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del príon patógeno.

El príon patógeno disociado es preferentemente desnaturalizado durante o posteriormente a la disociación del primer complejo y antes de la formación del segundo complejo. Normalmente, los agentes que afectan la disociación del príon patógeno del complejo (por ejemplo, agentes caotrópicos, calor, pH alto o bajo) promoverán la desnaturalización de la proteína priónica patógena; sin embargo, si es deseable, la disociación del príon patógeno del complejo puede llevarse a cabo sin desnaturalizar la proteína, por ejemplo, usando baja concentración (por ejemplo, 0,4 a 1,0 M) de clorhidrato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio. Véase el documento WO2006076497 (solicitud internacional PCT/US2006/001090) para condiciones adicionales para disociar el príon patógeno del complejo sin desnaturalizar la proteína priónica. En otra realización, el procedimiento de detección comprende poner en contacto la muestra con un reactivo de unión a príon en condiciones que permitan la unión del reactivo de unión a príon al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin

5 unir, poner en contacto el complejo con un reactivo de peptoide de la invención, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión del reactivo de peptoide al prión patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del prión patógeno. El reactivo de unión a prión se proporciona opcionalmente sobre un soporte sólido.

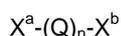
10 En algunas realizaciones, la etapa de disociación comprende poner en contacto la proteína priónica patógena unida con una sal o un agente caotrópico tal como, por ejemplo, tiocianato de guanidinio (GdnSCN) o clorhidrato de guanidinio (GdnHCl). Concentraciones adecuadas de ejemplo de GdnSCN o GdnHCl están entre aproximadamente 3 M y aproximadamente 6 M. En algunas realizaciones, la etapa de disociación comprende exponer la proteína priónica patógena unida a pH alto o bajo, por lo que la proteína priónica patógena disociada se desnaturaliza. Por ejemplo, el pH puede ser superior a 12 o inferior a 2. En algunas realizaciones, el pH está entre 12,5 y 13,0. Puede alcanzarse un pH alto mediante la adición de NaOH para preparar una concentración de 0,05 N a 0,15 N. La exposición a pH alto o bajo puede llevarse a cabo durante no más de 15 minutos o no más de 10 minutos. En algunas realizaciones, el pH alto o bajo se neutraliza a entre 7,0 y 7,5 tal como mediante la adición de ácido fosfórico o una sal de sodio del mismo.

20 Un "reactivo de unión a prión" es un reactivo que se une a una proteína priónica en alguna conformación, por ejemplo, el reactivo de unión a prión pueden unirse a una o más de una forma desnaturalizada de la proteína priónica, la forma PrP^C (isoforma no patógena), o PrP^{Sc} (isoforma patógena). Algunos de tales reactivos de unión a prión se unirán a más de una de estas formas de proteína priónica. Reactivos de unión a prión se han descrito e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti priónicos (descritos, entre otros, en Peretz y col. 1997 *J. Mol. Biol.* 273: 614; Peretz y col. 2001 *Nature* 412: 739; Williamson y col. 1998 *J Virol.* 72: 9413; Polymenidou y col. *The Lancet* 2005 4:805; patente de EE.UU. n° 4.806.627; patente de EE.UU. n° 6.765.088; y patente de EE.UU. n° 6.537.548), polipéptidos híbridos con motivos injertados (véase el documento W003/085086), ciertos polímeros catiónicos o aniónicos (véase el documento WO03/073106), ciertos péptidos que son "catalizadores de la propagación" (véase el documento WO02/097444), reactivos de péptido específico para prión (véanse, por ejemplo, los documentos WO2006/076687 y US20060035242) y plasminógeno. En todos los procedimientos que utilizan un reactivo de unión a prión, reactivos de unión a prión preferidos son anticuerpos anti priónicos

30 Aún adicionalmente, el procedimiento de detección puede comprender proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de la invención, combinar el soporte sólido con un ligando detectablemente marcado, en el que el reactivo de peptoide del soporte tiene una afinidad de unión más débil por el ligando que por el prión patógeno, para formar un primer complejo, combinar la muestra con el primer complejo en condiciones que permitan la unión del prión patógeno, si está presente en la muestra, con el reactivo de peptoide del primer complejo, sustituyendo así el ligando detectablemente marcado del primer complejo y formando un segundo complejo que comprende el reactivo de peptoide y el prión patógeno, y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia del prión patógeno.

40 Para su uso en los procedimientos para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra, la muestra puede ser algo conocida por, o sospechosa de, contener una proteína priónica patógena. En algunas realizaciones, la muestra es sospechosa de contener un prión patógeno, por ejemplo, PrP^{Sc}. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica (es decir, una muestra preparada de un organismo vivo o que vivió alguna vez), o una muestra no biológica. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica. Ejemplos no limitantes de muestras biológicas son órganos (por ejemplo, cerebro, hígado y riñón), células, sangre completa, fracciones de la sangre, componentes de la sangre, plasma, plaquetas, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido de cerebro, tejido del sistema nervioso, tejido de músculo, tejido de músculo y grasa (por ejemplo, carne), médula ósea, orina, lágrimas, tejido no del sistema nervioso, alimentos que proceden de un organismo vivo o que vivió alguna vez, y cualquier otra materia orgánica tal como materiales vegetales. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende sangre completa, fracciones de la sangre, componentes de la sangre, plasma, plaquetas o suero. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de una biopsia, autopsia o necropsia. En algunas realizaciones, la muestra es no biológica. Ejemplos no limitantes de muestras no biológicas incluyen productos farmacéuticos, cosméticos y productos de cuidado personal, y alimentos que no proceden de un organismo vivo o que vivió alguna vez, y similares. La muestra puede pretratarse en formas que son convencionales (por ejemplo, calentamiento, molienda, sonicación, exposición a ciertas enzimas digestivas) con el fin de garantizar el contacto entre la proteína priónica patógena que puede estar presente en la muestra y el reactivo de peptoide.

60 El procedimiento de detección de la presente invención utiliza un reactivo de peptoide que interacciona con una proteína de enfermedad conformacional tal como una proteína priónica, preferencialmente con una forma patógena con respecto a una forma no patógena de la proteína de enfermedad conformacional, que tiene una fórmula de:



65 en la que:

cada Q es independientemente un aminoácido o una glicina N-sustituida, y $-(Q)_n-$ define una región de peptoide; en

la que dicha región de peptoide $-(Q)_n-$ comprende SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 ó 241

5 X^a es H, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, acilo (C_1-C_6), aminoacilo (C_{1-6}), un aminoácido, un grupo protector de amino, o un polipéptido de 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, en la que X^a está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador;

10 X^b es H, alquilo (C_1-C_6), arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, alcoxi (C_1-C_6), ariloxi, aralcoxi, un grupo protector de carboxi, un aminoácido, o un polipéptido de 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, en la que X^b está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.

15 En algunas realizaciones del procedimiento de detección de la presente invención, el reactivo de peptoide comprende un análogo de peptoide de un fragmento de péptido de 3 a 30 aminoácidos de la proteína de enfermedad conformacional, en la que el fragmento de péptido está seleccionado del grupo de secuencias que consiste en SEC ID N° 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227 y 228, en el que:

(a) al menos un residuo de no prolina del fragmento de péptido está sustituido con una glicina N-sustituida para formar el análogo de peptoide; o

30 (b) al menos cinco residuos de aminoácidos del fragmento de péptido están cada uno sustituidos con una glicina N-sustituida para formar el análogo de peptoide.

En algunas realizaciones del procedimiento anterior, la sustitución de uno cualquiera o más residuos de aminoácidos del fragmento de péptido con una glicina N-sustituida se corresponde con el siguiente esquema de sustitución:

35 i) Ala, Gly, Ile, Leu, Pro y Val se sustituyen con N-(alquil)glicina, N-(aralquil)glicina o N-(heteroarilalquil)glicina;

40 ii) Asp, Asn, Cys, Gln, Glu, Met, Ser y Thr se sustituyen con N-(hidroxialquil)glicina, N-(alcoxi)glicina, N-(aminoalquil)glicina o N-(guanidinoalquil)glicina;

iii) Phe, Trp, y Tyr se sustituyen con N-(aralquil)glicina, N-(heteroarilalquil)glicina, N-(hidroxialaralquil)glicina o N-(alcoxiaralquil)glicina; y

45 iv) Arg, His y Lys se sustituyen con N-(aminoalquil)glicina o N-(guanidinoalquil)glicina.

En algunas de tales realizaciones, el reactivo de peptoide comprende un análogo de peptoide de un fragmento de péptido de 5 a 30 aminoácidos de la proteína de enfermedad conformacional como se ha descrito anteriormente.

50 En el procedimiento de detectar la presencia de un príon patógeno en una muestra, el reactivo de peptoide comprende una secuencia como se describe en el presente documento, por ejemplo, que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 y 241. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 239 ó 240. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 229, 230, 235, 237, 238, 239 ó 240. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 230, 237, 238, 239 ó 240. En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención utiliza uno o más del reactivo de peptoide I, II, VII, IX, X, XIa, XIb, XIIa o XIIb. En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención utiliza uno o más del reactivo de peptoide II, IX, X, XIa, XIb, XIIa o XIIb. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide usado en el procedimiento comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 229, 236, 231, 232, 233, 234 ó 235. En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 230, 237, 238, 239 ó 240. En algunas de tales realizaciones, el reactivo de peptoide comprende SEC ID N°: 230, 237 ó 240. En algunas de tales realizaciones, el reactivo de peptoide comprende SEC ID N°: 240.

65 En algunas realizaciones, el procedimiento para detectar la presencia de un príon patógeno en una muestra comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que

5 permitan la unión del primer reactivo de peptoide al prión patógeno, si está presente, para formar un complejo que comprende el primer reactivo de peptoide y la proteína priónica patógena, y detectar la presencia del prión patógeno, si está presente, en la muestra por su unión al primer reactivo de peptoide. La unión del prión patógeno al primer reactivo de peptoide puede detectarse detectando la formación del complejo, formación del complejo que es
10 indicativa de la presencia del prión patógeno. En general, en realizaciones preferidas del procedimiento, el complejo que comprende el primer reactivo de peptoide y la proteína priónica patógena se separa del resto de la muestra (es decir, la muestra sin unir) antes de la detección. La formación del complejo puede detectarse detectando el prión patógeno en el complejo o disociando el complejo (después de la separación de la muestra sin unir) y detectando el prión patógeno disociado. El prión patógeno disociado puede o puede no estar en la conformación patógena. En algunas realizaciones, el prión patógeno disociado está en una conformación de prión desnaturalizado. El prión patógeno disociado puede detectarse en formas que se conocen en la técnica, por ejemplo, uniendo un anticuerpo
15 antipriónico que es específico para la isoforma de prión apropiada, y que se describe adicionalmente en el presente documento. Anticuerpos que reconocen diferentes isoformas de prión se han descrito en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.846.533; 6.765.088; 6.261.790; 4.806.627; 6.165.784; 6.528.269; documentos EP891552, EP909388; Polymenidou y col. The Lancet 2005 4:805).

20 En una realización preferida del procedimiento anterior, el prión patógeno se disocia del complejo con el reactivo de peptoide usando un agente caotrópico, o usando tratamiento a pH alto o bajo como se describe en el presente documento.

25 Además, el procedimiento para detectar un prión patógeno en una muestra formando primero un complejo con el reactivo de peptoide específico para prión puede ir seguido de la detección del complejo con un procedimiento analítico. El procedimiento analítico puede comprender un procedimiento tal como espectroscopía de UV/visible, FTIR, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía Raman, espectrometría de masas, HPLC, electroforesis capilar, espectroscopía de resonancia de plasmones superficiales, sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS), o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.

30 En algunas realizaciones, el reactivo de peptoide o el reactivo de unión a prión comprende una marca detectable. Marcas detectables adecuadas para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, cualquier molécula que pueda detectar, tal como se define anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, la marca comprende una enzima, radioisótopo, toxina o fluoróforo. Adicionalmente, la marca detectable puede incluir una marca de oligonucleótido, que puede detectarse mediante un procedimiento de detección de ácido nucleico que incluye, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), ADN ramificado (b-ADN), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), y similares. Marcas detectables preferidas incluyen enzimas, especialmente fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante (HRP) y compuestos fluorescentes. Como es muy conocido en la técnica, las enzimas se utilizan en combinación con un sustrato detectable, por ejemplo, un sustrato cromogénico o un sustrato fluorogénico, para generar una señal detectable.

35 En algunas realizaciones de los procedimientos de detección de la invención, uno o más reactivos de peptoide están unidos a un soporte sólido. Un soporte sólido, para los fines de la invención, puede ser cualquier material que sea una matriz insoluble y pueda tener una superficie rígida o semi-rígida con la que una molécula de interés (por ejemplo, reactivos de peptoide de la invención, proteínas priónicas, anticuerpos, etc.) pueda ligarse o unirse. Soportes sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, aquellos previamente descritos anteriormente en este documento. Reactivos de peptoide, como se describen en el presente documento, puede unirse al soporte covalentemente, o por absorción, acoplamiento o uso de pares de unión. Por ejemplo, los reactivos de peptoide pueden acoplarse fácilmente al soporte sólido usando técnicas muy conocidas en la técnica. La inmovilización al soporte puede potenciarse acoplando primero el reactivo de peptoide a una proteína tal como cuando la proteína tiene mejores propiedades de unión a la fase sólida. Proteínas de acoplamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a, macromoléculas tales como albúminas de suero que incluyen albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, albúmina de huevo, y otras proteínas muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Los reactivos de peptoide también pueden unirse al soporte sólido mediante la interacción de un par de unión de moléculas. Un miembro del par de unión se acopla al soporte sólido y el otro miembro del par de unión se une al reactivo de peptoide (antes, durante o después de la síntesis).
40 Por ejemplo, el soporte puede comprender avidina o estreptavidina y el reactivo de peptoide puede comprender biotina. Además de biotina-avidina y biotina-estreptavidina, otros pares de unión adecuados para unir el peptoide al soporte incluyen, sin limitación, antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo, mimétope-anticuerpo, receptor-hormona, receptor-ligando, agonista-antagonista, lectina-hidrato de carbono, proteína A-Fc de anticuerpo. Tales pares de unión son muy conocidos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.551.843 y 6.586.193) y un experto habitual en la materia sería competente para seleccionar pares de unión adecuados y adaptarlos para su uso con la presente invención. Alternativamente, los reactivos de peptoide pueden unirse covalentemente al soporte sólido usando químicas de conjugación que son muy conocidas en la técnica. Los reactivos de peptoide que contienen tiol se unen directamente a soportes sólidos, por ejemplo, perlas magnéticas carboxiladas, usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Chrisey, L.A., Lee, G.U. y O'Ferrall, CE. (1996). Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Research* 24(15), 3031-3039; Kitagawa, T., Shimozono, T., Aikawa, T., Yoshida, T. y Nishimura, H. (1980). Preparation and characterization

of heterobifunctional cross-linking reagents for protein modifications. *Chem. Pharm. Bull.* **29(4)**, 1130-1135). Las perlas magnéticas carboxiladas se acoplan primero con un reticulador heterobifuncional que contiene una funcionalidad de maleimida (BMPH de Pierce Biotechnology Inc.) usando química de carbodiimida. El péptido o peptoide tiolado se acopla entonces covalentemente a la funcionalidad de maleimida de las perlas recubiertas de BMPH. Cuando se usa en las realizaciones de los procedimientos de detección de la invención, el soporte sólido ayuda en la separación del complejo que comprende el reactivo de peptoide de la invención y la proteína priónica patógena de la muestra sin unir. Perlas magnéticas particularmente convenientes para el acoplamiento de tiol son ácido carboxílico Dynabeads® M-270 de Dynal. El reactivo de peptoide también puede comprender un ligador, por ejemplo, uno o más restos de ácido aminohexanoico.

En algunas realizaciones del procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, luego poner en contacto el primer complejo con un segundo reactivo de peptoide detectablemente marcado de la invención en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al prión patógeno del primer complejo para formar un segundo complejo, y luego detectar la unión del prión patógeno al segundo reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, la unión de la proteína priónica patógena al segundo reactivo de peptoide puede detectarse detectando la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia de prión patógeno. En algunas realizaciones, los reactivos de peptoide son diferentes. En algunas realizaciones, el primer y el segundo reactivos de peptoide son los mismos. En algunas realizaciones, el primer reactivo de peptoide comprende biotina. En otras realizaciones, el primer reactivo de peptoide está unido a un soporte sólido.

En algunas realizaciones de los procedimientos de detección de la invención, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con un primer reactivo de peptoide de la invención en condiciones que permitan la unión del primer reactivo de peptoide al prión patógeno, si está presente, para formar un primer complejo; extraer la muestra sin unir, que puede incluir, por ejemplo, prión no patógeno presente en la muestra; disociar el prión patógeno del primer complejo, proporcionando así prión patógeno disociado; poner en contacto el prión patógeno disociado con un segundo reactivo de peptoide detectablemente marcado de la invención en condiciones que permitan la unión del segundo reactivo de peptoide al prión patógeno disociado para formar un segundo complejo; y detectar la formación del segundo complejo, formación del segundo complejo que es indicativa de la presencia de prión patógeno. En esta realización, el prión patógeno disociado retiene la conformación patógena.

En general, "prión patógeno disociado" o "prión disociado" puede incluir la proteína priónica que retiene la conformación patógena, además de la proteína priónica patógena que ha sido desnaturizada, cuyo prión desnaturizado puede no tener ni la conformación patógena ni la conformación celular normal, y puede no ser infeccioso.

Alternativamente, cuando los reactivos de peptoide de la invención se usan para capturar directamente la proteína priónica patógena para formar un primer complejo y el primer complejo se separa de los materiales de muestra sin unir, como se ha descrito anteriormente, un reactivo de unión a prión, que está opcionalmente detectablemente marcado, puede usarse para detectar el prión patógeno, tanto mientras que el prión patógeno está unido en el primer complejo como después de la disociación de la proteína priónica del primer complejo. Como se ha mencionado previamente en el presente documento, un reactivo de unión a prión es un reactivo que se une a una proteína priónica en alguna conformación, por ejemplo, el reactivo de unión a prión puede unirse a una o más de una forma desnaturizada de la proteína priónica, la forma PrP^C (isoforma no patógena), o PrP^{Sc} (isoforma patógena). Algunos de tales reactivos de unión a prión se unirán a más de una de estas formas de proteína priónica. Reactivos de unión a prión se han descrito e incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti priónicos (descritos, entre otros, en Peretz y col. 1997 *J. Mol. Biol.* 273: 614; Peretz y col. 2001 *Nature* 412: 739; Williamson y col. 1998 *J. Virol.* 72: 9413; Polymenidou y col. *The Lancet* 2005 4:805; patente de EE.UU. n° 4.806.627; patente de EE.UU. n° 6.765.088; y patente de EE.UU. n° 6.537.548), polipéptidos híbridos con motivos injertados (véase el documento W003/085086), ciertos polímeros catiónicos o aniónicos (véase el documento WO03/073106), ciertos péptidos que son "catalizadores de la propagación" (véase el documento WO02/097444), reactivos de péptido específico para prión (véanse, por ejemplo, los documentos WO2006/076687 y US20060035242) y plasminógeno. Si el reactivo de unión a prión particular usado se une a una forma desnaturizada del prión, será evidente que la proteína priónica patógena del primer complejo debe desnaturizarse antes de la detección con el reactivo de unión a prión. Los reactivos de unión a prión, particularmente anticuerpos anti priónicos, puede ser selectivos para proteínas priónicas de especies animales particulares. Por tanto, será evidente que se elegirán reactivos de unión a prión que tienen propiedades de unión adecuadas en términos de la especificidad por conformación de prión y especificidad por especie.

Por tanto, el reactivo de peptoide de la invención puede usarse tanto como un reactivo de "captura" para priones patógenos en una muestra o bien como un reactivo de "detección" para el prión patógeno capturado, o tanto como reactivo de captura y como de detección. Cuando el reactivo de peptoide se usa para la captura del prión patógeno, el prión capturado puede eliminarse del resto de la muestra (en virtud del complejo formado con el reactivo de peptoide) y el prión puede detectarse mediante medios convencionales (por ejemplo, ELISA, transferencia Western,

inmunoprecipitación, etc.), tanto mientras que todavía está complejado con el reactivo de peptoide como después de la disociación del complejo. El príon capturado puede detectarse alternativamente usando un segundo reactivo de peptoide que está detectablemente marcado.

5 ELISA

Un procedimiento particularmente preferido para detectar un príon patógeno en una muestra combina el uso de los reactivos de peptoide de la invención con una técnica de ELISA mejorada. El ensayo combina la potencia de los reactivos de peptoide para discriminar entre la forma patógena y la no patógena de las proteínas priónicas con una técnica de ELISA mejorada. Debido a que los reactivos de peptoide interaccionan preferencialmente con las proteínas priónicas patógenas, estos reactivos se usan para separar y concentrar cualquier príon patógeno presente en la muestra. A diferencia de los procedimientos que utilizan digestión con proteinasa K para discriminar entre las isoformas patógenas y no patógenas, que normalmente producen alguna digestión del extremo N incluso en la isoforma patógena, el uso de los reactivos de peptoide en el procedimiento de la invención produce la separación de proteínas priónicas patógenas de longitud completa. Por tanto, los anticuerpos antipriónicos que reconocen epítopes en el extremo N de la proteína priónica, por ejemplo, epítopes en la región de los residuos 23-90, pueden usarse para la detección, además de anticuerpos antipriónicos que reconocen epítopes de otras regiones de la proteína priónica. La región del extremo N de la proteína priónica de la mayoría de las especies contiene una secuencia repetida (4 copias de octa-repetición GQPHGGGS/W o 5 copias en PrP bovina). Los anticuerpos que se unen dentro de esta región pueden presentar elevada avidez que produce un aumento de la sensibilidad por el ensayo.

Una vez se ha separado la proteína priónica patógena de la isoforma no patógena (que está presente en muchas muestras biológicas) usando los reactivos de peptoide como se han descrito anteriormente, la proteína priónica patógena puede disociarse del reactivo de peptoide y detectarse en varios formatos de ELISA, descritos en el presente documento. El príon patógeno se desnatura normalmente en el procedimiento de disociación del reactivo de peptoide, aunque no necesariamente. Es preferible la desnaturación de PrP^{Sc} capturada antes de realizar el ELISA, ya que la mayoría de los anticuerpos antipriónicos de alta afinidad se unen a la forma desnaturada de PrP y muchos anticuerpos antipriónicos que se unen a la PrP desnaturada son conocidos y están comercialmente disponibles. La disociación y desnaturación del príon patógeno puede llevarse a cabo usando altas concentraciones de agentes caotrópicos, por ejemplo, 3 M a 6 M de una sal de guanidinio tal como tiocianato de guanidinio o HCl de guanidinio. El agente caotrópico debe eliminarse o diluirse antes de llevar a cabo el ELISA debido a que interferirá con la unión de los anticuerpos antipriónicos usados en el ELISA. Esto produce etapas de lavado adicionales o generación de grandes volúmenes de muestra, ambos de los cuales no son deseables para rápidos ensayos de alto rendimiento.

Los presentes inventores han descubierto que en algunas realizaciones una alternativa preferible al uso de un agente caotrópico para la desnaturación de la proteína priónica patógena, y la disociación del reactivo de peptoide, es el uso de pH alto o bajo. La proteína priónica patógena se disocia fácilmente del reactivo de peptoide y se desnatura añadiendo componentes que aumentan el pH a por encima de 12 (por ejemplo, NaOH) o a por debajo de 2 (por ejemplo, H₃PO₄). Además, el pH puede reajustarse fácilmente a neutro mediante la adición de pequeños volúmenes de ácido o base adecuado, permitiendo así el uso directamente en el ELISA sin ningún lavado adicional y sin aumentar significativamente los volúmenes de muestra.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un príon patógeno en una muestra que comprende: poner en contacto la muestra sospechosa de contener un príon patógeno con un reactivo de peptoide que interacciona preferencialmente con la forma patógena de la proteína priónica en condiciones que permitan la unión del reactivo de peptoide a la proteína priónica patógena, si está presente; eliminar el material de muestra sin unir; disociar el príon patógeno del reactivo de peptoide; y detectar la presencia del príon patógeno disociado usando un reactivo de unión a príon. Será evidente que si el reactivo de unión a príon particular usado se une a una forma desnaturada del príon, la proteína priónica patógena "capturada" debe desnaturarse antes de la detección con el reactivo de unión a príon. Preferentemente, la reacción de unión a príon es un anticuerpo antipriónico.

Se han descrito anticuerpos, anticuerpos modificados y otros reactivos, que se unen a priones, particularmente a PrP^C o a PrP desnaturada, y algunos de estos están disponibles comercialmente (véanse, por ejemplo, los anticuerpos antipriónicos descritos en Peretz y col. 1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretz y col. 2001 Nature 412:739; Williamson y col. 1998 J. Virol. 72:9413; Polymenidou y col. 2005 Lancet 4:805; patente de EE.UU. nº 6.765.088. Algunos de estos y otros están comercialmente disponibles de, entre otros, InPro Biotechnology, South San Francisco, CA, Cayman Chemicals, Ann Arbor MI; Prionics AG, Zúrich; véase también el documento WO 03/085086 para la descripción de anticuerpos modificados). Anticuerpos adecuados para su uso en el procedimiento incluyen sin limitación 3F4 (documento US 4.806.627), D18 (Peretz y col. J. Mol Biol. 1997 273:614), D13 (Peretz 1997, arriba), 6H4 (Liu y col. J. Histochem. Cytochem. 2003 51:1065), MAB5242 (Chemicon), 7D9 (Kascsak y col. 1987 J. Virol. 61:3688), BDI115 (Biodesign International), SAF32, SAF53, SAF83, SAF84 (anticuerpos SAF disponibles de SPI Bio, Francia), 19B10 (documento WO2004/4033628), 7VC (documento WO2004/4033628), 12F10 (SPI Bio), PRI308 (SPI Bio), 34C9 (Prionics AG), Fab HuM-P (Peretz y col. Nature 2001 412:739), POM 1 a POM 19 (Polymenidou y col. 2005, arriba), Fab HuM-R1 (Peretz 1997, arriba) y Fab HuM-R72 (Peretz 1997, arriba). Otros

anticuerpos antipríónicos pueden generarse fácilmente mediante procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Anticuerpos antipríónicos preferidos serán aquellos que se unen a una forma desnaturalizada del prión patógeno. Anticuerpos antipríónicos particularmente preferidos serán aquellos que reconocen epítopes en la región del extremo N de la proteína priónica. Algunos anticuerpos antipríónicos son específicos para la proteína priónica de una especie de animal o un número limitado de especies de animales, otros pueden unirse a proteínas priónicas de muchas especies de animales. Será evidente elegir anticuerpos antipríónicos adecuados basados en las muestras que van a analizarse y el fin de la prueba.

En realizaciones preferidas, el reactivo de peptoide se proporciona sobre un soporte sólido. El reactivo de peptoide puede proporcionarse sobre un soporte sólido antes de poner en contacto la muestra, o el reactivo de peptoide puede adaptarse para unirse al soporte sólido después de poner en contacto la muestra y unirse a cualquier prión patógeno en su interior (por ejemplo, usando un reactivo de peptoide biotinilado y un soporte sólido que comprende una avidina o estreptavidina).

Por tanto, la invención proporciona adicionalmente un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

(a) proporcionar un primer reactivo de peptoide sobre un primer soporte sólido;

(b) poner en contacto el primer soporte sólido con una muestra en condiciones que permitan que proteínas priónicas patógenas, cuando están presentes en la muestra, se unan al reactivo de peptoide para formar un primer complejo;

(c) eliminar el material de muestra sin unir;

(d) disociar las proteínas priónicas patógenas del primer complejo; y

(e) detectar los priones patógenos disociados usando un reactivo de unión a prión.

El reactivo de peptoide se deriva de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240 ó 241. El reactivo de unión a prión se describe adicionalmente en el presente documento. Preferentemente, el reactivo de unión a prión es un anticuerpo antipríónico. El primer soporte sólido es preferentemente una perla magnética, más preferentemente una perla de poliestireno/óxido de hierro.

Los procedimientos de unión de un reactivo de peptoide sobre un soporte sólido son convencionales en la materia y se describen en cualquier parte en el presente documento e incluyen procedimientos muy conocidos de unión de proteínas y péptidos a diversas superficies sólidas. La muestra se pone en contacto con el soporte sólido que comprende el reactivo de peptoide en condiciones que permitan la unión de cualquier proteína priónica patógena en la muestra al reactivo de peptoide, formando un primer complejo. Tales condiciones de unión son fácilmente determinadas por un experto habitual en la materia y se describen adicionalmente en el presente documento. Normalmente, el procedimiento se lleva a cabo en los pocillos de una placa de microtitulación o en tubos de plástico de pequeño volumen, pero cualquier recipiente conveniente será adecuado. La muestra es generalmente una muestra líquida o suspensión y puede añadirse al recipiente de reacción antes o después del reactivo de peptoide. Una vez se establece el primer complejo, el material de muestra sin unir (es decir, cualquier componente de la muestra que no se ha unido al reactivo de peptoide, que incluye cualquier proteína priónica patógena sin unir) puede eliminarse separando el soporte sólido de la disolución de reacción (que contiene los materiales de muestra sin unir), por ejemplo, por centrifugación, precipitación, filtración, fuerza magnética, etc. El soporte sólido con el primer complejo puede someterse opcionalmente a una o más etapas de lavado para eliminar cualquier material de muestra residual antes de llevar a cabo las siguientes etapas del procedimiento.

Tras la eliminación de materiales de muestra sin unir y cualquier lavado opcional, las proteínas priónicas patógenas unidas se disocian del primer complejo. Esta disociación puede llevarse a cabo en varias formas. En una realización, un agente caotrópico, preferentemente un compuesto de guanidinio, por ejemplo, tiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio, se añade a una concentración de entre 3 M y 6 M. La adición del agente caotrópico en estas concentraciones hace que la proteína priónica patógena se disocie del reactivo de peptoide y también hace que se desnaturalice la proteína priónica patógena.

En otra realización, la disociación se lleva a cabo tanto elevando el pH a 12 o por encima ("pH alto") como reduciendo el pH a 2 o por debajo ("pH bajo"). La exposición del primer complejo a tanto pH alto como bajo produce la disociación de la proteína priónica patógena del reactivo de peptoide y hace que se desnaturalice la proteína priónica patógena. En esta realización se prefiere la exposición del primer complejo a pH alto. A pH de entre 12,0 y 13,0 es generalmente suficiente; preferentemente se usa un pH de entre 12,5 y 13,0; más preferentemente un pH de 12,7 a 12,9; lo más preferentemente un pH de 12,9. Alternativamente, la exposición del primer complejo a un pH bajo puede usarse para disociar y desnaturalizar la proteína priónica patógena del reactivo de peptoide. Para esta alternativa, un pH de entre 1,0 y 2,0 es suficiente. La exposición del primer complejo a tanto un pH alto como a un pH bajo se lleva a cabo durante sólo un corto tiempo, por ejemplo, 60 minutos, preferentemente durante no más de

15 minutos, más preferentemente durante no más de 10 minutos. Exposiciones más largas a éstas pueden producir deterioro significativo de la estructura de la proteína priónica patógena, de forma que se destruyan epítopes reconocidos por anticuerpos antipriónicos usados en las etapas de detección. Después de la exposición durante un tiempo suficiente para disociar la proteína priónica patógena, el pH puede reajustarse fácilmente a neutro (es decir, pH de entre aproximadamente 7,0 y 7,5) mediante la adición de tanto un reactivo ácido (si se usan condiciones de disociación a pH alto) como un reactivo básico (si se usan condiciones de disociación a pH bajo). Un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente protocolos apropiados y ejemplos se describen en el presente documento.

5
10
15 En general, para efectuar una condición de disociación a pH alto, la adición de NaOH a una concentración de aproximadamente 0,05 N a aproximadamente 0,2 N es suficiente. Preferentemente se añade NaOH a una concentración de entre 0,05 N y 0,15 N; más preferentemente se usa NaOH 0,1 N. Una vez se ha llevado a cabo la disociación del prion patógeno del reactivo de peptoide, el pH puede reajustarse a neutro (es decir, entre aproximadamente 7,0 y 7,5) mediante la adición de cantidades adecuadas de una disolución ácida, por ejemplo, ácido fosfórico, fosfato de sodio monobásico.

20 En general, para efectuar una condición de disociación a pH bajo, la adición de H_3PO_4 a una concentración de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 0,7 M es suficiente. Preferentemente se añade H_3PO_4 a una concentración de entre 0,3 M y 0,6 M; más preferentemente se usa H_3PO_4 0,5 M. Una vez se ha llevado a cabo la disociación del prion patógeno del reactivo de peptoide, el pH puede reajustarse a neutro (es decir, entre aproximadamente 7,0 y 7,5) mediante la adición de cantidades adecuadas de una disolución básica, por ejemplo, NaOH o KOH.

25 La proteína priónica patógena disociada se separa entonces del soporte sólido que comprende el reactivo de peptoide. Esta separación puede llevarse a cabo en modo similar a la eliminación de los materiales de muestra sin unir descrita anteriormente, excepto que la porción que contiene los materiales sin unir (ahora la proteína priónica patógena disociada) es retenida y se desecha la porción de material de soporte sólido.

30 La proteína priónica patógena disociada puede detectarse usando reactivos de unión a prion. Varios de tales agentes de unión a prion son conocidos y se describen en el presente documento. Reactivos de unión a prion preferidos para la detección de la proteína priónica patógena disociada son anticuerpos antipriónicos. Se han descrito varios anticuerpos antipriónicos y muchos están comercialmente disponibles, por ejemplo, Fab D18 (Peretz y col. (2001) Nature 412:739-743), 3F4 (disponible de Sigma Chemical St Louis MO; por tanto, véase la patente de EE.UU. nº 4.806.627), SAF-32 (Cayman Chemical, Ann Arbor MI), 6H4 (Prionic AG, Suiza; por tanto, véase la patente de EE.UU. nº 6.765.088), POM 1 a 19 (Polymenidou y col. The Lancet 2005 4:805) y otros descritos anteriormente y muy conocidos en la técnica. Las proteínas priónicas patógenas disociadas pueden detectarse en un ensayo tipo ELISA, tanto como un ELISA directo como un ensayo tipo ELISA de sándwich de anticuerpos, que se describe más completamente más adelante. Aunque el término "ELISA" se usa para describir la detección con anticuerpos antipriónicos, el ensayo no se limita a aquellos en los que los anticuerpos están "ligados a enzima". Los anticuerpos de detección pueden marcarse con cualquiera de las marcas detectables descritas en el presente documento y muy conocidas en la ciencia del inmunoensayo.

45 En una realización del procedimiento, la proteína priónica patógena disociada se recubre pasivamente sobre la superficie de un segundo soporte sólido. Procedimientos para tal recubrimiento pasivo son muy conocidos y normalmente se llevan a cabo en $NaHCO_3$ 100 mM a pH 8 durante varias horas a aproximadamente 37°C o durante la noche a 4°C. Otros tampones de recubrimiento son muy conocidos (por ejemplo, carbonato 50 mM a pH 9,6, Tris 10 mM a pH 8, o PBS 10 mM a pH 7,2). El segundo soporte sólido puede ser cualquiera de los soportes sólidos descritos en el presente documento o muy conocidos en la técnica; preferentemente, el segundo soporte sólido es una placa de microtitulación, por ejemplo, una placa de poliestireno de 96 pocillos. Si la disociación se ha llevado a cabo usando una alta concentración de agente caotrópico, la concentración del agente caotrópico se reducirá por dilución al menos aproximadamente 2 veces antes del recubrimiento sobre el segundo soporte sólido. Si la disociación se ha llevado a cabo usando un pH alto o bajo, seguido de neutralización, la proteína priónica patógena disociada puede usarse para el recubrimiento sin más dilución.

55 Una vez se ha recubierto la proteína priónica patógena disociada sobre el segundo soporte sólido, el soporte puede lavarse para eliminar cualquier componente que no se haya adherido al soporte sólido. Los anticuerpos antipriónicos se añaden en condiciones que permitan la unión de los anticuerpos a la proteína priónica recubierta sobre el segundo soporte sólido. Si la proteína priónica patógena disociada se ha desnaturalizado antes del recubrimiento sobre el segundo soporte sólido, los anticuerpos usados serán aquellos que se unen a la forma desnaturalizada de la proteína priónica. Tales anticuerpos incluyen aquellos que son muy conocidos (tal como aquellos descritos anteriormente), además de anticuerpos que se generan por procedimientos muy conocidos, por ejemplo, usando rPrP, PrP^C o fragmentos de los mismos, para provocar una reacción inmune en ratones, conejos, ratas, etc. (véanse la patente de EE.UU. nº 4.806.627; documentos 6.165.784; 6.528.269; 6.379.905; 6.261.790; 6.765.088; 5.846.533; EP891552B1 y EP 909388B1). Anticuerpos antipriónicos que reconocen epítopes en el extremo N de la proteína priónica son particularmente preferidos, por ejemplo, anticuerpos que reconocen epítopes dentro de la región de los residuos 23-90.

Por tanto, la invención en una realización proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

- 5 (a) proporcionar un primer reactivo de peptoide sobre un primer soporte sólido;
- (b) poner en contacto el primer reactivo de peptoide con una muestra en condiciones que permitan que proteínas priónicas patógenas, cuando están presentes en la muestra, se unan al reactivo de peptoide para formar un primer complejo;
- 10 (c) extraer material de muestra sin unir;
- (d) disociar las proteínas priónicas patógenas del primer complejo;
- 15 (e) separar las proteínas priónicas patógenas disociadas del primer soporte sólido;
- (f) poner en contacto las proteínas priónicas patógenas disociadas con un segundo soporte sólido en condiciones que permitan que la proteína priónica disociada se adhiera al segundo soporte sólido; y
- 20 (g) detectar los priones patógenos adheridos sobre el segundo soporte sólido usando un reactivo de unión a prión.

En esta realización, el primer soporte sólido es preferentemente una perla magnética; el segundo soporte sólido es preferentemente una placa de microtitulación; el reactivo de unión a prión es preferentemente un anticuerpo antipriónico, particularmente 3F4, 6H4, SAF32, o uno o más de los anticuerpos POM descritos en Polymenidou, arriba. El reactivo de unión a prión está detectablemente marcado.

En otra realización del procedimiento, las proteínas priónicas patógenas disociadas se detectan usando un ELISA tipo sándwich de anticuerpos. En esta realización, la proteína priónica disociada es "recapturada" sobre un segundo soporte sólido que comprende un primer anticuerpo antipriónico. El segundo soporte sólido con la proteína priónica recapturada es opcionalmente lavado para eliminar cualquier material sin unir, y luego se pone en contacto con un segundo anticuerpo antipriónico en condiciones que permitan que el segundo anticuerpo antipriónico se una a la proteína priónica recapturada. El primer y segundo anticuerpos antipriónicos serán normalmente anticuerpos diferentes y reconocerán preferentemente epítopes diferentes sobre la proteína priónica. Por ejemplo, el primer anticuerpo antipriónico reconocerá un epítipo en el extremo N de la proteína priónica y el segundo anticuerpo antipriónico reconocerá un epítipo en un sitio distinto del extremo N, o viceversa. El primer anticuerpo puede ser, por ejemplo, SAF32 que reconoce un epítipo en la región de octa-repetición (residuos 23-90) y el segundo anticuerpo puede ser 3F4, que reconoce un epítipo en los residuos 109-112; alternativamente, el primer anticuerpo puede ser 3F4 y el segundo anticuerpo puede ser SAF32. Otras combinaciones de primer y segundo anticuerpo pueden seleccionarse fácilmente. En esta realización, el segundo anticuerpo antipriónico, pero no el primer anticuerpo antipriónico, estará detectablemente marcado. Cuando la disociación de la proteína priónica patógena del reactivo de peptoide se lleva a cabo usando un agente caotrópico, el agente caotrópico debe eliminarse o diluirse al menos 15 veces antes de llevar a cabo el ensayo de detección. Si la disociación se efectúa usando una neutralización a pH alto o bajo, el prión disociado puede usarse sin más dilución. Si la proteína priónica patógena disociada se desnaturaliza antes de llevar a cabo la detección, el primer y segundo anticuerpos se unirán ambos a la proteína priónica desnaturalizada.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra que comprende:

- 50 (a) proporcionar un primer reactivo de peptoide como se describe en el presente documento sobre un primer soporte sólido;
- (b) poner en contacto el primer reactivo de peptoide con una muestra en condiciones que permitan que proteínas priónicas patógenas, cuando están presentes en la muestra, se unan al reactivo de peptoide para formar un primer complejo;
- 55 (c) extraer material de muestra sin unir;
- (d) disociar las proteínas priónicas patógenas del primer complejo, por lo cual la proteína priónica patógena se desnaturaliza;
- 60 (e) separar las proteínas priónicas patógenas desnaturalizadas disociadas del primer soporte sólido;
- (f) poner en contacto las proteínas priónicas patógenas desnaturalizadas disociadas con un segundo soporte sólido, en el que el segundo soporte sólido comprende un primer anticuerpo antipriónico, en condiciones que permitan que la proteína priónica disociada se una al primer anticuerpo antipriónico; y
- 65

(g) detectar las proteínas priónicas unidas sobre el segundo soporte sólido con un segundo anticuerpo antipriónico.

5 En esta realización, el primer soporte sólido es preferentemente una perla magnética; el segundo soporte sólido es preferentemente una placa de microtitulación o una perla magnética; el primer y segundo anticuerpos antipriónicos son preferentemente anticuerpos diferentes; el primer y segundo anticuerpos se unen preferentemente a proteína priónica desnaturalizada; preferentemente, al menos uno del primer o segundo anticuerpos antipriónicos reconoce un epítoto en la región del extremo N de la proteína priónica. En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo antipriónico está detectablemente marcado; en otras realizaciones, el segundo anticuerpo antipriónico está marcado con enzima.

Cualquiera de los procedimientos de detección para un prión patógeno descrito anteriormente en este documento puede usarse en un procedimiento para diagnosticar una enfermedad relacionada con priones.

15 *Diagnóstico y tratamiento*

También se describen procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con priones que comprende administrar a un animal uno o más reactivos de peptoide, o composiciones del mismo, como se describe en el presente documento. La invención también proporciona procedimientos para determinar un nivel de infección de enfermedad relacionada con priones en un animal, que puede usarse para hacer un diagnóstico y evaluar la necesidad de tratamiento o prevención. Si el tratamiento o prevención es necesario, puede o puede no ser para la enfermedad relacionada con priones. Es decir, si se determina que no está presente infección por prión, el tratamiento o prevención puede ser necesario para una enfermedad, trastorno, condición o síntoma relacionado con no priones. Un tratamiento tal puede ser, por ejemplo, un medicamento convencional. La invención también proporciona procedimientos de identificación de la localización de la infección relacionada con priones.

El término "tratamiento" o "tratar" como se usa en el presente documento significa curar, mejorar o invertir el progreso de una enfermedad o trastorno, o mejorar o invertir uno o más síntomas o efectos secundarios de tal enfermedad o trastorno.

El término "administrar" como se usa en el presente documento significa administrar directamente el reactivo de peptoide o composición del mismo, que proporcionará una cantidad eficazmente terapéutica del reactivo de peptoide en el animal receptor.

35 Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de reactivo de peptoide activo, o composición, que provoca la respuesta biológica o medicinal que se está buscando en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, doctor médico u otro profesional clínico, que incluye uno o más de lo siguiente:

40 (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede tener predisposición a la enfermedad, afección o trastorno, pero que todavía no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad;

45 (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno; y

(3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, invertir la patología y/o sintomatología) tal como disminuir la gravedad de la enfermedad.

50 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende obtener una muestra del animal; detectar a presencia de un prión patógeno según cualquiera de los procedimientos de detección de la invención; y determinar el nivel de infección por enfermedad por priones a partir de la presencia o ausencia del prión patógeno detectado.

55 En algunas realizaciones se proporciona un procedimiento de determinación de una localización de una infección por enfermedad relacionada con priones en un animal, en el que el procedimiento comprende administrar al animal reactivo de peptoide de la invención, o composición del mismo, en el que el reactivo de peptoide está ligado a un agente de obtención de imágenes; y detectar el agente de obtención de imágenes, localizando así la infección por enfermedad relacionada con priones en el animal.

60 En algunas realizaciones de un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con priones en un animal, el procedimiento comprende determinar la presencia de uno o más priones patógenos en el animal según un procedimiento de detección de la invención; luego administrar uno o más reactivos de peptoide de la invención, o composiciones que comprenden el mismo, al animal tras una determinación de que a uno o más priones patógenos están presentes; o administrar uno o más medicamentos convencionales al animal tras una determinación de que uno o más priones patógenos no están presentes. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende

5 administrar uno o más medicamentos convencionales al animal tras la determinación de que una infección por enfermedad relacionada con priones está presente. En algunas realizaciones, la muestra para la prueba comprende materia orgánica, células, sangre completa, una fracción de sangre, un componente de la sangre, plasma, una plaqueta, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), tejido de cerebro, tejido del sistema nervioso, tejido de músculo, tejido de músculo y grasa, médula ósea, orina, lágrimas, o tejido no del sistema nervioso.

10 En algunas realizaciones del procedimiento para tratar o prevenir enfermedad relacionada con priones en un animal, el procedimiento comprende administrar al animal una primera dosis que comprende un reactivo de peptoide de la invención, o composición que comprende el mismo, y administrar al animal una segunda dosis que comprende un reactivo de peptoide de la invención, o composición que comprende el mismo, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el animal. Una "respuesta inmunitaria" como se usa en el presente documento es el desarrollo en el animal de una respuesta inmunológica humoral y/o celular a un reactivo de peptoide tal como cuando el reactivo de peptoide está presente en una vacuna. Por tanto, la respuesta inmunitaria generalmente produce el desarrollo en el animal de una respuesta inmunitaria secretora, celular y/o mediada por anticuerpo. 15 Normalmente, una respuesta tal incluye, pero no se limita a, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos de cualquiera de las clases inmunológicas tales como inmunoglobulinas A, D, E, G o M, la proliferación de linfocitos B y T, la provisión de señales de activación, crecimiento y diferenciación a células inmunológicas, y la expansión de linfocitos T colaboradores, linfocitos T supresores y/o linfocitos T citotóxicos. La cantidad de anticuerpos producida variará dependiendo de varios factores que incluyen el animal implicado, el número de dosis de la composición administrada, la presencia de un adyuvante, etc. 20

25 Algunas composiciones de reactivo de peptoide de la invención comprenden además un adyuvante. En algunas de tales realizaciones del procedimiento para tratar o prevenir enfermedad relacionada con priones en un animal, la primera dosis y/o la segunda dosis comprenden al menos un adyuvante. En algunas de tales realizaciones, tanto la primera como la segunda dosis comprenden un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes útiles en las dosis y composiciones de la invención incluyen aquellos en el documento WO05/016127.

30 En algunas realizaciones del procedimiento para tratar o prevenir enfermedad relacionada con priones en un animal, el animal ha sido diagnosticado como infectado con un prión patógeno. En algunas realizaciones, el animal ha estado en estrecha proximidad con un segundo animal que ha sido diagnosticado como infectado con un prión patógeno. "Estrecha proximidad" se refiere al animal que está en la misma manada o comunidad de animales, en la misma granja, rancho o similares, o que es transportado, procesado, etc., con el animal diagnosticado. En algunas realizaciones, el animal es un miembro de la familia de un segundo animal que ha sido diagnosticado como infectado con un prión patógeno. En algunas realizaciones, el animal presenta síntomas asociados a una enfermedad relacionada con priones. En algunas realizaciones, el animal está en riesgo de una enfermedad relacionada con priones. Un animal "en riesgo" puede ser uno que tiene una predisposición, genéticamente o de otro modo, por ejemplo, medioambientalmente, hacia el desarrollo, contracción, recepción, exposición a o similares, una enfermedad relacionada con priones. Una predisposición medioambiental incluye, por ejemplo, un animal en una manada o comunidad que está viviendo en un área, geográficamente o físicamente, en la que ha habido exposición a una enfermedad relacionada con priones. En algunas realizaciones, el animal en riesgo es una cría de un animal infectado o que se sospecha que está infectado con un prión patógeno. En algunas realizaciones, el animal en riesgo ha ingerido materiales biológicos derivados de un segundo animal, en el que el segundo animal está infectado con o está en riesgo de una enfermedad relacionada con priones. 40

45 Una composición que comprende la primera dosis puede ser igual o diferente a la de la segunda dosis. En algunas realizaciones, la composición de la segunda dosis es la misma que la de la primera dosis. En algunas realizaciones, las composiciones de la primera y segunda dosis son diferentes. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además administrar un medicamento convencional. En algunas realizaciones, el medicamento convencional comprende anticuerpos, oligonucleótidos, compuestos orgánicos o peptidomimético. En algunas realizaciones, el medicamento convencional es un antígeno o agente inmunorregulador tal como inmunoglobulinas, citocinas, linfocinas y quimiocinas que incluyen, pero no se limitan a, interleucina 2 (IL-2), IL-2 modificada (cys125-ser125), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 12 (IL-12), interferón alfa o gamma, quimiocina IP-10 y β -quimiocinas tales como RANTES, MIP1- α y MIP1- β . 50

55 El animal en cualquiera de los procedimientos de tratamiento y prevención de la invención comprende seres humanos o seres no humanos. Para animales no humanos, el animal puede ser salvaje, es decir, sin domesticar, por ejemplo, reno, alce, alce americano, antílope, oso, cabra montesa, llama, visón, caballos, mulas y burros, felinos de caza mayor tales como panteras, leones de montaña, puma, tigres, leones y guepardos, y mamíferos inferiores, por ejemplo, conejos, perros de la pradera, mapaches, mofeta, y similares, o aves; o domesticados, que incluyen, por ejemplo, mascotas domesticadas, por ejemplo, gatos, perros, hurones, conejos, ratas o ratones, animales de granja y ganado, por ejemplo, vacas, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras, caballos, mulas y burros, o aves, por ejemplo, pollos, gallinas, patos, gansos, pavos, y otras aves gallináceas, y animales de laboratorio, por ejemplo, primates no humanos tales como simios superiores, simios inferiores y lémures, y roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas. Animales adecuados para su uso con la invención pueden ser de cualquier edad, que incluye tanto adultos como recién nacidos. En algunas realizaciones, el animal es un mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser no humano. En algunas realizaciones, 65

la composición se administra como se ha descrito anteriormente en este documento. En algunas realizaciones, el mamífero comprende un gato, perro, hurón, conejo, rata, ratón, vaca, toro, oveja, cordero, cerdo, cabra, caballo, mula, asno, reno, alce, oso, visón, puma, león de montaña, simio superior, simio inferior, lémur, hámster o cobaya. En algunas realizaciones, el mamífero comprende vaca, toro, reno, oveja, cordero, cerdo o cabra. En algunas realizaciones, la composición se administra intramuscularmente, intramucosamente, intranasalmente, subcutáneamente, intradérmicamente, transdérmicamente, intravaginalmente, intrarrectalmente, por vía oral o intravenosamente.

Aislamiento, reducción y eliminación

La presente invención también proporciona procedimientos para aislar un prión patógeno de una muestra o reducir la cantidad de un prión patógeno en una muestra.

El procedimiento de aislar un prión patógeno de una muestra comprende proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de la invención; poner en contacto el soporte sólido con la muestra en condiciones que permitan la unión del prión patógeno, si está presente en la muestra, al reactivo de peptoide para formar un complejo, y luego extraer la muestra sin unir, proporcionando así prión patógeno aislado. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además disociar el prión patógeno del complejo.

El procedimiento para reducir la cantidad de prión patógeno en una muestra comprende proporcionar un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de la invención; luego, poner en contacto el soporte sólido con la muestra en condiciones que permitan la unión del prión patógeno, si está presente en la muestra, al reactivo de peptoide del soporte; y recuperar muestra sin unir, proporcionando así muestra con una cantidad reducida del prión patógeno. En algunas realizaciones, la cantidad de prión patógeno se reduce por debajo de un nivel detectable. En algunas realizaciones, la cantidad del prión patógeno se reduce aproximadamente del 80 al 100, aproximadamente del 85 al 100, aproximadamente del 90 al 100, o aproximadamente del 95 al 100%.

La invención proporciona además un procedimiento de preparación de un suministro de sangre que está sustancialmente libre de un prión patógeno, en el que el suministro de sangre comprende muestras de sangre recogidas tales como aquellas de un banco de sangre o aquellas recogidas de un paciente antes de cirugía, por ejemplo, una transfusión de la misma fuente durante la cirugía. El suministro de sangre puede incluir, por ejemplo y sin limitación, sangre completa, plasma, plaquetas o suero. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende detectar la presencia o ausencia de prión patógeno en una pluralidad de muestras según un procedimiento de detección de la invención, y combinar las muestras en las que el prión patógeno no es detectado, proporcionando así el suministro de sangre que está sustancialmente libre del prión patógeno. En algunas realizaciones, el procedimiento de detección de la invención comprende permitir que un reactivo de peptoide se una al prión patógeno, si está presente, para formar un complejo, y detectar la presencia del prión patógeno en la muestra por su unión al reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, la unión del prión patógeno al reactivo de peptoide puede detectarse detectando la formación del complejo, formación del complejo que es indicativa de la presencia del prión patógeno. En algunas realizaciones, el complejo que comprende el reactivo de peptoide y la proteína priónica patógena se separa del resto de la muestra (es decir, la muestra sin unir) antes de la detección. En algunas realizaciones, la formación del complejo puede detectarse detectando el prión patógeno en el complejo o disociando el complejo (después de la separación de la muestra sin unir) y detectar el prión patógeno disociado.

La invención también proporciona un procedimiento de preparación de un suministro de alimentos tal como un suministro de carne (por ejemplo, tejido de músculo y graso (es decir, carne) de ganado vacuno, oveja o cerdo, por ejemplo, res, cordero, carnero o cerdo usado para consumo humano o animal) que está sustancialmente libre de priones patógenos. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende detectar la presencia o ausencia de prión patógeno en una pluralidad de muestras según un procedimiento de detección de la invención, y combinar las muestras en las que el prión patógeno no se ha detectado, proporcionando así el aporte de alimento que está sustancialmente libre del prión patógeno. En algunas realizaciones, el aporte de alimento se recoge de un organismo vivo o que vivió alguna vez que entrará en el suministro de alimentos o de alimento previsto para entrar en el suministro de alimentos. En algunas realizaciones, el procedimiento de detección de la invención comprende permitir que un reactivo de peptoide se una al prión patógeno, si está presente, para formar un complejo, y detectar la presencia del prión patógeno en la muestra por su unión al reactivo de peptoide. En algunas realizaciones, la unión del prión patógeno al reactivo de peptoide puede detectarse detectando formación del complejo, formación del complejo que es indicativa de la presencia del prión patógeno. En algunas realizaciones, el complejo que comprende el reactivo de peptoide y la proteína priónica patógena se separa del resto de la muestra (es decir, la muestra sin unir) antes de la detección. En algunas realizaciones, la formación del complejo puede detectarse detectando el prión patógeno en el complejo o disociando el complejo (después de la separación de la muestra sin unir) y detectar el prión patógeno disociado.

Diseño

Adicionalmente se desvela un procedimiento de diseño de un reactivo de peptoide de la invención. Como punto de partida, el reactivo de peptoide puede diseñarse basándose en las secuencias de ciertos fragmentos de péptido de

una proteína priónica (por ejemplo, fragmentos de péptido que tienen SEC ID N° 12- 228) haciendo sustituciones de residuos de aminoácidos en la secuencia del fragmento de péptido con glicinas N-sustituidas, síntesis del péptido modificado usando procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. n° 5.811.387, 5.831.005, 5.877.278, 5.977.301 y 6.033.631, además de Simon y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367, probando péptido modificado para unirse a proteínas priónicas patógenas mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Pueden hacerse sustituciones adicionales según el siguiente esquema de sustitución hasta que se logre un reactivo de peptoide adecuado.

Además, el diseño del reactivo de peptoide puede comprender aspectos del *Protocolo de síntesis de submonómeros en fase sólida para peptoides* descrito en el Ejemplo 5 más adelante.

En algunas realizaciones, el procedimiento de preparación de un reactivo de peptoide de la invención comprende:

a) proporcionar un fragmento de péptido de una proteína priónica; sustituir un primer aminoácido de un fragmento de péptido con una glicina N-sustituida por el siguiente esquema de sustitución:

i) Ala, Gly, Ile, Leu, Pro y Val se sustituyen con N-(alquil)glicina, N-(aralquil)glicina o N-(heteroarilalquil)glicina;

ii) Asp, Asn, Cys, Gln, Glu, Met, Ser y Thr se sustituyen con N-(hidroxialquil)glicina, N-(alcoxi)glicina, N-(aminoalquil)glicina o N-(guanidinoalquil)glicina;

iii) Phe, Trp y Tyr se sustituyen con N-(aralquil)glicina, N-(heteroarilalquil)glicina, N-(hidroxialaralquil)glicina o N-(alcoxiaralquil)glicina; y

iv) Arg, His y Lys se sustituyen con N-(aminoalquil)glicina o N-(guanidinoalquil)glicina;

b) sustituir un segundo aminoácido del fragmento de péptido con una glicina N-sustituida según la Etapa a);

c) sustituir un tercer aminoácido del fragmento de péptido con una glicina N-sustituida según la Etapa a); y

d) opcionalmente, repetir la Etapa c) 1-27 veces, proporcionando así un reactivo de peptoide diseñado que comprende 3 a 30 glicinas N-sustituidas; y, sintetizar el reactivo de peptoide diseñado.

En algunas realizaciones del procedimiento anterior, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227 y 228.

En algunas realizaciones del procedimiento anterior, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 66, 67, 68, 72, 81, 96, 97, 98, 107, 108, 109, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 110, 56, 57, 65, 82, 84, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 278, 279, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225 y 228.

En algunas realizaciones del procedimiento anterior, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 12, 14, 50, 51, 52, 68, 72, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 y 219.

En algunas realizaciones del procedimiento anterior, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 14, 50, 51, 52, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191,

192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218 y 219.

5 En algunas realizaciones del procedimiento anterior, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 12, 68, 72, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159 y 160.

10 En algunas realizaciones del procedimiento de diseño para el reactivo de peptoide, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 12, 14, 50, 51, 52, 67, 68, 72 y 109. En algunas realizaciones, el fragmento de péptido comprende un péptido que tiene una secuencia de SEC ID N°: 14 ó 68.

15 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además añadir al reactivo de peptoide un resto conjugado seleccionado de una molécula efectora, un sustrato o una marca, cada uno opcionalmente unido al reactivo de peptoide mediante un resto de ligador. En algunas realizaciones, el resto conjugado comprende biotina. En algunas realizaciones, el resto conjugado comprende un grupo mercapto.

20 *Otros usos*

También se desvela un soporte sólido que comprende al menos un reactivo de peptoide de la invención. El soporte sólido puede ser como se ha descrito previamente anteriormente en este documento. Adicionalmente se desvela un kit para detectar la presencia de un prión patógeno en una muestra. En algunas realizaciones, el kit comprende un reactivo de peptoide de la invención. En algunas realizaciones, el kit comprende un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de la invención. En algunas realizaciones, el kit comprende un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de la invención, y un reactivo. El reactivo puede ser, por ejemplo, un reactivo de detección tal como un anticuerpo detectablemente marcado, cromóforo, cromógeno, un reactivo de unión a prión tal como anticuerpos antiprionicos, polipéptidos híbridos con motivos injertados, polímeros catiónicos o aniónicos, catalizadores de propagación y plasminógeno, o un tampón. En algunas realizaciones, el kit comprende dos o más reactivos de peptoide de la invención. En algunas realizaciones del kit, controles positivos y/o negativos están opcionalmente incluidos.

35 Con el fin de que la invención desvelada en el presente documento pueda entenderse más eficientemente, se proporcionan los ejemplos a continuación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

40 Secuencias de la región de peptoide

La Tabla 1 enumera regiones de peptoide de ejemplo (dirección amino a carboxi) adecuadas para preparar reactivos de peptoide de la presente invención. La Tabla 2 proporciona una clave para las abreviaturas usadas en la Tabla 1. La Tabla 3 proporciona las estructuras relevantes de cada una de las secuencias. Los reactivos de peptoide que contienen las secuencias de la Tabla 1 se probaron para la unión preferencial a PrP^{Sc}, según los ensayos descritos en el presente documento. Las preparaciones de los reactivos específicos se describen más adelante en el presente documento.

Tabla 1: Regiones de peptoide representativas para reactivos de peptoide de la invención.

50

Secuencia de la región de peptoide	SEC ID N°
Nab-Nab-Nab-Nab-Nab	229
Nab-Nab-Ngb-Nspe-Nab-Nspe	230
Nae-Nmpe-Nmpe-Nae-Nmpe-Nmpe-Nae-Nmpe-Nmpe	231
Nme-Ntrp-Nme-Nab-Nspe-Nhye-Nab-Nspe-Nhye-Nme	232
Nspe-Nab-Nspe-Nab-Nspe-Nspe-Nab-Nspe-Nab-Nspe-Nspe	233
Nbn-Nab-Nbn-Nab-Nbn-Nbn-Nab-Nbn-Nab-Nbn-Nbn	234
Nme-Nab-Nme-Nab-Nnm-Nme-Nab-Nnm-Nab-Nme-Nme	235
Nme-Nab-Nme-Nab-Nme-Nme-Nab-Nme-Nab-Nme-Nme	236
Nab-Nab-Nab-Nspe-Nab-Nspe	237
Nab-Nspe-Nab-Nab-Nspe-Nab	238
Nab-Nab-Nab-Nspe-Nab-Nspe	239
Nab-Nab-Nab-Nbn-Nab-Nbn	240
Nme-Nbn-Nme-Nbn-Nme-Nbn	241

Tabla 2: Clave de abreviaturas clave para la Tabla 1.

Abreviatura del residuo de peptido	Sustituto de aminoácido
Ntyr	N-(2-(4-hidroxifenil)etil)glicina
Nhph	N-(4-hidroxifenil)glicina
Nspe	(S)-N-(1-feniletil)glicina
Nme	N-(2-metoxietil) glicina
Ncpm	N-(ciclopropilmetil)glicina
Ntrp	N-(2-3'-indoliletil)glicina
Nab	N-(4-aminobutil)glicina
Nmpe	N-(2-(4-metoxifenil)etil)glicina
Ndmb	N-(3,5-dimetoxibencil)glicina
Nbn	N-bencilglicina
Nhye	N-(2-hidroxietil)glicina
Nip	N-isopropilglicina

5

Tabla 3: Estructuras relevantes de regiones de peptido de la Tabla 1.

SEC ID N°:	Estructura
229	
230	
231	
232	
233	
234	
235	
236	

237	
238	
239	
240	
241	

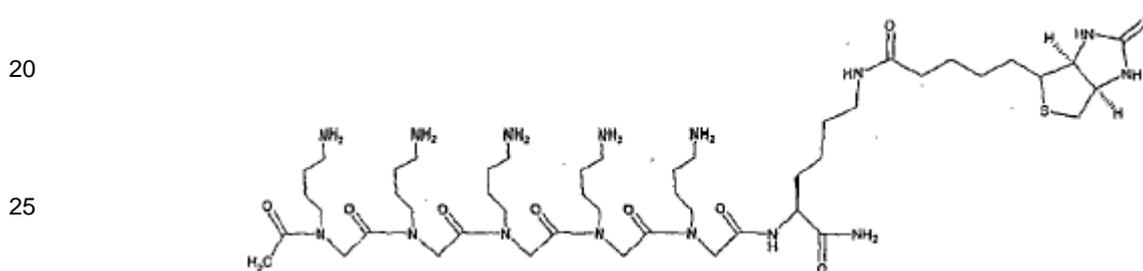
Ejemplo 2

Reactivos de peptoides

5 Los siguientes reactivos de peptoides se prepararon usando procedimientos sintéticos para la preparación de moléculas de peptoides que contienen residuos de glicina N-sustituidos tal como los procedimientos desvelados en las patentes de EE.UU. n° 5.811.387, 5.831.005, 5.877.278, 5.977.301 y 6.033.631, además de Simon y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sd. USA 89: 9367, y usando el protocolo descrito en el Ejemplo 5. Cada uno de los siguientes reactivos se probó para afinidad de unión por una proteína priónica según los ensayos descritos en el presente documento.

Reactivo de peptoides I

15 El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 229.



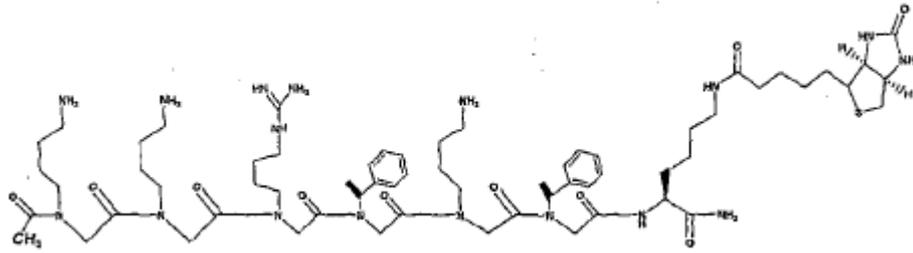
30 Masa calculada: 1054,42; masa observada: 1054,2. Todas las mediciones de masa observada se midieron en un sistema de EM/CL Micromass ZQ de Waters (Milford, MA).

35 *Reactivo de peptoides II*

El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 230.

40

5



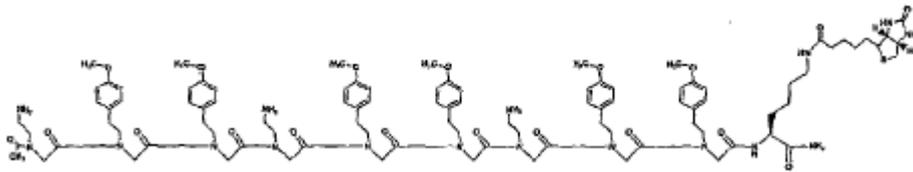
10

15 Masa calculada: 1290,70; masa observada: 1290,8.

Reactivo de peptoido III

El siguiente reactivo de peptoido comprende SEC ID N°: 231.

20



25

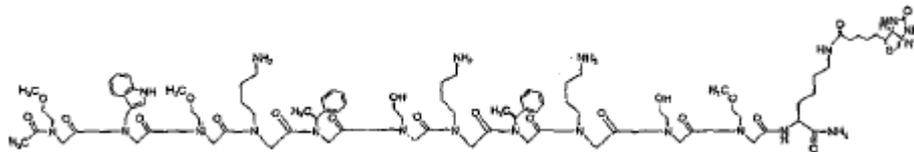
30

Masa calculada: 1861,30; masa observada: 1861,6.

Reactivo de peptoido IV

35 El siguiente reactivo de peptoido comprende SEC ID N°: 232.

40

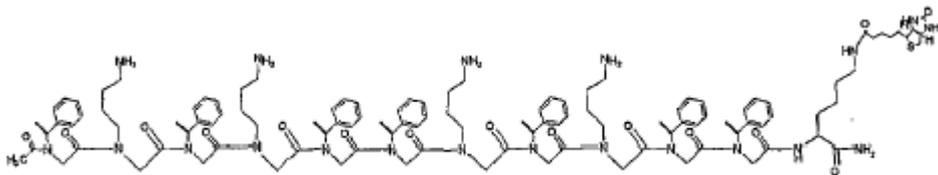


45

Reactivo de peptoido V

El siguiente reactivo de peptoido comprende SEC ID N°: 233.

50



55

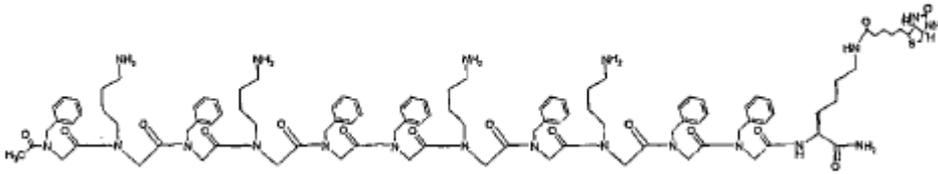
60

Reactivo de peptoido VI

El siguiente reactivo de peptoido comprende SEC ID N°: 234.

65

5



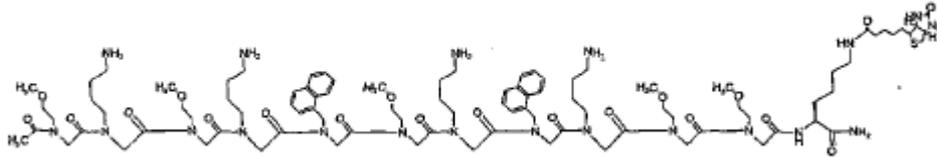
Masa calculada: 1956,49; masa observada: 1956,2.

10

Reactivo de peptoides VII

El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 235.

15



20

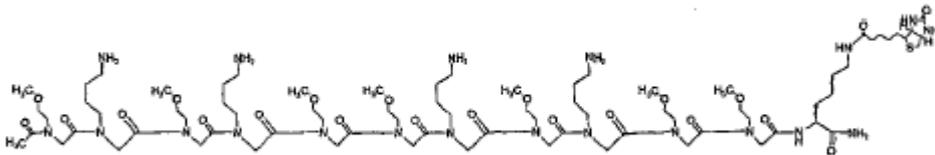
Masa calculada: 1896,39; masa observada: 1896,4.

25

Reactivo de peptoides VIII

El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 236.

30



35

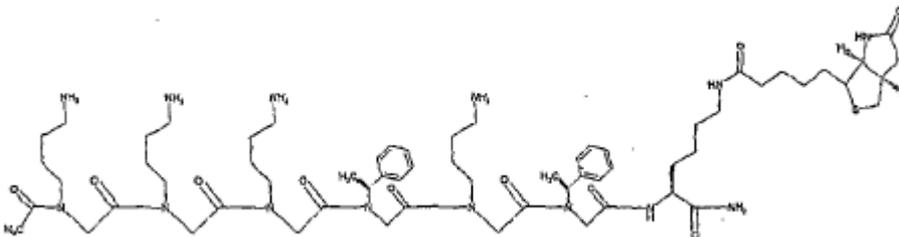
Masa calculada: 1732,18; masa observada: 1732,4.

40

Reactivo de peptoides IX

El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 237.

45



50

55

Masa calculada: 1248,65; masa observada: 1248,4.

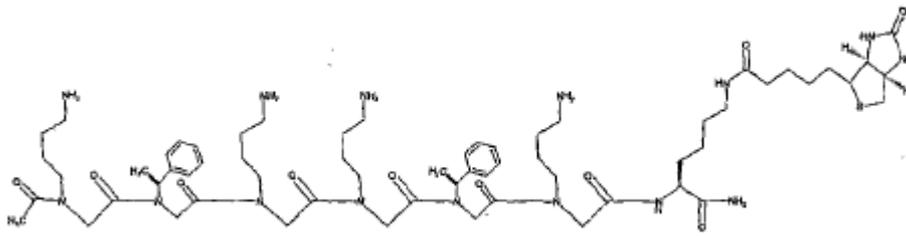
Reactivo de peptoides X

60

El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 238.

65

5



10

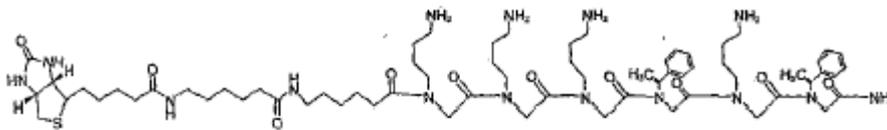
Masa calculada: 1248,65; masa observada: 1248,4.

Reactivo de peptoides XIa y XIb

15

Los siguientes reactivos de peptoides, XIa y XIb, comprenden SEC ID N°: 239.

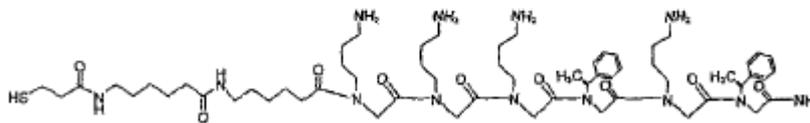
20



25

XIa

30



XIb.

35

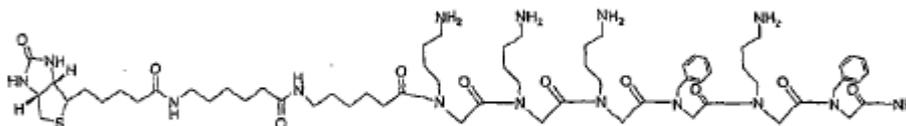
XIa: Masa calculada: 1304,76; masa observada: 1304,6. XIb: Masa calculada: 1166,59; masa observada: 1166,2.

Reactivo de peptoides XIIa y XIIb

40

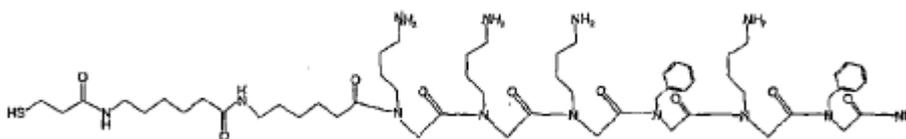
Los siguientes reactivos de peptoides de fórmula XIIa y XIIb comprenden SEC ID N°: 240.

45



XIIa

50



XIIb.

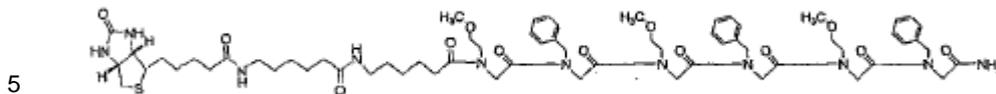
60

Masa calculada: 1276,71; masa observada: 1276,6.

Reactivo de peptoides XIII

65

El siguiente reactivo de peptoides comprende SEC ID N°: 241.



Masa calculada: 1256,58; masa observada: 1256,6.

10 Ejemplo 3

Ensayos de unión

15 *Ensayo de captura*

Reactivos de peptoide del Ejemplo 2 se probaron para su capacidad para unirse específicamente a proteínas priónicas patógenas usando un ensayo de captura de perlas magnéticas. Para este ensayo, reactivos de peptoide se unieron a perlas magnéticas en una de dos formas: 1) los reactivos de peptoide se marcaron con biotina, que permitió la unión a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina o 2) los peptoides se ligaron covalentemente a perlas magnéticas mediante un ácido tiolpropiónico. El modo de unión del reactivo de peptoide a las perlas tuvo poco efecto covalente sobre la actividad de unión del reactivo de peptoide; sin embargo, cuando los reactivos de peptoide se unieron covalentemente a las perlas, se observó menos interferencia de fondo de las muestras de sangre usadas como diluyente. Las perlas magnéticas se obtuvieron de Dynal (Brown Deer, WI). Normalmente, diez microlitros (10 μ l) de estreptavidina Dynabeads® M-280 (n° de cat. 112.05) se usaron para la reacción de una sola captura usando reactivo de peptoide biotinilado.

Homogeneizados de cerebro humano (10% en peso/volumen en sacarosa 0,25 M) de paciente fallecidos de ECJ y de individuos fallecidos sanos (es decir, sin ECJ) se obtuvieron del Instituto nacional para patrones y controles biológicos (NIBSC), Blanche Lane South Mimms, Pottersbar, Reino Unido. Para la mayoría de los experimentos descritos en el presente documento, las muestras de 3 pacientes con ECJ (un paciente con nvECJ y dos pacientes con sECJ) se combinaron y los ensayos se llevaron a cabo sobre las muestras de homogeneizado de cerebro combinadas. Alícuotas de 200 μ l se diluyeron 1:1, vol:vol, en tampón TBS (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 y NaCl 37,5 mM) que contenía 1% de Triton X-100 y 1% de Tween-20 y las muestras se sonicaron durante varias repeticiones de varios segundos cada una. Las alícuotas de homogeneizado de cerebro se mantuvieron en -70°C.

Para evaluar la unión del reactivo de peptoide a PrP^{Sc}, homogeneizados de cerebro con ECJ se enriquecieron en plasma humano de un individuo sano. En general se usaron dos muestras de control negativo: 1) plasma humano normal y 2) plasma humano normal enriquecido con homogeneizado de cerebro humano normal (sin ECJ). La concentración de ensayo estándar de plasma humano varió del 0 hasta el 80% del volumen de muestra total.

En un protocolo típico, para una prueba de captura (100 μ l finales en un pocillo de placa de microtitulación de 96 pocillos) se usan 10 μ l de estreptavidina Dynabeads® M-280 (n° de cat. 112.05). La cantidad apropiada de perlas se lavan una vez antes de uso con TBS que contiene 1% de Tween-20 y 1% de Triton X-100 (TBSTT). Los sedimentos de perlas se resuspenden en 10 veces el volumen original, es decir, 100 μ l con TBSTT. Después, 0,1 μ l de mezcla madre de reactivo de peptoide biotinilado (10 mM en H₂O) se añade a la disolución de perlas, se mezcla a TA, 750 rpm (Eppendorf, Thermomixer R) durante 1 h o 30 min a 750 rpm a 37°C. Los sobrenadantes que contienen peptoides sin unir se desechan y las perlas se lavan tres veces usando TBS y 0,05% de Tween-20 (TBST) usando un aparato de imán que mantiene las perlas en el fondo del tubo. En esta etapa se obtienen las perlas magnéticas de estreptavidina recubiertas con reactivo de peptoide. A continuación, las perlas magnéticas recubiertas con peptoide (que representan el volumen de partida en μ l original) se mezclan con diversas concentraciones de 10% de homogeneizado de cerebro con ECJ en presencia de plasma (concentración final del 0-80%), 1 x TBS, 1% de Triton X-100 y 1% de Tween-20 a un volumen final de 100 μ l. Un volumen de reacción típico es 100 μ l por pocillo de placa de 96 pocillos. La placa se agita a 750 rpm (Eppendorf, Thermomixer R) durante 1 h a 37°C. Las perlas se lavan para eliminar la proteína no unida, cuatro veces con disolución de TBS que contiene 0,05% de Tween-20, usando lavador de placas ELx405 Magna (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Este lavador de placas de microtitulación está específicamente diseñado para aplicaciones que usan tecnología de perlas magnéticas. Un segundo vehículo posiciona la placa de imán próxima al fondo de la microplaca, asegurando las perlas magnéticas durante los ciclos de aspiración críticos.

60 *ELISA*

Tras el lavado final del ensayo de captura, PrP^{Sc} se eluye de las perlas, se desnaturaliza y se detecta con anticuerpos anti priónicos monoclonales (mAb) en formato de ELISA (enzimoinmunoensayo adsorbente). En un formato de ensayo (un ELISA indirecto), la detección de mAb anti priónico, que es proporcional a la cantidad unida a PrP^{Sc}, se logra con anticuerpo policlonal secundario que reconoce el monoclonal primario. El anticuerpo secundario

está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Cuando se incubaba con sustrato de quimioluminiscencia, la enzima rompe un compuesto químico produciendo emisión de luz que se mide por un lector de quimioluminiscencia de microplacas convencional. Las unidades medidas se definen como unidades relativas de luz (URL). En el segundo formato (un ELISA directo), la detección se hace usando anticuerpos anti priónicos monoclonales (mAb) que están conjugados con fosfatasa alcalina, por tanto, no se necesita anticuerpo secundario. El mismo sustrato de quimioluminiscencia (Lumi-Phos Plus de Lumingen, Inc.) se usa para ambos formatos. También pueden usarse formatos de ELISA de sándwich, como se describe en el presente documento. El ELISA puede llevarse a cabo en distintos formatos, por ejemplo, sobre placas, sobre perlas, sobre partículas magnéticas. El prión eluido desnaturalizado puede recubrirse pasivamente sobre el soporte sólido o puede unirse en una disposición de tipo sándwich de anticuerpo-antígeno, estando el anticuerpo anti priónico recubierto sobre el soporte sólido.

Resultados

Los resultados de ensayos de unión de ELISA se resumen a continuación.

La mayoría de los reactivos de peptido representativos de la invención probados tienen eficiencia de unión similar a la del péptido de SEC ID N°: 68. En estudios previos, el péptido de SEC ID N°: 68 tuvo buena eficiencia de unión para proteínas priónicas (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 11/056.950, presentada el 11 de febrero de 2005) y, por tanto, se usó como punto de referencia para medir las eficiencias de unión de los reactivos de peptido de la invención. Los datos en la Tabla 4 muestran las señales obtenidas en ensayos de captura/ELISA usando diversos reactivos de peptido en comparación con un reactivo de péptido (SEC ID N°: 68, descrita en las solicitudes del mismo solicitante n° de serie de EE.UU. 10/917.646, presentada el 13 de agosto de 2004, n° de serie de EE.UU. 11/056.950, presentada el 11 de febrero de 2005, y solicitud internacional PCT/US2004/026363, presentada el 13 de agosto de 2004.) Se muestran señales de una muestra de 1 µl de un 10% de homogeneizado de cerero con ECJ o de una muestra de 1 µl de un 10% de homogeneizado de cerero normal, ambos en 70% de plasma. La columna más a la derecha informa de la media experimental de ensayos del reactivo de peptido como % de la media experimental del ensayo del péptido SEC ID N°:68.

Tabla 4: Unión en porcentaje de reactivos de peptido representativos en 70% de plasma humano en comparación con péptido de SEC ID N°: 68.

Péptido o peptido por SEC ID N°	Media de control (1 ul de 10% de HC normal)	Media exp. (1 ul de 10% de HC con ECJ)	DE* exp	Media exp. (como % de 68)
Perla de estreptavidina (sin control de péptido)	16,4	21,1	3,7	5,0
68	19,2	852,7	72,0	100,0
237	20,1	1039,4	41,0	121,9
239	16,9	1024,2	41,7	120,1
240 (XIIa)	21,4	1044,4	60,4	122,5
241	15,4	28,0	1,2	3,3

*DE = desviación estándar.

Tabla 5: Unión en porcentaje de reactivos de peptido representativos en 70% de plasma humano en comparación con péptido de SEC ID N°: 68.

Péptido o peptido por SEC ID N°	Media de control (1 ul de 10% de BH normal)	Media exp. (1 ul de 10% de HC con ECJ)	DE* exp	Media exp. (como % de 68)
Perla de estreptavidina (sin control de péptido)		11,2	1,2	2,7
68		418,4	30,1	100,1
230 (II)	7,02	463,5	24,8	110,8
237 (IX)	9,47	528,8	24,9	126,5
238 (X)	7,28	478,7	44,5	114,5

*DE = desviación estándar.

Tabla 6: Unión en porcentaje de reactivos de peptoide representativos en 20% de plasma humano en comparación con péptido de SEC ID N°: 68.

Péptido o peptoide por SEC ID N°	Media	DE*	Media (% de 68)
Perla de estreptavidina (sin control de péptido)	2,38	0,82	2,79
68	84,98	13,55	100,00
14	4,74	1,23	5,58
229	88,64	7,19	104,31
230	106,10	5,58	124,85
231	1,83	0,43	2,15
234	8,32	1,33	9,79
235	8,85	1,93	10,42
236	1,47	0,30	1,73

*DE = desviación estándar.

5 Como se muestra en las Tablas 4 y 5, en 70% de plasma, muchos de los reactivos de peptoide representativos probados tienen una mayor afinidad de unión que el del péptido de punto de referencia, SEC ID N° 68, y frecuentemente de aproximadamente el 10 al 25% mayor. Las Tablas 4 y 5 también muestran la especificidad de los reactivos de peptoide para la forma patógena de la proteína priónica (se espera que sólo esté presente la forma no patógena de la proteína priónica en los homogeneizados de cerebro normal). La Tabla 6 muestra los resultados de ensayos de captura/ELISA con reactivos de peptoide en homogeneizados de cerebro con ECJ diluidos en 20% de plasma humano.

15 Tabla 7: Unión en porcentaje de un reactivo de peptoide representativo unido directamente a perlas magnéticas en 70% de plasma humano en comparación con péptido de SEC ID N°: 68.

Péptido o peptoide covalentemente unido a perlas magnéticas por SEC ID N°	Media	DE*	Media (% de 68)
68	137,9	21,29	100,0
240 (XIIb)	174,3	10,51	126,4

*DE = desviación estándar.

20 El reactivo de peptoide que comprende SEC ID N°: 240 (XIIb) se unió covalentemente a perlas magnéticas, los péptidos que comprenden SEC ID N°:68 también se unieron covalentemente a perlas magnéticas. Los reactivos covalentemente unidos se usaron en una reacción de captura/ELISA como se ha descrito anteriormente para los reactivos de peptoide biotinilados y péptidos unidos a las perlas SA. La unión covalente de los reactivos a las perlas no afectó significativamente la capacidad de las perlas para interactuar preferencialmente con los priones patógenos.

25 **Especificidad de reactivos por la forma patógena**

30 Como se muestra en las Tablas 4 y 5 anteriores, los reactivos de peptoide pueden capturar PrP^{Sc} que está presente en homogeneizados de cerebro humanos de pacientes con ECJ, pero no capturan ninguna de las PrP^C presentes en plasma humano o en el homogeneizado de cerebro humano normal de control. Experimentos adicionales que comparan la unión de los reactivos de peptoide con homogeneizados de cerebro con ECJ y homogeneizados de cerebro normal (es decir, sin ECJ) se muestran a continuación.

35 Tabla 8. Unión de reactivos de peptoide a 2 microlitros de 10% de homogeneizado de cerebro normal o con ECJ en 70% de plasma humano.

Péptido o peptoide por SEC ID N°	Homogeneizado de cerebro humano enriquecido			
	Unión a plasma			
	Media normal	DE normal	Media con ECJ	DE con ECJ
229 (I)	3,31	0,3	124,47	20,21

40

45

Tabla 9. Unión de reactivos de peptoide a 0,1 microlitros de 10% de homogeneizado de cerebro con ECJ o 1 microlitro de 10% de homogeneizado de cerebro humano normal en 70% de plasma humano.

Péptido o peptoide por SEC ID N°	Homogeneizado de cerebro humano enriquecido Unión a plasma			
	Media normal	DE normal	Media con ECJ	DE con ECJ
239 (XIa)	16,91	1,68	147,49	32,33
239 (XIb)	33,28	0,65	255,51	2,91
240 (XIIa)	21,42	0,59	187,89	12,74
241 (XIII)	15,43	2,6	17,36	2,57

5 Los experimentos en la Tabla 10 se llevaron a cabo sobre una muestra de homogeneizado de cerebro con vECJ humano en vez de una mezcla de HC con vECJ y sECJ.

Tabla 10. Unión del reactivo de peptoide 240 (XIIb) covalentemente unido a perlas magnéticas a homogeneizado de cerebro normal o con vECJ en 70% de plasma humano.

10

Unión de reactivo de peptoide SEC ID N° 240 (XIIb) a	Media	DE
	7,5 nl de 10% de homogeneizado de cerebro con vECJ humano	121,1
2,5 nl de 10% de homogeneizado de cerebro con vECJ humano	57,3	8,2
0,833 nl de 10% de homogeneizado de cerebro con vECJ humano	49,2	3,4
15 nl de 10% de homogeneizado de cerebro con vECJ humano	13,2	2,9

Tabla 11. Unión del reactivo de peptoide 240 (XIIb) covalentemente unido a perlas magnéticas.

Unión de reactivo de peptoide SEC ID N° 240 (XIIb) a	Media	DE
	Tampón TBS	278,5
Tampón TBSTT	264,3	24,9
TBSTT con 70% de plasma humano	269,5	32,9
TBSTT con 70% de plasma humano que contiene 20 nl de 10% homogeneizado de cerebro humano normal	306,4	41,3
TBSTT con 70% de plasma humano que contiene 20 nl de 10% de homogeneizado de cerebro humano con ECJ	1390,8	76,0

15 En el transcurso de estos experimentos se observó que ciertas muestras de sangre humana contuvieron aparentemente algún material que interfirió con la reacción de unión y produjo menores señales cuando aquellos plasmas se usaron como diluyentes. Los experimentos de comparación se llevaron a cabo con reactivos de peptoide que se unieron covalentemente a las perlas magnéticas y los mismos reactivos de peptoide unidos a las perlas magnéticas mediante unión con biotina-estreptavidina (Tabla 12 frente a Tabla 13). Los reactivos de peptoide
20 covalentemente acoplados fueron mucho menos sensibles a variaciones en las muestras de sangre usadas como diluyente.

Tabla 12: Ensayos de captura usando reactivo de peptoide biotinilado representativo unido a perlas magnéticas de estreptavidina en diversos plasmas humanos.

25

Peptoide SEC ID N° 240 (XIIa) con plasma humano	Media	DE*	Media (% de control)
Plasma humano de control	1109,67	80,93	100,0
Lote de plasma humano KC011886	441,40	38,74	39,78
Lote de plasma humano KC011892	406,60	64,93	36,64
Lote de plasma humano KC28719	720,50	102,03	64,93
Lote de plasma humano KC032907	458,50	151,48	41,32

*DE = desviación estándar.

Tabla 13: Ensayos de captura usando reactivo de peptoide representativo unido directamente a perlas magnéticas en diversos plasmas humanos.

30

Peptoide SEC ID N° 240 (XIIb) con plasma humano	Media	DE*	Media (% de control)
Plasma humano de control	154,99	52,13	100,0
Lote de plasma humano KC011886	205,80	12,50	132,78
Lote de plasma humano KC011892	197,63	11,57	127,51
Lote de plasma humano KC28719	195,33	33,42	126,03
Lote de plasma humano KC032907	193,77	30,12	125,02

*DE = desviación estándar.

Los ensayos en la Tabla 12 usaron 2,5 X más homogeneizado de cerebro con ECJ que los ensayos en la Tabla 13. El control de plasma humano fue el mismo para cada conjunto de experimentos y se mostró previamente que no contenía el material interferente. Los resultados muestran que el reactivo de peptoide covalentemente acoplado no muestra ninguna interferencia en la unión cuando se usan diferentes plasmas con respecto al control de plasma (y de hecho muestra mayores señales que el plasma de control) en comparación con el peptoide biotinilado unido a las perlas SA que muestran señales mucho menores en varios plasmas diferentes.

Se llevaron a cabo ensayos de captura/ELISA similares a aquellos descritos anteriormente para muestra humana sobre una variedad de muestras de diferentes especies de animales que incluyen ratón, hámster sirio y oveja (se probaron tanto homogeneizado de cerebro como muestras de sangre de ovejas con tembladera y ovejas normales). Para cada una de estas especies, la forma patógena de la proteína priónica de esas especies se detectó en muestras de animales enfermos, pero no de animales no enfermos usando el reactivo de peptoide de la invención.

Ejemplo 4 - ELISA de sándwich

Se desarrolló un ELISA de sándwich para medir PrP^C presente en muestras de sangre humana. Para determinar los niveles de PrP^C presente en plasma humano, los presentes inventores realizaron ELISA de sándwich usando cantidades conocidas de proteína PrP humana recombinante (rPrP) para desarrollar una curva patrón (Fig. 1B). La cantidad de PrP^C en cantidades crecientes de plasma humano se determinó usando la curva patrón con rPrP (Fig. 1A). Para el ELISA de sándwich, placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con el mAb SAF32 (llamado anticuerpo de "captura"). Este anticuerpo se une a la región de octa-repetición de PrP humana, residuos 23-90, y se unirá a PrP^C de longitud completa y los residuos de PrP^{Sc} desnaturalizada 23-231. La placa se bloqueó con caseína durante 1 h a 37°C. Para determinar los niveles de PrP^C en plasma humano, diferentes cantidades de plasma se añadieron a las placas recubiertas con SFA32 y se incubaron durante 2 h a 37°C sin agitación. Las placas se lavaron y se añadió anticuerpo 3F4 (anticuerpo que se une a los residuos de PrP humana 109-112) conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (anticuerpo de "detección", 3F4-AP) durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron y se añadió sustrato de quimioluminiscencia y se contaron unidades de luz después de 30 min de incubación a 37°C. Para cuantificar la cantidad de PrP^C, los presentes inventores incubaron las placas recubiertas con SAF-32 con concentraciones crecientes de PrP humana recombinante usando el mismo formato de ELISA de sándwich. Usando la curva patrón de rPrP, los presentes inventores midieron que la concentración de PrP^C en este lote de plasma humano era aproximadamente 488 pg / 70 µl.

Usando este mismo ELISA de sándwich, los presentes inventores evaluaron la especificidad de sus reactivos de peptoide para capturar PrP^{Sc} o PrP^C de una muestra de sangre humana. El reactivo de peptoide XIIb se conjugó covalentemente con perlas magnéticas (ácido carboxílico Dynabeads M-270) como se ha descrito. Las perlas acopladas a reactivo de peptoide se mezclaron durante 1 hora en 100 µl de ensayo que contenía 70 µl de plasma humano, 1% de Tween-20, 1% de Triton X-100 y TBS. Para investigar la captura específica de PrP^{Sc}, los presentes inventores repitieron el experimento con plasma enriquecido con 0,05 µl de 10% de homogeneizado de cerebro (HC) preparado a partir de paciente diagnosticado con vECJ y como control de individuo normal. Después de lavar, las perlas se trataron con 15 µl de GdnSCN 3 M para eluir y desnaturalizar PrP^{Sc}. Para prevenir la desnaturalización del anticuerpo de captura, GdnSCN se diluyó con 210 µl de H₂O y la disolución se añadió a la placa de microtitulación recubierta con SAF32, llevando el volumen total de antígeno a 250 µl. Los presentes inventores llevaron a cabo el experimento con 0,05 µl de tanto 10% de homogeneizado de cerebro normal como 10% de homogeneizado de cerebro con vECJ. Las placas se lavaron y PrP se detectó con 3F4-AP usando un sustrato AP quimioluminiscente (LumiphosPlus). Los presentes inventores encuentran que, aunque la cantidad de PrP^C en plasma, cuando se detecta directamente (es decir, sin ninguna captura), mide aproximadamente 887 UL, la cantidad de PrP^C capturada con las perlas de reactivo de peptoide sólo contribuye a niveles de fondo de 23 UL. Lo mismo es cierto cuando 0,05 µl de HC normal se enriquecen en 70 µl de plasma. Cuando 0,05 µl de HC con vECJ se enriquecieron en 70 µl de plasma, pudo detectarse un aumento de cuatro veces en la señal. Usando rPrP como curva patrón, los presentes inventores encuentran que las perlas de reactivo de peptoide capturaron 47 pg de PrP^{Sc} cuando se enriquecieron en plasma que contenía aproximadamente 488 pg de PrP^C, mientras que el peptoide sólo se unió a 7 pg de PrP^C, sugiriendo un mínimo de 70 veces de enriquecimiento (Tabla 14).

Tabla 14. Captura específica de PrP^{Sc} con perlas de reactivo de peptóide

GdnSCN 3 M				
		LU	pg	
Sin captura	70 ul de plasma (70%)	887,8	487,7	PrPC
Captura	70 ul de plasma (70%)	23,3	6,0	PrPC
Captura	70 ul de plasma (70%) + 50 nl de 10% de HC normal	25,6	7,3	PrPC
Captura	70 ul de plasma (70%) + 50 nl de 10% con HC con vECJ	97,1	47,1	PrPSc

Ejemplo 5 - Desnaturalización por pH con ELISA de sándwich

Como una alternativa a la disociación usando agentes caotrópicos para la disociación y desnaturalización del príon patógeno tras la etapa de captura, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento que usa tanto un pH alto como un pH bajo para efectuar la disociación/desnaturalización. La ventaja de este procedimiento es que, a diferencia de la situación con desnaturalización con GdnSCN, las condiciones de desnaturalización por pH pueden invertirse fácilmente sin aumentar significativamente el volumen en la reacción o introducir etapas de lavado adicionales.

Las capturas se llevaron a cabo como en el Ejemplo 4 con perlas magnéticas acopladas al reactivo de peptóide XIIb con muestras de 0,10 µl de 10% de homogeneizado de cerebro con vECJ enriquecido en 100 µl de disolución que contenía 70% de plasma humano. Después de mezclar durante 1 h a 37°C, las perlas se lavaron y se trataron bajo diversas condiciones de pH como se indica en la Tabla 15. Como control, los presentes inventores usaron GdnSCN 3 M o solución salina con tampón Tris (TBS) a pH 7,5 para tratar las perlas. Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, las disoluciones se llevaron a pH neutro de aproximadamente 7 como se indica en la tabla. El sobrenadante se añadió a placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con SAF32 (anticuerpo de captura) y se incubó durante 12 h a 4°C. El anticuerpo 3F4 marcado con fosfatasa alcalina se usó para la detección como se describe en el Ejemplo 4. Las muestras de captura que se trataron con GdnSCN 3 M para la disociación y desnaturalización de las perlas mostraron una señal del plasma enriquecido en vECJ, pero no del plasma de control, como era de esperar. El tratamiento de las muestras de captura con tampón a pH 7,5 no mostró señal significativa de tanto plasma enriquecido con vECJ como plasma de control, como era de esperar. Las muestras de captura se trataron con disoluciones de diverso pH como se muestra. Varios de los tratamientos de pH alto y pH bajo fueron capaces de disociar y desnaturalizar la proteína priónica de las perlas y el tratamiento a pH 13 fue tan eficiente como GdnSCN 3 M. Significativamente, mientras que el volumen de la muestra de GdnSCN (después de la dilución) fue 225 µl, el volumen de la muestra tratada con pH 13 fue sólo 75 µl después de la neutralización.

TABLA 15

Tratamiento	pH	Neutralización	pH final	Datos de ELISA				
				vECJ + Plasma	Plasma		S/N	
				PROM	DE	PROM		DE
15 µl de GdnSCN 3 M	5,9	210 µl de H ₂ O	6,0	430,4	26,0	37,7	21,8	11
70 µl de TBST	7,5	No necesaria	7,5	25,5	6,8	11,8	0,4	2
pH bajo								
Tratamiento	pH	Neutralización	pH final					
H₃PO₄ (50 µl)		NaOH (25 µl)						
0,00007 M	4	0,0031 N	7	27,0	8,7	26,8	7,8	1
0,00075 M	3	0,031 N	7	26,6	3,2	25,8	3,0	1
0,12 M	2	0,31 N	7	122,5	9,7	92,7	3,7	1
0,5 M	1	3,1 N	7	264,0	33,5	30,4	11,6	9
pH alto								
Tratamiento	pH	Neutralización	pH final					
NaOH (50 µl)		NaH₂PO₄ (20 µl)						
0,0001 M	10	0,0003 M	7	34,8	34,4	197,6	83,8	0
0,001 M	11	0,003 M	7	11,8	0,3	14,6	1,7	1
0,1 M	12	0,03 M	7	76,1	8,1	16,1	2,1	5
0,1 M	13	0,3 M	7	458,1	9,5	15,1	2,6	30

Ejemplo 6 - Desnaturalización por pH con ELISA directo

La disociación y desnaturalización por pH alto y bajo se probaron en combinación con un formato de ELISA directo usando anticuerpo 3F4 marcado con AP para la detección. El procedimiento se llevó a cabo como en el Ejemplo 5 hasta e incluyendo la etapa de neutralización. La PrP en los sobrenadantes se recubrió directamente sobre los pocillos de las placas de microtitulación en un tampón NaHCO₃ a pH 8,9. Las placas se taparon y se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente la placa se lavó, se bloqueó con caseína y la PrP sobre la placa se detectó

con 3F4 marcado con AP usando un sustrato quimioluminiscente. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

TABLA 16

Tratamiento	pH	Neutralización	pH final	Datos de ELISA				
				vECJ + Plasma		Plasma		S/N
				PROM	DE	PROM	DE	
50 µl de GdnSCN 3 M	5,9	50 µl de NaHCO ₃	8,5	60,5	5,7	5,5	1,8	
100 µl de TBST	7,5	No necesaria	7,5	2,2	0,3	2,2	0,1	1
Tratamiento a pH bajo	pH	Neutralización	pH final					
H ₃ PO ₄ (50 µl)		NaOH (25 µl)						
0,00007 M	4	0,0031 N	7	7,6	2,0	8,7	1,0	1
0,00075 M	3	0,031 N	7	21,8	2,4	19,9	1,5	1
0,12 M	2	0,31 N	7	14,6	0,5	8,0	0,3	2
0,5 M	1	3,1 N	7	57,1	6,0	11,9	1,4	5
Tratamiento a pH alto	pH	Neutralización	pH final					
NaOH (50 µl)		NaH ₂ PO ₄ (20 µl)						
0,0001 M	10	0,0003 M	7	2,8	0,3	3,1	0,3	1
0,001 M	11	0,003 M	7	8,8	7,7	3,6	0,6	2
0,1 M	12	0,03 M	7	7,3	1,6	5,1	1,0	1
0,1 M	13	0,3 M	7	36,9	2,3	5,2	1,8	7

5

Ejemplo 7 - ELISA de sándwich sobre perlas magnéticas

Normalmente, el ELISA de sándwich se realiza usando placas de microtitulación de poliestireno con 96 pocillos en las que el anticuerpo de captura se recubre sobre la placa y la posterior unión a antígeno, lavado y la detección se hace en el mismo pocillo. Sin embargo, puede usarse otro formato que utiliza perlas magnéticas como matriz de fase sólida. En este formato, las perlas magnéticas, que están recubiertas con el anticuerpo de captura, se mezclan primero con el antígeno, y después se añade el anticuerpo de detección.

Para probar si el procedimiento de disociación y desnaturalización por pH que desarrollaron los presentes inventores para su uso con la placa ELISA podría usarse igualmente de bien con las perlas magnéticas como soporte sólido, los presentes inventores llevaron a cabo los siguientes experimentos. La captura de PrP^{Sc} de muestras de sangre humana enriquecida usando perlas magnéticas acopladas a reactivo de peptidoide XIIb se realizó como se ha descrito previamente. Las perlas de captura se desnaturalizaron con 50 µl de NaOH 0,1 N y se neutralizaron con NaH₂PO₄ (20 µl). El sobrenadante se transfirió a un pocillo de polipropileno limpio.

A esta disolución, los presentes inventores añadieron nuevas perlas magnéticas que habían sido recubiertas con anticuerpos antiipriónicos como anticuerpos de "captura". Un conjunto de perlas se recubrió con anticuerpo 3F4, otro conjunto de perlas se recubrió con un anticuerpo (C17) que reconoce un epítipo en el extremo C de la proteína priónica entre los residuos 121 y 231. Las perlas recubiertas de anticuerpo y el eluyente de la captura se incubaron durante 2 h. Las perlas se lavaron una vez y se añadió un anticuerpo de detección marcado con AP. El anticuerpo usado para el anticuerpo de detección (C2) es uno que se une a la región de octa-repetición de PrP, residuos 23-90. Las perlas y el anticuerpo de detección se incubaron durante otras 2 h. Entonces, las perlas se lavaron y se añadió sustrato AP quimioluminiscente, se mezcló durante 30 min y la quimioluminiscencia se midió con Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems).

El ELISA usando los mismos anticuerpos de captura y de detección en formato de placa se llevó a cabo para comparación. Los resultados se muestran en la Tabla 17. En ambos formatos, la presencia de PrP^{Sc} en 1 nl de 10% de HC con vECJ se detectó después del enriquecimiento y la captura de disolución de 70 µl de plasma.

35

TABLA 17

vECJ (nl de HC/ensayo)	PLACA							
	Placa de 3F4				Placa de C17			
	UL promedio	DE	% de CV	S/N	UL promedio	DE	% de CV	S/N
10	60,07	8,69	14,47	13,2	124,18	11,49	9,25	2,7
5	19,34	1,11	5,73	4,3	74,71	13,19	17,66	1,6
1	8,90	0,72	8,08	2,0	50,75	4,70	9,27	1,1
0	4,55	1,30	28,61	1,0	45,56	2,40	5,26	1,0

vECJ (n ^o de HC/ensayo)	Perlas				Perlas de C17			
	UL promedio	DE	% de CV	S/N	UL promedio	DE	% de CV	S/N
10	2,83	0,67	23,80	1,7	41,86	10,23	24,43	3,5
5	2,25	0,99	44,01	1,4	26,08	1,49	5,69	2,2
1	3,11	0,63	20,24	1,9	16,53	1,06	6,39	1,4
0	1,62	0,31	18,88	1,0	11,84	0,66	5,59	1,0

Ejemplo 8 - Péptidos útiles para diseñar reactivos de peptoide

- 5 Ejemplos no limitantes de péptidos útiles en la preparación de los reactivos de peptoide de la invención se derivan de las secuencias mostradas en la Tabla 18. Los péptidos en la tabla se representan por códigos de aminoácidos de una letra convencionales y se representan con su extremo amino a la izquierda y el extremo carboxi a la derecha. Cualquiera de las secuencias en la tabla puede incluir opcionalmente ligadores de Gly (G_n en la que n= 1, 2, 3 ó 4) en el extremo amino y/o carboxi. Los aminoácidos en corchetes indican residuos alternativos que pueden usarse en esa posición en diferentes péptidos. Los paréntesis indican que el (los) residuo(s) puede estar presentes o ausentes del péptido reactivo. Los paréntesis dobles (por ejemplo, SEC ID N^o: 111) seguido de un "2" indican que la secuencia incluye dos copias del péptido entre los paréntesis dobles. El residuo que sigue a la designación del número de copias (por ejemplo, "K" en SEC ID N^o: 111) indica el residuo del que se extiende cada copia del péptido entre los paréntesis dobles. Por tanto, SEC ID N^o: 111 es un dímero de secuencias de péptidos QWNKPSKPKTN (es decir, SEC ID N^o: 14), cada uno ligado por su extremo carboxi a un residuo de lisina (K) mediante los grupos funcionales α- y ε-amino de lisina. Secuencias que incluyen "MAPS" indican péptidos con múltiples sitios antigénicos. El número precedente al término "ramas" indica el número de copias. Por tanto, SEC ID N^o: 112 contiene 4 copias de GGGKKRPKPGGWNTGGG, que es SEC ID N^o: 61 con ligadores de Gly en cada extremo, mientras que SEC ID N^o: 113 contiene 8 copias de GGGKKRPKPGGWNTGGG, que de nuevo es SEC ID N^o: 67 con ligadores de Gly en cada extremo.

Tabla 18: Secuencias de péptidos de ejemplo para la preparación de reactivos de peptoide de la invención.

Secuencias de péptidos	SEC ID N ^o
KKRPK	12
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC	13
(GGG)QWNKPSKPKTN	14
QWNKPSKPKTNMKHV	15
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGEN	16
TTKGENFTETD	17
GENFTETD	18
GENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	19
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	20
[A/V/T/M][V/I]LFSSPPVILLISFLIFL[I/M]VG	21
G[N/S]D[W/Y]EDRYREN[M/H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y[S/N]NQNN[N/T]FVH	22
N[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTK	23
VYYR	24
RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]	25
KKRPKPGG(G)WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG	26
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)	27
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG	28
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTN	29
GGTHSQWNKPSKPKTN	30
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG	31
GQPHGGGW	32
RPIHFGSDYEDRYRENMR	33
RPMIHFNDWEDRYRENMYR	34
(GGGG)C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	35
(GGGG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36

ES 2 404 940 T3

GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)	37
[M/L]KH[M/V]	38
KPKTN[M/L]KH[M/V]	39
C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	40
SRPIIFGSDYEDRYRENMHRYPN	41
PMIHFNDWEDRYRENMYRPVD	42
AGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM	43
RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)	44
GGGRPMIHFNDWEDRYRENMYRGG	45
(GG)C(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)C	46
AGAAAAGAVVGGGLGG	47
GGLGG	48
LGS	49
QWNKPSKPKTN(GGG)	50
QWNKPSKPKTN(GGG)QWNKPSKPKTN	51
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	52
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53
GGTHNQWNKPSKPKTN	54
(GGG)AGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM	55
(GGG)AGAAAAGAVVGGGLGG	56
(KKK)AGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM	57
YMLGSAM[S/N]R	58
[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	59
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	60
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]HFG[N/S]D	61
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYP[M/V]D[Q/E/R]Y	62
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYP[M/V]D[Q/E/R]Y[S/N]N QN[N/T]	63
D[Q/E/R]Y[S/N]NQ[N/T]	64
(KKK)AGAAAAGAVVGGGLGG	65
(GGG)KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS	66
(GGG)KKRPKPGGWNTGG	67
(GGG)KKRPKPGG	68
PHGGGWGQHGGSWGQPHGGSWGQ	69
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70
PHGGGWGQ	71
(GGG)KKRPKPGGGKKRPKPGG	72
(GGG)GPKRKGP	73
(GGG)WNTGGSRYPGQGS	74
(GGG)WNKPSKPKT	75
(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GG)C	76
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	77
(GGG)AGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM	78
(GGG)NKPSKPK	79
(GGG)KPSKPK	80
(GGG)KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81
KKKAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMDDD	82
DDDAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAM	83
KKKAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMKKK	84
(GGG)KKKKKKK	85
DDDAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMDDD	86
(GGG)NNKQSPWPTKK	87
DKDKGGV GALAGAAVAAGGDKDK	88
(GGG)QANKPSKPKTN	89
(GGG)QWNKASKPKTN	90
(GGG)QWNKPSKAKTN	91
(GGG)QWNAPSKPKTN	92
(GGG)QWNKPSAPKTN	93
(GGG)QWNKPSKPATN	94
(GGG)QWNKASKAKTN	95
(GGG)KKRAKPGG	96

ES 2 404 940 T3

(GGG)KKRPKAGG	97
(GGG)KKRAKAGG	98
(GGG)QWNKASKPKTN	99
(GGG)QWAKPSKPKTN	100
(GGG)QWNKPAKPKTN	101
(GGG)QWNKPSKPKAN	102
(GGG)QWNKPSKPKTA	103
(GGG)AKRPKPGG	104
(GGG)KARPKPGG	105
(GGG)KKAPKPGG	106
(GGG)KKRPAPGG	107
(GGG)KKAPKAGG	108
(GGG)KKRPKPGGGWNTGG	109
QWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTN	110
((QWNKPSKPKTN))2K	111
4-branchMAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG	112
8-branchMAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG	113
KKKAGAAAAGAVVGGGLGG-CONH2	114
DLGLCKKRPKPGGXWNTGG	115
DLGLCKKRPKPGGXWNTG	116
DLGLCKKRPKPGGXWNT	117
DLGLCKKRPKPGGXWN	118
DLGLCKKRPKPGGXW	119
DLGLCKKRPKPGGX	120
LGLCKKRPKPGGXWNTG	121
LGLCKKRPKPGGXWNT	122
LGLCKKRPKPGGXWN	123
LGLCKKRPKPGGXW	124
LGLCKKRPKPGGX	125
GLCKKRPKPGGXWNTGG	126
GLCKKRPKPGGXWNTG	127
GLCKKRPKPGGXWNT	128
GLCKKRPKPGGXWN	129
GLCKKRPKPGGXW	130
GLCKKRPKPGGX	131
LCKKRPKPGGXWNTGG	132
LCKKRPKPGGXWNTG	133
LCKKRPKPGGXWNT	134
LCKKRPKPGGXWN	135
LCKKRPKPGGXW	136
LCKKRPKPGGX	137
CKKRPKPGGXWNTGG	138
CKKRPKPGGXWNTG	139
CKKRPKPGGXWNT	140
CKKRPKPGGXWN	141
CKKRPKPGGXW	142
CKKRPKPGGX	143
KKRPKPGGXWNTGG	144
KKRPKPGGXWNTG	145
KKRPKPGGXWNT	146
KKRPKPGGXWN	147
KKRPKPGGXW	148
KKRPKPGGX	149
DVGLCKKRPKPGGXWNTGG	150
DVGLCKKRPKPGGXWNTG	151
DVGLCKKRPKPGGXWNT	152
DVGLCKKRPKPGGXWN	153
DVGLCKKRPKPGGXW	154
DVGLCKKRPKPGGX	155
VGLCKKRPKPGGXWNTG	156
VGLCKKRPKPGGXWNT	157
VGLCKKRPKPGGXWN	158
VGLCKKRPKPGGXW	159

ES 2 404 940 T3

VGLCKKRPKPGGX	160
THSQWNKPSKPKTNMKHM	161
THSQWNKPSKPKTNMKH	162
THSQWNKPSKPKTNMK	163
THSQWNKPSKPKTNM	164
THSQWNKPSKPKTN	165
HSQWNKPSKPKTNMKHM	166
HSQWNKPSKPKTNMKH	167
HSQWNKPSKPKTNMK	168
HSQWNKPSKPKTNM	169
HSQWNKPSKPKTN	170
SQWNKPSKPKTNMKHM	171
SQWNKPSKPKTNMKH	172
SQWNKPSKPKTNMK	173
SQWNKPSKPKTNM	174
SQWNKPSKPKTN	175
QWNKPSKPKTNMKHM	176
QWNKPSKPKTNMKH	177
QWNKPSKPKTNMK	178
QWNKPSKPKTNM	179
THSQWNKPSKPKTNMKHV	180
HSQWNKPSKPKTNMKHV	181
SQWNKPSKPKTNMKHV	182
QWNKPSKPKTNMKHV	183
THGQWNKPSKPKTNMKHM	184
THGQWNKPSKPKTNMKH	185
THGQWNKPSKPKTNMK	186
THGQWNKPSKPKTNM	187
THGQWNKPSKPKTN	188
HGQWNKPSKPKTNMKHM	189
HGQWNKPSKPKTNMKH	190
HGQWNKPSKPKTNMK	191
HGQWNKPSKPKTNM	192
HGQWNKPSKPKTN	193
GQWNKPSKPKTNMKHM	194
GQWNKPSKPKTNMKH	195
GQWNKPSKPKTNMK	196
GQWNKPSKPKTNM	197
GQWNKPSKPKTN	198
THGQWNKPSKPKTNMKHV	199
HGQWNKPSKPKTNMKHV	200
GQWNKPSKPKTNMKHV	201
THNQWNKPSKPKTNMKHM	202
THNQWNKPSKPKTNMKH	203
THNQWNKPSKPKTNMK	204
THNQWNKPSKPKTNM	205
THNQWNKPSKPKTN	206
HNQWNKPSKPKTNMKHM	207
HNQWNKPSKPKTNMKH	208
HNQWNKPSKPKTNMK	209
HNQWNKPSKPKTNM	210
HNQWNKPSKPKTN	211
NQWNKPSKPKTNMKHM	212
NQWNKPSKPKTNMKH	213
NQWNKPSKPKTNMK	214
NQWNKPSKPKTNM	215
NQWNKPSKPKTN	216
THNQWNKPSKPKTNMKHV	217
HNQWNKPSKPKTNMKHV	218
NQWNKPSKPKTNMKHV	219
PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ	220
GGWGGGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHM	221
QWNKPSKPKTNMKHMGGGQWNKPSKPKTNMKHM	222

Entonces, el grupo Fmoc se elimina añadiendo 2 ml de 20% de piperidina en DMF a la resina. Ésta se agita durante 1 minuto, luego se drena. Otros 2 ml de 20% de piperidina en DMF se añaden a la resina y se agitan durante 20 minutos, luego se drena. Entonces, la resina se lava con DMF (5 x 2 ml).

5 **Escisión (para 50 μ moles de resina).** Después de la reacción de síntesis y el lavado de la resina, la resina se lava con diclorometano (2 x 2 ml) y se seca al aire durante un minuto. La resina secada se coloca en un vial de centelleo de vidrio que contiene una microbarra de agitación de teflón, y se añaden aproximadamente 5 ml de TFA/triisopropilsilano/agua 95/2,5/2,5 (v/v/v). Esta disolución se agita durante 15 minutos. Filtrar la mezcla de escisión para cada muestra mediante una columna de extracción en fase sólida (SPE) de 8 ml equipada con una frita de polietileno de 20 μ m en un tubo de centrifuga cónico de polipropileno de 50 ml. Entonces, la resina se lava con 1 ml de 95% de TFA y los filtrados se combinan. Entonces, el filtrado se diluye con un volumen igual de agua en el tubo de centrifuga. Entonces, esta disolución se congela y se liofiliza a sequedad. Entonces, el producto seco se recoge en 10 ml de 1 : 1 de acetonitrilo/ácido acuoso y de nuevo se liofiliza a sequedad.

15 **Caracterización de oligómeros.** Oligómeros de peptoide individuales se analizan por HPLC en fase inversa sobre columnas C-18 (Vydac, 5 μ m, 300 Å, 4,5 x 250 mm). Un gradiente lineal del 0-80% de B en 40 min se usa a una velocidad de flujo de 1 ml/min (disolvente A= 0,1% de TFA en agua, disolvente B = 0,1% de TFA en acetonitrilo). Los picos principales se recogen y se envían a análisis de EM por electropulverización para determinar los pesos moleculares.

20 **Purificación de peptoides.** Los peptoides se purifican por HPLC en fase inversa antes de uso por los biólogos. Normalmente, estos compuestos se analizan y se purifican sobre columnas C18. Por tanto, los compuestos se disuelven en una pequeña cantidad de 10% de acetonitrilo/agua y se purifican sobre una columna C18 de 50 x 20 mm DI DuraGel HS (Peeke Scientific). Se usa un gradiente lineal de 5-65% de B en 40 min a una velocidad de flujo de 30 ml/min (disolvente A= 0,1% de TFA en agua, disolvente B = 0,1% de TFA en acetonitrilo). Las fracciones combinadas de producto se combinan y se liofilizan dando un polvo blanco.

Ejemplo 10

30 Eficiencia de captura del reactivo de peptoide XIIb

La capacidad del reactivo de peptoide XIIb unido covalentemente a perlas se probó por el ensayo de captura como se describe más adelante. Homogeneizado de cerebro (BH) con vECJ o normal se enriqueció en 50% de plasmas humanos reunidos en TBS con 1% de Tween-20 y 1% de Triton-X 100. Las muestras de control no se concentraron en ninguno. Entonces, 100 μ l de cada muestra (que contenía 10 nl o nada de 10% de HC) se mezclaron con 3 μ l de XIIb-perlas (30 mg/ml) y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 1 h con agitación constante a 750 rpm. Las perlas se lavaron a continuación cuatro veces con TBST que contenía 0,05% de Tween20, y la PrP^{Sc} unida a perlas se disoció mediante la adición de NaOH 0,1 N. La proteína priónica desnaturalizada se neutralizó después por NaH₂PO₄ 0,3 M y se transfirió a placa de ELISA.

La eficiencia de captura se calculó comparando las señales de las muestras de captura con aquellas de muestras idénticas que se desnaturalizaron por tiocianato de guanidinio (GdnSCN) sin ninguna captura. La proteína priónica de cerebro con vECJ o normal se desnaturalizó mezclando volumen igual de 5% de HC y GdnSCN 6 M, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Entonces, la muestra se diluyó en TBST a la misma concentración de muestras de captura, con TBST sólo como control. 100 μ l de cada muestra directamente desnaturalizada se transfirieron después a la misma placa de ELISA para muestras de captura.

La placa de ELISA se recubrió por anticuerpo de captura 3F4 a 2,5 μ g/ml en NaHCO₃ 0,1 M. El procedimiento de recubrimiento se realizó a 4°C durante la noche, y luego se lavó tres veces con TBST. La placa se bloqueó a continuación con 1% de caseína en TBS a 37°C durante 1 h. La proteína priónica de muestras tanto de captura como directamente desnaturalizadas se incubó en placa de ELISA con 3F4 durante 1 h 37°C, con agitación constante a 300 rpm, y la placa se lavó seis veces con TBST. El anticuerpo de detección conjugado con fosfatasa alcalina (AP) se diluyó a 0,1 μ g/ml en 0,1% de caseína en TBST, y luego se añadió a placa de ELISA. La placa se incubó después a 37°C durante 1 h, y se lavó seis veces con TBST. La señal se reveló usando sustrato luminescente Lumi-Phos Plus potenciado y se leyó por luminómetro en unidades relativas de luz (URL).

Los resultados se muestran en la Tabla 19. La proteína priónica de tejido de cerebro puede desnaturalizarse completamente por GdnSCN 3 M y detectarse por su anticuerpo. En este experimento, los presentes inventores compararon la señal generada por la captura de la proteína priónica usando XIIb-perlas con la señal obtenida de proteína directamente desnaturalizada por GdnSCN. Los datos mostraron que el ruido (sin HC) para muestras de captura y directamente desnaturalizadas fue 9,0 y 7,7 URL, respectivamente. 10 nl directamente desnaturalizados de 10% de HC normal tuvieron una señal de 14,6 URL, reflejando el nivel de PrPc en cerebro normal. Mientras tanto, 10 nl de 10% de HC normal detectado por el procedimiento de captura mostraron la lectura de 9,9 URL, que es similar a su ruido. Esto demostró la especificidad del peptoide XIIb. Cuando 10 nl de 10% de muestra de vECJ se probaron por el procedimiento de captura y de desnaturalización directa, los datos mostraron 53,0 y 56,3 URL, que significa

que la eficiencia de la captura de XIIb-perlas alcanzó casi el 100%.

Tabla 19

	BH de vECJ			BH normal			Sin BH		
	prom	de	% de cv	prom	de	% de cv	prom	de	% de cv
Captura	53,0	6,5	12,3	9,9	0,8	8,0	9,0	1,1	12,3
No captura	56,3	2,6	4,6	14,6	0,7	4,5	7,7	2,3	29,4

5

Ejemplo 11

Cepas de priones diferentes

10

Pueden detectarse diferencias estructurales entre cepas de priones midiendo sus diferentes propiedades termodinámicas de desplegamiento. La incubación de PrP^{Sc} con concentraciones crecientes de desnaturizante químico puede producir un perfil de desnaturalización del confórmero de prión que es característico de cada cepa. Estudios previos usaron resistencia a proteinasa K (PK) para medir la proporción de PrP^{Sc} que siguió plegada después del tratamiento con desnaturizante. Aquí se probó si el reactivo de peptoide XIIb también podría usarse para distinguir PrP^{Sc} plegada y sin plegar, permitiendo así la medición de estados conformacionales en cepas sensibles a PK en las que los perfiles de desnaturalización no pueden medirse mediante procedimientos convencionales.

15

20

Para generar un perfil de desnaturalización para una cepa de vECJ, un homogeneizado de cerebro con vECJ (NIBSC CJD Resource Centre) se incubó con diversas concentraciones de clorhidrato de guanidina antes de diluir las muestras y someterlas a captura usando reactivo de peptoide XIIb (véase el Ejemplo 3 y la descripción de captura de XIIb más adelante). Entonces, el material unido a XIIb se eluyó y se detectó por ensayo de ELISA de sándwich. Una representación gráfica de PrP^{Sc} capturada a cada concentración de desnaturizante demostró que la concentración de clorhidrato de guanidina era inversamente proporcional a la fracción de PrP^{Sc} plegada capturada por XIIb. Los puntos de datos formaron una única curva sigmoide que sugirió la existencia de un confórmero de PrP^{Sc} en el homogeneizado de cerebro que se despliega a una mayor transición (véase la Figura 4, puntos blancos). Por tanto, se cree que XIIb reconoce un epítotope estructural sobre PrP^{Sc} que se rompe tras el tratamiento con desnaturizante químico. El análisis de una cepa de ECJ esporádica (sECJ, NIBSC CJD Resource Centre) produjo una curva sigmoide similar que se desplazó a la derecha del perfil de desnaturalización para vECJ (véase la Figura 4, puntos grises), que ilustra que se cree que el epítotope estructural reconocido por XIIb es más estable en la cepa de sECJ cuando se compara con la cepa de vECJ. El análisis de cada cepa dio coherentemente el patrón equivalente, permitiendo la definición de la curva con un valor característico como medida de la estabilidad conformacional relativa de PrP^{Sc}: la concentración de GdnHCl encontrada a la desnaturalización al 50% (GdnHCl_{1/2}). El perfil de desnaturalización de vECJ tuvo una GdnHCl_{1/2} de GdnHCl 1,6 M. Por el contrario, un homogeneizado de cerebro con sECJ fue más estable a la desnaturalización con guanidina, con una GdnHCl_{1/2} de GdnHCl 2,0 M. Por tanto, XIIb puede usarse como herramienta para analizar minuciosamente la variabilidad conformacional entre cepas de priones.

25

30

35

40 *Captura de XIIb*

Homogeneizado de cerebro infeccioso (75-200 nl, 10%) se desnaturizó en disoluciones de guanidina que oscilan en concentraciones de 0 - 4 M durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la desnaturalización, todas las muestras se ajustaron a una concentración final de clorhidrato de guanidina 0,1 M en TBSTT, y la PrP^{Sc} plegada se capturó con perlas de XIIb usando procedimientos de captura convencionales. El material capturado se eluyó y se midió por ensayo de ELISA de sándwich por triplicado con anticuerpos de captura C17 y anticuerpos de detección 3F4-AP.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

50

<110> Chiron Corporation

<120> REACTIVOS DE PEPTOIDE ESPECÍFICOS PARA PRIÓN

55

<130> 20366-047WO1

<150> US 60/715,761

<151> 2005-09-09

60

<150> US 60/726,686

<151> 2005-10-14

ES 2 404 940 T3

<150> US 60/758,934
 <151> 2006-01-13

<160> 241
 5 <170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 253
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

<210> 2
 45 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2
 50

55

60

65

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

35 <210> 3
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 3

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

ES 2 404 940 T3

5 <210> 4
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Mesocricetus auratus

10 <400> 4

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

40 <210> 5
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 46, 155
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

50 <400> 5

55

60

65

5 Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
 20 25 30
 Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Xaa Pro Gly
 35 40 45
 10 Gly Asn Thr Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 50 55 60
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 65 70 75 80
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
 85 90 95
 15 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Thr His Gly Gln Trp Asn
 100 105 110
 Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala
 115 120 125
 Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser
 130 135 140
 20 Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Xaa Asp Tyr Glu Asp Arg
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg
 165 170 175
 Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val
 180 185 190
 25 Asn Ile Thr Val Lys Glu His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu
 195 200 205
 Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln
 210 215 220
 Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg
 225 230 235 240
 30 Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile
 245 250 255
 Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
 260 265

35 <210> 6
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Ovis aries

40 <400> 6
 Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
 20 25 30
 Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
 35 40 45
 Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 50 55 60
 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly
 85 90 95
 55 Gly Ser His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
 100 105 110
 Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 115 120 125
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe
 130 135 140
 60 Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr
 145 150 155 160
 Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Arg Tyr Ser Asn Gln Asn
 165 170 175
 Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val
 180 185 190
 65 Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile
 195 200 205
 Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu
 210 215 220
 Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser
 225 230 235 240
 Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
 245 250 255

ES 2 404 940 T3

5 <210> 7
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 7

```

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

```

40 <210> 8
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Cervus elaphus

45 <400> 8

50

55

60

65

5

```

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

```

10

15

20

25

30

<210> 9
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Dama dama
 <400> 9

40

```

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

```

45

50

55

60

65

ES 2 404 940 T3

5 <210> 10
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> *Odocoileus hemionus*
 10 <400> 10

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

40
 <210> 11
 <211> 256
 <212> PRT
 45 <213> *Odocoileus virginianus*
 <400> 11

50

55

60

65

ES 2 404 940 T3

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

<210> 12
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 40 <400> 12

45 Lys Lys Arg Pro Lys
 1 5

<210> 13
 <211> 22
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 13

60 Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp
 1 5 10 15
 Ser Asp Leu Gly Leu Cys
 20

<210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 404 940 T3

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 14

5 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 15

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15

<400> 15

20 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val
1 5 10 15

<210> 16

<211> 28

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

30

<220>

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> Xaa = Asn o Thr

35

<220>

<221> VARIANTE

<222> 15

<223> Xaa = Ile o Val

40

<220>

<221> VARIANTE

<222> 17

<223> Xaa = Gln o Glu

45

<400> 16

50 Asn Gln Asn Asn Xaa Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Xaa Lys
1 5 10 15
Xaa His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
20 25

<210> 17

55 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 17

65 Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp
1 5 10

5 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 18

15
 Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp
 1 5

20 <210> 19
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Val o Ile

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Met o Ile

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 21
 <223> Xaa = Ile o Val

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 25
 <223> Xaa = Glu o Gln

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 32
 <223> Xaa = Gln o Asp

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 36
 <223> Xaa = Gly o Ser

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 37
 <223> Xaa = Ser o Ala

<400> 19
 65

ES 2 404 940 T3

		Gly	Glu	Asn	Phe	Thr	Glu	Thr	Asp	Xaa	Lys	Xaa	Met	Glu	Arg	Val	Val
		1				5					10					15	
5		Glu	Gln	Met	Cys	Xaa	Thr	Gln	Tyr	Xaa	Glu	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Xaa
				20					25						30		
		Gly	Arg	Arg	Xaa	Xaa	Ser										
				35													

5 <210> 20
 10 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 15 <223> Péptido generado sintéticamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 20 <223> Xaa = Asn o Thr

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 15, 46
 25 <223> Xaa = Ile o Val

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 17
 30 <223> Xaa = Gln o Glu

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 34
 35 <223> Xaa = Val o Ile

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 36
 40 <223> Xaa = Met o Ile

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 50
 45 <223> Xaa = Glu o Gln

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 57
 50 <223> Xaa = Gln o Asp

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 61
 55 <223> Xaa = Gly o Ser

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 62
 60 <223> Xaa = Ser o Ala

 <400> 20

ES 2 404 940 T3

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

10
 <210> 21
 <211> 22
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Ala, Val, Thr o Met

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = Val o Ile

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 20
 <223> Xaa = Ile o Met

35 <400> 21

40 Xaa Xaa Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu
 1 5 10 15
 Ile Phe Leu Xaa Val Gly
 20

45 <210> 22
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 55 <222> 2
 <223> Xaa = Asn o Ser

<220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> 4
 <223> Xaa = Trp O Tyr

<220>
 <221> VARIANTE
 65 <222> 14
 <223> Xaa = His o Tyr

ES 2 404 940 T3

- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 25
 5 <223> Xaa = Met o Val
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 27
 10 <223> Xaa = Gln, Glu o Arg
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 29
 15 <223> Xaa = Ser o Asn
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 33
 20 <223> Xaa = Asn o Thr
- <400> 22
- 25
 Gly Xaa Asp Xaa Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Xaa Arg Tyr
 1 5 10 15
 Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Xaa Asp Xaa Tyr Xaa Asn Gln Asn
 20 25 30
 Xaa Phe Val His
 35
- 30 <210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- <220>
 <221> VARIANTE
 40 <222> 2
 <223> Xaa = Asn o Thr
- <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> 12
 <223> Xaa = Ile o Val
- <220>
 <221> VARIANTE
 50 <222> 14
 <223> Xaa = Gln o Glu
- <400> 23
- 55
 Asn Xaa Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Xaa Lys Xaa His Thr
 1 5 10 15
 Val Thr Thr Thr Thr Lys
 20
- 60 <210> 24
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 65 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<400> 24

5 Val Tyr Tyr Arg
1

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15 <220>

<221> VARIANT

<222> 11

<223> Xaa = Met o Val

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> 13

<223> Xaa = Gln, Glu o Arg

25 <400> 25

Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Xaa Asp Xaa
. 1 5 10

30

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

40 <400> 26

40

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg
1 5 10 15
Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30
Gly

45

<210> 27

50

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 27

60

Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15
Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly
20 25

65

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

ES 2 404 940 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26
 <223> Xaa = Gly o Thr
 10
 <400> 28

```

Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly
1      5      10
Asn Arg Tyr Pro Gln Gly Gly Gly Xaa Trp Gly Gln Pro His Gly
20      25      30
Gly
  
```

<210> 29
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 29

```

Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro
1      5      10      15
Ser Lys Pro Lys Thr Asn
20
  
```

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 30

```

Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1      5      10      15
  
```

<210> 31
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26
 <223> Xaa = Gly o Thr

<400> 31

```

Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly
1      5      10      15
Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Xaa Trp Gly Gln Pro His
20      25      30
Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35      40      45
Gly Gly
  
```

ES 2 404 940 T3

5 <210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 10 <400> 32

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp
 1 5

15 <210> 33
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 25 <400> 33

Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Met His Arg

30 <210> 34
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 40 <400> 34

Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Met Tyr Arg
 20

45 <210> 35
 <211> 38
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 35

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His
 20 25 30
 Val Gly Gly Gly Cys
 35

65 <210> 36
 <211> 30
 <212> PRT

ES 2 404 940 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9
 <223> Xaa = Met o Val
 5
 <400> 39

Lys Pro Lys Thr Asn Xaa Lys His Xaa
 1 5

10 <210> 40
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 40

20 Cys Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp
 1 5 10 15

25 Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Cys

<210> 41
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35
 <400> 41

40 Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn
 20 25

<210> 42
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 50
 <400> 42

55 Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu
 1 5 10 15
 Asn Met Tyr Arg Pro Val Asp
 20

<210> 43
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 65

ES 2 404 940 T3

<400> 43

5 Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
 1 5 10 15
 Met Leu Gly Ser Ala Met
 20

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15 <400> 44

20 Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg
 1 5 10 15
 Glu Asn Met Tyr Arg Gly Gly Gly
 20

25 <210> 45

<211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 45

35 Gly Gly Gly Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Gly Gly
 20 25

<210> 46

40 <211> 31

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 46

50 Gly Gly Cys Gly Gly Gly Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp
 1 5 10 15
 Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Gly Gly Gly Cys
 20 25 30

<210> 47

<211> 15

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

60 <400> 47

65 Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 48

ES 2 404 940 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 48

10 Gly Gly Leu Gly Gly
 1 5

<210> 49
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 49

25 Leu Gly Ser
 1

<210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 50

35 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 51
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

45 <400> 51

50 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Gly Gly Gly Gln Trp
 1 5 10 15
 Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 20 25

<210> 52
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60 <400> 52

65 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly

<210> 53
 <211> 22
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 10 <400> 53

```

Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro
 1      5      10      15
Ser Lys Pro Lys Thr Asn
                20
    
```

<210> 54
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 25 <400> 54

```

Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 1      5      10      15
    
```

<210> 55
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 55

```

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1      5      10      15
Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met
                20      25
    
```

<210> 56
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 50 <400> 56

```

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1      5      10      15
Gly Gly
    
```

<210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 65 <400> 57

ES 2 404 940 T3

Lys Lys Lys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met
 20 25

5
 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 15
 <222> 8
 <223> Xaa = Ser o Asn

<400> 58

20
 Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Xaa Arg
 1 5

<210> 59
 <211> 6
 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Ser o Asn
 35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> Xaa = Met Ile o Leu
 40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa = Ile o Leu
 45
 <400> 59

Xaa Arg Pro Xaa Xaa His
 1 5

50
 <210> 60
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 60
 <222> 8
 <223> Xaa = Ser o Asn

<220>
 <221> VARIANTE
 65
 <222> 11
 <223> Xaa = Met, Ile o Leu

ES 2 404 940 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 5 <223> Xaa = Ile o Leu

 <400> 60

 Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Xaa Arg Pro Xaa Xaa His
 10 1 5 10

 <210> 61
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 20

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 <223> Xaa = Ser o Asn
 25

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Met, Ile o Leu
 30

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Ile o Leu
 35

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 16
 <223> Xaa = Asn o Ser
 40

 <400> 61

 Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Xaa Arg Pro Xaa Xaa His Phe Gly Xaa
 45 1 5 10 15
 Asp

 <210> 62
 <211> 25
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Trp o Tyr
 55

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = His o Tyr
 60

 <220>
 <221> VARIANTE
 65

ES 2 404 940 T3

<222> 22
 <223> Xaa = Met o Val

<220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> 24
 <223> Xaa = Gln, Glu o Arg

<400> 62
 10

	Xaa	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Met	Xaa	Arg	Tyr	Pro	Asn	Gln
15	1				5					10					15	
	Val	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Xaa	Asp	Xaa	Tyr							
				20					25							

<210> 63
 <211> 30
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa = Trp o Tyr

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = His o Tyr

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 22
 <223> Xaa = Met o Val

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 24
 <223> Xaa = Gln, Glu o Arg

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26
 <223> Xaa = Ser o Asn

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 30
 <223> Xaa = Asn o Thr

55 <400> 63

	Xaa	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Met	Xaa	Arg	Tyr	Pro	Asn	Gln
60	1				5					10					15	
	Val	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Xaa	Asp	Xaa	Tyr	Xaa	Asn	Gln	Asn	Xaa		
				20					25					30		

<210> 64
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 404 940 T3

<223> Péptido generado sintéticamente

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> 2

<223> Xaa = Gln, Glu o Arg

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 4

<223> Xaa = Ser o Asn

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> 8

<223> Xaa Asn o Thr

<400> 64

20

Asp Xaa Tyr Xaa Asn Gln Asn Xaa
1 5

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

30 <400> 65

Lys Lys Lys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
1 5 10 15
Gly Gly

35

<210> 66

<211> 24

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

45 <400> 66

Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly
1 5 10 15
Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser
20

50

<210> 67

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 67

60

Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly
1 5 10 15

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

65

ES 2 404 940 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

5

<400> 68

Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
1 5 10

10

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 69

20

Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro
1 5 10 15
His Gly Gly Ser Trp Gly Gln
20

25

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 70

35

Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln

40

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 71

50

Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln
1 5

55

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

60

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

60

<400> 72

65

Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro
1 5 10 15
Lys Pro Gly Gly
20

ES 2 404 940 T3

<210> 73
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 73
 10
 Gly Gly Gly Gly Pro Lys Arg Lys Gly Pro Lys
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 20
 <400> 74
 Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser
 1 5 10 15
 25
 <210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 75
 35
 Gly Gly Gly Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 45
 <400> 76
 Gly Gly Gly Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Gly Gly Cys
 20 25
 50
 <210> 77
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 60
 <400> 77
 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly

ES 2 404 940 T3

5 <210> 78
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 78

15 Gly Gly Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met
 20 25

20 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 79

30 Gly Gly Gly Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys
 1 5 10

35 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40 <400> 80

Gly Gly Gly Lys Pro Ser Lys Pro Lys
 1 5

45 <210> 81
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 81

55 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys
 1 5 10 15
 Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 20

60 <210> 82
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<400> 82

5 Lys Lys Lys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Asp Asp
 20 25

<210> 83

<211> 25

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 83

15

Asp Asp Asp Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met

20

20

25

<210> 84

<211> 28

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

30

<400> 84

35 Lys Lys Lys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Lys Lys Lys
 20 25

40 <210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 85

50 Gly Gly Gly Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5 10

<210> 86

<211> 28

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

60 <400> 86

Asp Asp Asp Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Asp Asp Asp
 20 25

65 <210> 87

ES 2 404 940 T3

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 87

10 Gly Gly Gly Asn Asn Lys Gln Ser Pro Trp Pro Thr Lys Lys
 1 5 10

<210> 88
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 20 <400> 88

25 Asp Lys Asp Lys Gly Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly
 1 5 10 15
 Gly Asp Lys Asp Lys
 20

<210> 89
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35 <400> 89

40 Gly Gly Gly Gln Ala Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 90
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 90

50 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Ala Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 91
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 60 <400> 91

65 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Ala Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 92

ES 2 404 940 T3

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 92

10 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Ala Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 93
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 20 <400> 93

25 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Ala Pro Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 94
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35 <400> 94

35 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Ala Thr Asn
 1 5 10

<210> 95
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 45 <400> 95

50 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Ala Ser Lys Ala Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 60 <400> 96

60 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Ala Lys Pro Gly Gly
 1 5 10

65 <210> 97
 <211> 11

ES 2 404 940 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 97

10 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 98
<211> 11
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 98

25 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Ala Lys Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 99
<211> 14
30 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 99

Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Ala Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 100
40 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 100

50 Gly Gly Gly Gln Trp Ala Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 101
<211> 14
55 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 101

Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ala Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

65 <210> 102
<211> 14

ES 2 404 940 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 102

10 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Ala Asn
 1 5 10

<210> 103
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <400> 103

25 Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Ala
 1 5 10

<210> 104
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 104

35 Gly Gly Gly Ala Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
 1 5 10

<210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 105

50 Gly Gly Gly Lys Ala Arg Pro Lys Pro Gly Gly
 1 5 10

<210> 106
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60 <400> 106

65 Gly Gly Gly Lys Lys Ala Pro Lys Pro Gly Gly
 1 5 10

ES 2 404 940 T3

5
 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10
 <400> 107

Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Ala Pro Gly Gly
 1 5 10

15
 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 108

25

Gly Gly Gly Lys Lys Ala Pro Lys Ala Gly Gly
 1 5 10

30
 <210> 109
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 109

40
 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly
 1 5 10 15
 Gly

45
 <210> 110
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 110

Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Gly Gly Gly Gln Trp
 1 5 10 15
 Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys
 20 25 30
 Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 35

60
 <210> 111
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65
 <220>

ES 2 404 940 T3

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 111

5
 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Gln Trp Asn Lys Pro
 1 5 10 15
 Ser Lys Pro Lys Thr Asn Lys
 20

10

<210> 112

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 112

25
 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 113

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 113

40
 Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly

45 <210> 114

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 114

55
 Lys Lys Lys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly

60 <210> 115

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>

ES 2 404 940 T3

<221> VARIANTE
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

5 <400> 115

```

    Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
     1           5           10           15
    Thr Gly Gly
  
```

10

<210> 116
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

25

<400> 116

```

    Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
     1           5           10           15
    Thr Gly
  
```

30

<210> 117
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

45

<400> 117

```

    Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
     1           5           10           15
    Thr
  
```

50

<210> 118
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

65

<400> 118

ES 2 404 940 T3

- Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
1 5 10 15
- 5 <210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
- <400> 119
- Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
1 5 10 15
- 20 <210> 120
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
- 35 <400> 120
- Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
1 5 10
- 40 <210> 121
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
- <400> 121
- Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr
1 5 10 15
Gly
- 55 <210> 122
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
- 65 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 5
 <400> 122

10 Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr
 1 5 10 15

<210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 25
 <400> 123

30 Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10 15

<210> 124
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 45
 <400> 124

 Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10

50 <210> 125
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 125

65 Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
 1 5 10

<210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

15 <400> 126

	Gly	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Pro	Lys	Pro	Gly	Gly	Xaa	Trp	Asn	Thr	Gly
	1				5					10					15	
20	Gly															

<210> 127
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

35 <400> 127

	Gly	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Pro	Lys	Pro	Gly	Gly	Xaa	Trp	Asn	Thr	Gly
	1				5					10					15	

40 <210> 128
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

55 <400> 128

	Gly	Leu	Cys	Lys	Lys	Arg	Pro	Lys	Pro	Gly	Gly	Xaa	Trp	Asn	Thr
	1				5					10					15

60 <210> 129
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 5
 <400> 129

10
 Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10

<210> 130
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 25
 <400> 130

30
 Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10

<210> 131
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

45
 <400> 131

50
 Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
 1 5 10

<210> 132
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 132

65
 Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 404 940 T3

5 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 15 <400> 133

Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr Gly
 1 5 10 15

20 <210> 134
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> 11)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 35 <400> 134

Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr

40 1 5 10

45 <210> 135
 <212> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 55 <400> 135

Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10

60 <210> 136
 <211> 12
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 404 940 T3

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

10 <400> 136

Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10

<210> 137
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 11
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

25 <400> 137

Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
 1 5 10

30 <210> 138
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

45 <400> 138

Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr Gly Gly
 1 5 10 15

50 <210> 139
 <211> 14
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

65 <400> 139

ES 2 404 940 T3

Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr Gly
 1 5 10

- 5 <210> 140
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
- 15 <222> 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 140

Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr
 1 5 10

- 25 <210> 141
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
- 35 <222> 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 141

Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10

- 45 <210> 142
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
- 55 <222> 10
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 142

Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10

- 60 <210> 143
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 65 <220>

ES 2 404 940 T3

<223> Péptido generado sintéticamente

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> 10<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 143

10 Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
1 5 10

<210> 144

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

20

<220>

<221> VARIANTE

<222> 9

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

25

<400> 144

30 Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr Gly Gly
1 5 10

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

40

<220>

<221> VARIANTE

<222> 9

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

45 <400> 145

50 Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr Gly
1 5 10

<210> 146

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

60

<220>

<221> VARIANTE

<222> 9

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

65 <400> 146

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr
1 5 10

ES 2 404 940 T3

5 <210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 9
 15 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 147

20 Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10

<210> 148
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 30 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 35 <400> 148

40 Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10

<210> 149
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 50 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 9
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 55 <400> 149

60 Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
 1 5

<210> 150
 <211> 19
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 404 940 T3

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 5
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 10
 <400> 150

15
 Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10 15
 Thr Gly Gly

<210> 151
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 25
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 30
 <400> 151

35
 Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10 15
 Thr Gly

<210> 152
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE
 45
 <222> 14
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 50
 <400> 152

55
 Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10 15
 Thr

<210> 153
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> 14

5 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 153

10 Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10 15

<210> 154

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> 14

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

25

<400> 154

30 Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10 15

<210> 155

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<220>

<221> VARIANTE

40

<222> 14

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 155

45

Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
 1 5 10

50 <210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Péptido generado sintéticamente

<220>

<221> VARIANTE

60 <222> 13

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 156

65 Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr
 1 5 10 15
 Gly

ES 2 404 940 T3

5 <210> 157
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE

15 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 157

20
 Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn Thr
 1 5 10 15

25 <210> 158
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE

35 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 158

40 Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp Asn
 1 5 10 15

45 <210> 159
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <220>
 <221> VARIANTE

55 <222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 159

60 Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa Trp
 1 5 10

65 <210> 160
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 5 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 13
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 10 <400> 160

Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Xaa
 1 5 10

15 <210> 161
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 161
 25

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys

30 1 5 10 15
 His Met

<210> 162
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 162

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His

<210> 163
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 163

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15

60 <210> 164
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65

ES 2 404 940 T3

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

5 <400> 164

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
1 5 10 15

10

<210> 165

<211> 14

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

20

<400> 165

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

25

<210> 166

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

35 <400> 166

His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
1 5 10 15
Met

40

<210> 167

<211> 16

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

50

<400> 167

His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
1 5 10 15

55

<210> 168

<211> 15

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

65

<400> 168

ES 2 404 940 T3

5 His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
1 5 10 15

<210> 169
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

15 <400> 169

His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
1 5 10

20 <210> 170
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 170

30 His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
. 1 5 10

35 <210> 171
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 171

45 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
1 5 10 15

50 <210> 172
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 172

60 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
1 5 10 15

65 <210> 173
<211> 14

ES 2 404 940 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 173

10 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
1 5 10

<210> 174
<211> 13
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 174

25 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
1 5 10

<210> 175
30 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 175

40 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 176
45 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 176

55 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
1 5 10 15

<210> 177
60 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 177

ES 2 404 940 T3

Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
 1 5 10

5

<210> 178
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

15

<400> 178

Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10

20

<210> 179
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30

<400> 179

Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
 1 5 10

35

<210> 180
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

45

<400> 180

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His Val

50

<210> 181
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60

<400> 181

His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
 1 5 10 15
 Val

65

<210> 182

ES 2 404 940 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 182

10 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val
 1 5 10 15

<210> 183
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 20 <400> 183

25 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val
 1 5 10 15

<210> 184
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35 <400> 184

40 Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His Met

<210> 185
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 50 <400> 185

55 Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His

60 <210> 186
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<210> 191
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <400> 191

15 His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15

<210> 192
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

25 <400> 192

30 His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
 1 5 10

<210> 193
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

40 <400> 193

45 His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 1 5 10

<210> 194
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 194

55 Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met
 1 5 10 15

<210> 195
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Péptido generado sintéticamente

ES 2 404 940 T3

<400> 195

5 Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
1 5 10 15

<210> 196

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

15 <400> 196

20 Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
1 5 10

<210> 197

<211> 13

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

30 <400> 197

35 Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
1 5 10

<210> 198

<211> 12

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

45 <400> 198

50 Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

<210> 199

<211> 18

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido generado sintéticamente

60 <400> 199

65 Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
1 5 10 15
His Val

ES 2 404 940 T3

5
 <210> 200
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 200

15
 His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
 1 5 10 15
 Val

20
 <210> 201
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 201

30
 Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val
 1 5 10 15

35
 <210> 202
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 202

45
 Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His Met

50
 <210> 203
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 203

60
 Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His

65

ES 2 404 940 T3

<210> 204
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 204
 10

Thr	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys
1				5					10					15	

 <210> 205
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 20
 <400> 205

Thr	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met
1				5					10					15

 25
 <210> 206
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 35
 <400> 206

Thr	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn
1				5					10				

 40
 <210> 207
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 50
 <400> 207

His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys	His
1				5				10						15	
Met															

 55
 <210> 208
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 65
 <400> 208

His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys	His
1				5				10						15	

ES 2 404 940 T3

5 <210> 209
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 10 <400> 209

	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys
	1				5					10					15

15 <210> 210
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 210
 25

	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met
	1				5					10				

30 <210> 211
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 211

	His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn
	1				5					10			

40 <210> 212
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 212
 50

	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys	His	Met
	1				5					10					15	

55 <210> 213
 <211> 15
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 65 <400> 213

ES 2 404 940 T3

Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
 1 5 10 15

5 <210> 214
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 <400> 214

Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10

15 <210> 215
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 25 <400> 215

Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
 1 5 10

30 <210> 216
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 40 <400> 216

Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
 1 5 10

45 <210> 217
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente
 55 <400> 217

Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys
 1 5 10 15
 His Val

60 <210> 218
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>

ES 2 404 940 T3

<223> Péptido generado sintéticamente

<400> 218

5

His	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys	His
1				5					10					15	
Val															

10

<210> 219
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20

<400> 219

Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys	His	Val
1				5					10					15	

25

<210> 220
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 220

35

Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln
1				5					10					15	
Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln								
				20											

40

<210> 221
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<400> 221

50

Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Gly	Gly	Gly	Thr	His	Ser	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro
1				5					10					15	
Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	Met	Lys	His	Met						
			20					25							

55

<210> 222
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

65

ES 2 404 940 T3

<400> 222

5 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His
 20 25 30
 Met

10 <210> 223
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11
 <223> Xaa = Asn o Ser

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 23
 <223> Xaa = Leu o Met

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26
 <223> Xaa = Val o Met

35 <400> 223
 Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Xaa Gln Trp Asn Lys Pro
 1 5 10 15
 Ser Lys Pro Lys Thr Asn Xaa Lys His Xaa Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

40 <210> 224
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 11, 20
 <223> Xaa = Gly o Ser

55 <400> 224
 Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln His Gly Xaa Ser Trp Gly Gln Pro
 1 5 10 15
 His Gly Gly Xaa Trp Gly Gln
 20

60 <210> 225
 <211> 18
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 404 940 T3

<220>
<223> Péptido generado sintéticamente

5 <220>
<221> VARIANTE
<222> 12
<223> Xaa = Leu o Met

10 <220>
<221> VARIANTE
<222> 15
<223> Xaa = Val o Met

15 <400> 225

Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Xaa Lys His Xaa Gly
1 5 10 15
Gly Gly

20 <210> 226
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

30 <400> 226

Gly Gly Gly Ala Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
1 5 10

35 <210> 227
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

45 <400> 227

Gly Gly Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Gly Gly
1 5 10 15
Gly

50 <210> 228
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Péptido generado sintéticamente

60 <400> 228

Gly Gly Gly Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly
1 5 10 15
Gly

65

5 <210> 229
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 4, 5
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil) glicina

15 <400> 229

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

20 <210> 230
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 5
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

35 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 3
 <223> Xaa = N-(4-guanidinobutil)glicina

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4, 6
 <223> Xaa = (S)-N-(1-phenylethil)glicina

<400> 230

45 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

50 <210> 231
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 4, 7
 <223> Xaa = N-(4-aminoetil)glicina

65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 3, 5, 6, 8, 9
 <223> Xaa = N-(2-(4-methoxyfenil)etil)glicina
 <400> 231

ES 2 404 940 T3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

5 <210> 232
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> 1, 3, 10
 <223> Xaa = N-(2-methoxyetil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> 2
 <223> Xaa = N-(2-3'-indolyetil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> 4, 7
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> 5, 8
 <223> Xaa = (S)-N-(1-phenyletil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> 6, 9
 <223> Xaa = N-(2-hydroxyetil)glicina

<400> 232

40 Xaa
 1 5 10

<210> 233
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11
 55 <223> Xaa = (S)-N-(1-phenyletil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4, 7, 9
 60 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

<400> 233

65 Xaa
 1 5 10

5 <210> 234
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11
 <223> Xaa = N-benzylglicina

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4, 7, 9
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

20 <400> 234

Xaa
 1 5 10

25 <210> 235
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 3, 6, 10, 11
 <223> Xaa = N-(2-methoxyetil)glicina

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4, 7, 9
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5, 8
 <223> Xaa = N-((8'-naphthil)methyl)glicina

50 <400> 235

Xaa
 1 5 10

55 <210> 236
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

65 <220>
 <221> VARIANTE

<222> 1, 3, 5, 6, 8, 10, 11
 <223> Xaa = N-(2-methoxyetil)glicina

<220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> 2, 4, 7, 9
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil) glicina

<400> 236
 10

Xaa
 1 5 10

15 <210> 237
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 5
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

<220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> 4, 6
 <223> Xaa = (S)-N-(1-phenyletil)glicina

<400> 237
 35

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

40 <210> 238
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 50 <221> VARIANTE
 <222> 1, 3, 4, 6
 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

<220>
 55 <221> VARIANTE
 <222> 2, 5
 <223> Xaa = (S)-N-(1-phenyletil)glicina

<400> 238
 60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

65 <210> 239
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 5
 10 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 4, 6
 15 <223> Xaa = (S)-N-(1-phenyletil)glicina

<400> 239

20

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5	

<210> 240
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Péptido generado sintéticamente

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 5
 35 <223> Xaa = N-(4-aminobutil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4, 6
 40 <223> Xaa = N-benzilglicina

<400> 240

45

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5	

<210> 241
 50 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> VARIANTE
 60 <222> 1, 3, 5
 <223> Xaa = N-(2-methoxyetil)glicina

<220>
 <221> VARIANTE
 65 <222> 2, 4, 6
 <223> Xaa = N-benzilglicina

<400> 241

5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

10

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de peptoide que tiene una fórmula de:



en la que:

10 cada Q es independientemente un aminoácido o una glicina N-sustituida, y $-(Q)_n-$ define una región de peptoide; en la que dicha región de peptoide $-(Q)_n-$ comprende SEC ID N°: 229, 230, 232, 233, 234, 235,236, 237, 238, 239, 240 ó 241.

15 X^a es H, alquilo (C_1-C_6), cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, acilo (C_1-C_6), aminoacilo (C_{1-6}), un aminoácido, un grupo protector de amino, o un polipéptido de 2 a 100 aminoácidos en el que X^a está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador;
 X^b es H, alquilo (C_1-C_6), arilo, aralquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, amino, alquilamino, dialquilamino, hidroxilo, alcoxi (C_1-C_6), ariloxi, aralcoxi, un grupo protector de carboxi, un aminoácido, o un polipéptido de 2 a 100 aminoácidos, en el que X^b está opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.

20 2. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1, en el que X^b es un aminoácido opcionalmente sustituido con un resto conjugado que está opcionalmente unido mediante un resto de ligador.

3. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1, en el que la región de peptoide $-(Q)_n-$ es poliiónica a pH de 5,5 a 8,5.

25 4. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1, en el que la región de peptoide $-(Q)_n-$ tiene una carga neta de al menos 3+ a un pH de 5,5 a 8,5.

5. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1, en el que la región de peptoide $-(Q)_n-$ comprende SEC ID N°: 230, 237, 238, 239 ó 240

30 6. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1, en el que la región de peptoide $-(Q)_n-$ comprende SEC ID N°: 230, 237, 238, 239 ó 240.

7. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1, en el que la región de peptoide $-(Q)_n-$ comprende SEC ID N°: 240.

35 8. El reactivo de peptoide de la reivindicación 1 que comprende al menos un resto conjugado,

9. El reactivo de peptoide de la reivindicación 8, en el que el resto conjugado está unido mediante un resto de ligador.

40 10. El reactivo de peptoide de la reivindicación 8, en el que el resto conjugado es un agente de reticulación o un ligante.

45 11. El reactivo de peptoide de la reivindicación 8, en el que el resto conjugado comprende biotina o un grupo mercapto.

12. Un reactivo de peptoide seleccionado de:

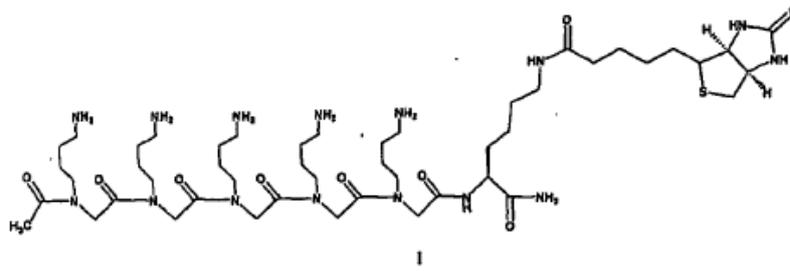
50

55

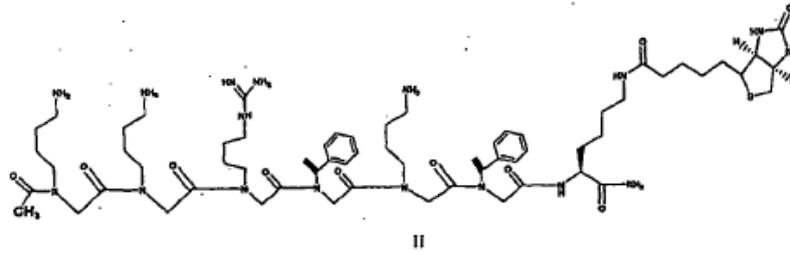
60

65

5

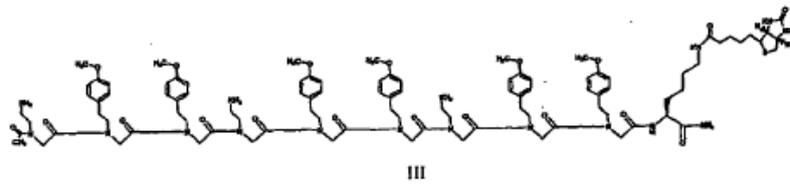


10



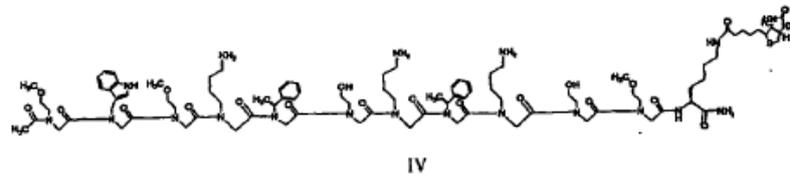
15

25



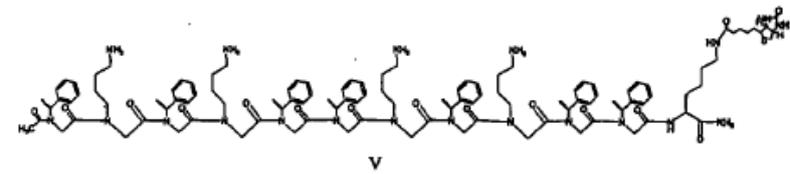
30

35



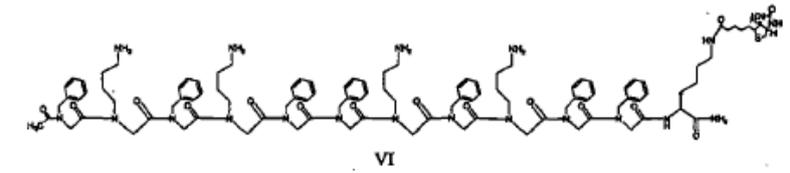
40

45

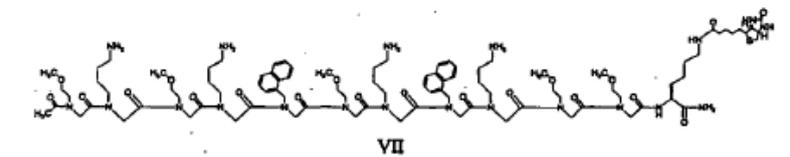


50

55

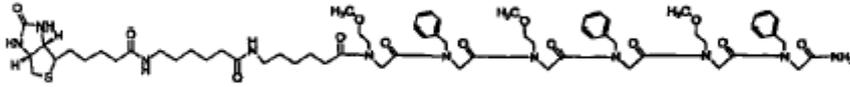


60



65

5

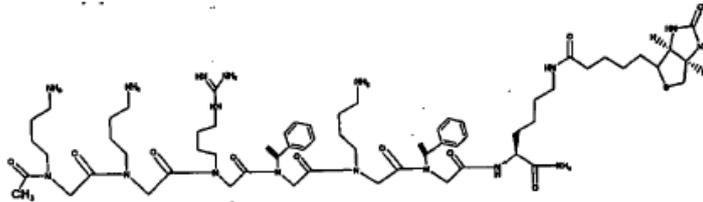


XIII

10

13. Un reactivo de peptide seleccionado de:

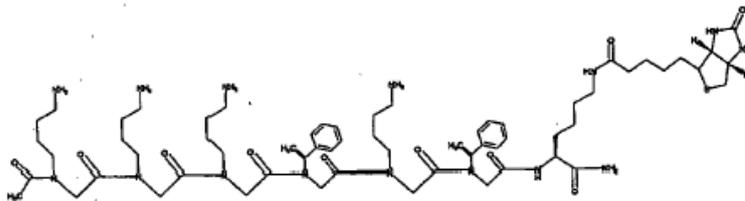
15



II

20

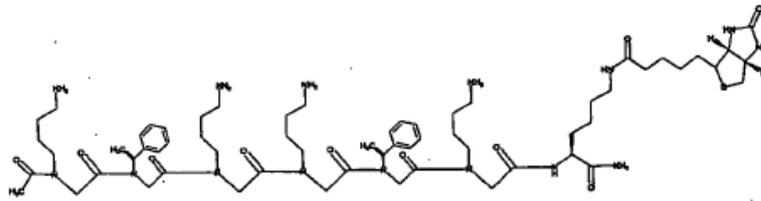
25



IX

30

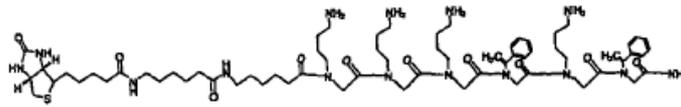
35



X

40

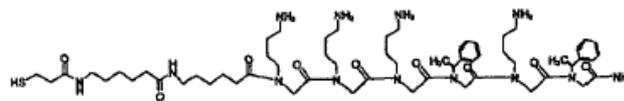
45



XIa

50

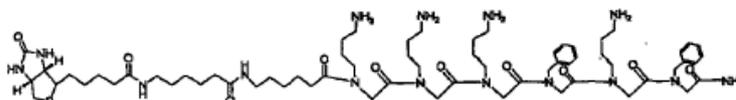
55



XIb

60

65



XIIa

- 5 primer complejo, extraer la muestra sin unir de dicho primer complejo, poner en contacto dicho primer complejo con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión de dicho reactivo de unión a príon a dicho príon patógeno de dicho primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación de dicho segundo complejo, en el que la formación del segundo complejo es indicativa de la presencia del príon patógeno.
- 10 23. Un procedimiento de detección de la presencia de un príon patógeno en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con un primer reactivo de peptoide según las reivindicaciones 1 ó 12 en condiciones que permitan la unión de dicho primer reactivo de peptoide a dicho príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir de dicho primer complejo, disociar dicho príon patógeno de dicho primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto dicho príon patógeno disociado con un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión de dicho reactivo de unión a príon a dicho príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación de dicho segundo complejo, en el que la formación de dicho segundo complejo es indicativa de la presencia de dicho príon patógeno.
- 15 24. Un procedimiento de detección de la presencia de un príon patógeno en una muestra que comprende poner en contacto dicha muestra con un primer reactivo de peptoide según las reivindicaciones 1 ó 12 en condiciones que permitan la unión de dicho primer reactivo de peptoide a dicho príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir de dicho primer complejo, disociar dicho príon patógeno de dicho primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto dicho príon patógeno disociado con un reactivo de unión a príon en condiciones que permitan la unión de dicho reactivo de unión a príon a dicho príon patógeno disociado para formar un segundo complejo, y detectar la formación de dicho segundo complejo usando un segundo reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en el que la formación de dicho segundo complejo es indicativa de la presencia del príon patógeno.
- 20 25. Un procedimiento de detección de la presencia de un príon patógeno en una muestra, que comprende poner en contacto dicha muestra con un reactivo de unión a príon en condiciones que permitan la unión de dicho reactivo de unión a príon al príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir de dicho primer complejo, poner en contacto dicho primer complejo con un reactivo de peptoide según las reivindicaciones 1 ó 12, opcionalmente detectablemente marcado, en condiciones que permitan la unión de dicho reactivo de peptoide a dicho príon patógeno de dicho primer complejo para formar un segundo complejo, y detectar la formación de dicho segundo complejo, en el que la formación de dicho segundo complejo es indicativa de la presencia de dicho príon patógeno.
- 30 26. El procedimiento de las reivindicaciones 21 a 25, en el que dicho reactivo de unión a príon comprende un anticuerpo antipríónico.
- 35 27. Un procedimiento de detección de la presencia de un príon patógeno en una muestra que comprende: poner en contacto dicha muestra con un primer reactivo de peptoide según las reivindicaciones 1 ó 12 en condiciones que permitan la unión de dicho primer reactivo de peptoide a dicho príon patógeno, si está presente, para formar un complejo, extraer la muestra sin unir de dicho complejo, disociar dicho príon patógeno de dicho complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto dicho príon patógeno disociado con un segundo soporte sólido en condiciones que permitan que dicho príon patógeno disociado se adhiera a dicho segundo soporte sólido; y detectar el príon patógeno disociado adherido usando un reactivo de unión a príon, opcionalmente detectablemente marcado, en el que la unión de dicho reactivo de unión a príon indica la presencia de dicho príon patógeno.
- 40 28. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que dicha disociación se lleva a cabo exponiendo dicho complejo a pH 12 o por encima o pH 2 o por debajo.
- 45 29. El procedimiento de la reivindicación 28 que comprende además la etapa de neutralizar dicho pH después de dicha disociación.
- 50 30. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que dicho príon patógeno disociado está desnaturalizado.
- 55 31. El procedimiento de la reivindicación 27, en el que dicho reactivo de unión a príon comprende un anticuerpo antipríónico.
- 60 32. Un procedimiento de detección de la presencia de un príon patógeno en una muestra que comprende: poner en contacto dicha muestra con un primer reactivo de peptoide según las reivindicaciones 1 ó 12 en condiciones que permitan la unión de dicho primer reactivo de peptoide a dicho príon patógeno, si está presente, para formar un primer complejo, extraer la muestra sin unir de dicho primer complejo, disociar dicho príon patógeno de dicho primer complejo proporcionando así príon patógeno disociado, poner en contacto dicho príon patógeno disociado con un segundo soporte sólido, en el que dicho segundo soporte sólido comprende un primer anticuerpo antipríónico, en condiciones que permitan que dicho príon patógeno disociado se una a dicho primer anticuerpo antipríónico para
- 65

formar un segundo complejo; y detectar dicho prión patógeno disociado de dicho segundo complejo con un segundo anticuerpo antipriónico, opcionalmente detectablemente marcado, en el que la unión de dicho segundo anticuerpo antipriónico indica la presencia de dicho prión patógeno.

- 5 33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicha disociación se lleva a cabo exponiendo dicho primer complejo a pH 12 o por encima o pH 2 o por debajo.
34. El procedimiento de la reivindicación 33 que comprende además la etapa de neutralizar dicho pH después de dicha disociación.
- 10 35. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicho prión patógeno disociado está desnaturalizado.
36. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicho primer reactivo de unión a prión comprende un anticuerpo antipriónico.
- 15 37. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que el segundo reactivo de unión a prión comprende un anticuerpo antipriónico.
- 20 38. Un reactivo de peptoide de las reivindicaciones 1 ó 12, en el que dicho reactivo de peptoide está ligado a un agente de obtención de imágenes para su uso en un procedimiento de determinación de una localización de una infección por enfermedad relacionada con priones en un animal que comprende:
- (a) administrar dicho reactivo de peptoide a dicho animal; y
 - (b) detectar dicho agente de obtención de imágenes, en el que la detección de dicho agente de obtención de imágenes determina la localización de dicha infección.
- 25 39. Un procedimiento para aislar un prión patógeno de una muestra que comprende:
- (a) poner en contacto un soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de las reivindicaciones 1 ó 12 con dicha muestra en condiciones que permitan la unión de dicho prión patógeno, si está presente en la muestra, a dicho reactivo de peptoide para formar un complejo; y
 - (b) extraer la muestra sin unir de dicho complejo, proporcionando así prión patógeno aislado.
- 30 40. Un procedimiento para reducir la cantidad del prión patógeno en una muestra que comprende:
- (a) poner en contacto soporte sólido que comprende un reactivo de peptoide de las reivindicaciones 1 ó 12 con dicha muestra en condiciones que permitan la unión de dicho prión patógeno, si está presente en dicha muestra, con dicho reactivo de peptoide de dicho soporte sólido para formar un complejo; y
 - (b) separar muestra sin unir de dicho complejo, proporcionando así dicha muestra con una cantidad reducida del prión patógeno.
- 35 41. Un procedimiento de preparación de un suministro de sangre que está sustancialmente libre de un prión patógeno que comprende:
- (a) detectar la presencia o ausencia de prión patógeno en una pluralidad de muestras de sangre, en el que dicha detección implica unir dicho prión patógeno, si está presente, a un reactivo de peptoide de las reivindicaciones 1 ó 12; y
 - (b) combinar dichas muestras en las que el prión patógeno no se detecta, proporcionando así el suministro de sangre que está sustancialmente libre del prión patógeno.
- 40 42. Un procedimiento de preparación de un suministro de alimentos que está sustancialmente libre de un prión patógeno que comprende:
- (a) detectar la presencia o ausencia de prión patógeno en una pluralidad de muestras de alimentos, en el que dicha detección implica unir dicho prión patógeno, si está presente, a un reactivo de peptoide de las reivindicaciones 1 ó 12; y
 - (b) combinar dichas muestras en las que el prión patógeno no se detecta, proporcionando así dicho aporte de alimento que está sustancialmente libre del prión patógeno.
- 45 50 55 60 65

Fig. 1A Detección de PrP^c en plasma normal humano

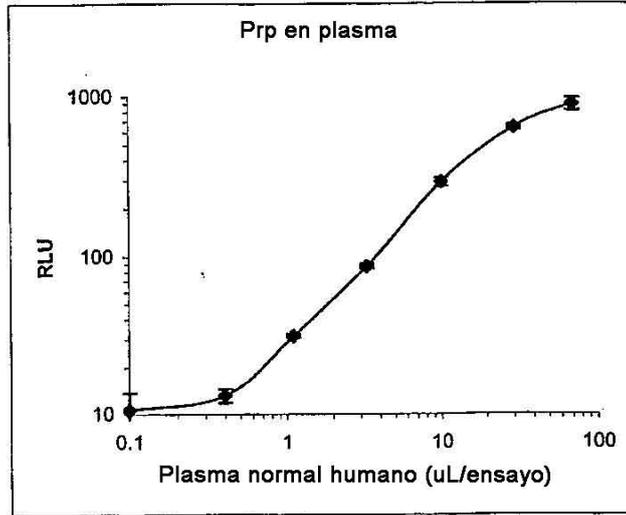


Fig. 1B Detección de recombinante PrP humano

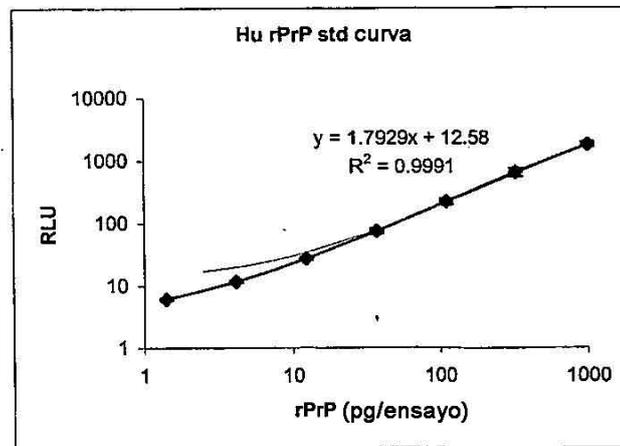


FIGURA 2

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS PRIÓNICOS

Secuencia de aminoácido de longitud total de proteína priónica humana

SEQ ID NO. 1: MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKK
RPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG
WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHG
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAA
AAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDR
YYRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDC
VNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVE
QMCITQYERESQAYYQRGSSMVLFSPPVILLIS
FLIFLIVG

Secuencia de aminoácido de longitud total de proteína priónica de ratón

SEQ ID. NO. 2: MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCK
KRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGT
WGQPHGGGWGQPHGGSWGQPHGGSWGQPHG
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAA
AGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDR
YYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDC
VNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVE
QMCVTQYQKESQAYYDGRSSSTVLFSSPPVIL
LISFLIFLIVG

FIGURA 4

Perfiles de desnaturalización de vECJ(○) y sECJ (●)

