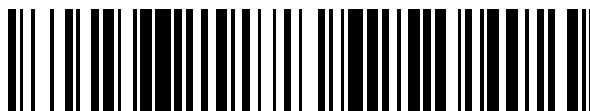


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 734**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2003** **E 03780322 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013** **EP 1565213**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades inducidas por priones mediante la administración de anticuerpos anti-priones**

30 Prioridad:

29.11.2002 GB 0227886

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

03.06.2013

73 Titular/es:

D-GEN LIMITED (100.0%)
Box 118 Institute of Neurology, National Hospital
for Neurology & Neurosurgery, Queen Square
London WC1N 3BG, GB

72 Inventor/es:

COLLINGE, JOHN y
HAWKE, SIMON

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 734 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

Tratamiento de enfermedades inducidas por priones mediante la administración de anticuerpos anti-priones.

Enfermedades priónicas tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), son trastornos neurodegenerativos mortales para los que una terapia es ineficaz. Una parte de la población del Reino Unido ha estado expuesto a una cepa¹⁻³ de priones similares a los de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y tienen riesgo de desarrollar la variante CJD⁴.

Un distintivo de la enfermedad priónica es la transformación de una proteína priónica celular normal (PrP^C) en una isoforma⁵ asociada a una enfermedad infecciosa, PrP^{Sc}.

Estudios previos *in vivo* dirigidos a la inhibición de priones o la infección con priones en organismos completos, no han tenido éxito, en particular, no han tenido éxito en la prevención del desarrollo de la enfermedad priónica clínica.

Cuando en la técnica anterior se han hecho intentos para neutralizar priones *in vivo*, éstos han sido en sistemas en los que la replicación de los priones no se había iniciado. Por ejemplo, tales estudios de la técnica anterior son la mezcla de un inóculo de prión con un agente neutralizante antes de la introducción en el organismo, o simplemente la introducción de un inóculo de prión en un sistema que ya está cargado con un agente neutralizante, de tal manera que el(los) prión(es) nunca tiene la oportunidad de establecerse o replicarse *in vivo*.

Estudios *in vivo* de compuestos conocidos por mostrar propiedades prometedoras en experimentos *in vitro*, ilustran claramente que el comportamiento *in vitro* de tales compuestos no conduce a ningún tipo de aportación *in vivo*. Ejemplos de ello se pueden encontrar en el estudio de la quinacrina, que había sido prometedor *in vitro*, pero no se llevó a cabo por no tener ningún efecto clínico *in vivo* (por ejemplo, véase PNAS 2001 vol. 98 págs. 9836-41 y Ann Neurol. 2002 vol. 52 págs. 503-6).

Además, no hay ningún sistema *in vivo* previamente conocido que haya demostrado una detención o inhibición eficaz de la replicación de los priones.

La presente invención pretende superar el(los) problema(s) asociado con la técnica anterior.

Compendio de la invención

En este documento se muestra sorprendentemente que la replicación de priones se puede inhibir eficazmente *in vivo*. A diferencia de los estudios existentes, la presente invención permite la inhibición *in vivo* de poblaciones de priones establecidas y que se replican en organismos completos.

Es una característica principal de la presente invención que los métodos y los usos son eficaces en la inhibición de la replicación de priones que ya han entrado en la fase de replicación. Aunque es ventajoso aplicar la presente invención a aplicaciones profilácticas y de inmunización, una ventaja clave de la presente invención es que permite la detención/inhibición de poblaciones de priones establecidas, es decir, es eficaz cuando se aplica a sujetos después del momento de la exposición, inoculación o infección, por ejemplo, cuando se aplica por lo menos siete días (o más tarde - véase más abajo) después del momento de la exposición, inoculación o infección. Las técnicas anteriores no producen este efecto ventajoso. También es una característica ventajosa de la presente invención que, además de retrasar o posponer, por ejemplo mediante tiempos de incubación más largos, la presente invención permite la prevención/inhibición de la enfermedad priónica.

En consecuencia, la invención proporciona anticuerpos y su uso, tal y como se definen en las reivindicaciones, capaces de reaccionar con PrP para evitar la replicación de priones en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención capaces de reaccionar con PrP, en el tratamiento o la prevención de una infección con priones.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo capaz de reaccionar con PrP en el tratamiento o la prevención de una neuropatología asociada con una infección con priones.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un anticuerpo capaz de reaccionar con PrP en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad priónica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de la infección con priones en un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo capaz de reaccionar con PrP.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, tal y como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo se administra después de que el sujeto haya sido expuesto a los priones.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, tal y como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo se administra al menos siete días después de que el sujeto haya sido expuesto a los priones.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, tal y como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo se administra dentro del intervalo de 120 días después de que el sujeto haya sido expuesto a los priones.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método, tal y como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo se administra después de al menos 4% del tiempo de incubación total promedio para dicho sujeto.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método, tal y como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo se administra dentro del 62% del tiempo de incubación total promedio para dicho sujeto.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de inmunización de un sujeto contra una infección con priones que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo capaz de reaccionar con PrP.

- 10 En otro aspecto, la invención se refiere a un uso, tal y como se ha descrito anteriormente, o a un método, tal y como se ha descrito anteriormente, en donde dicho anticuerpo se produjo contra PrP 91-231.

En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde dicho anticuerpo reacciona con PrP^{Sc}.

En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde dicho anticuerpo reacciona con PrP^c y con PrP^{Sc}.

- 15 En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde dicho anticuerpo es una IgG.

En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde dicho anticuerpo es ICSM 18 o un fragmento o una fusión del mismo.

- 20 En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde dicho anticuerpo es ICSM 35 o un fragmento o una fusión del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir la replicación de priones que comprende poner en contacto dicho príon con el anticuerpo ICSM 18.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inhibir la replicación de priones que comprende poner en contacto dicho príon con el anticuerpo ICSM 35.

- 25 En otro aspecto, la invención se dirige a un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRs codificadas por la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 1 e ID SEC N° 2 o de ID SEC N° 3 e ID SEC N° 4.

En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde el anticuerpo comprende secuencias de aminoácidos de CDRs codificadas por la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 1 e ID SEC N° 2 o de ID SEC N° 3 e ID SEC N° 4.

- 30 En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde el sujeto es un mamífero.

En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde el sujeto es un primate.

- 35 En otro aspecto, la invención se refiere a un uso o a un método, tal y como se han descrito anteriormente, en donde el sujeto es un ser humano.

Descripción detallada de la invención

En esta memoria se muestra que agentes tales como los anticuerpos monoclonales usados de acuerdo con la invención, inhiben la replicación de priones *in vivo*. Además, agentes tales como los anticuerpos monoclonales usados de acuerdo con la invención, retrasan el desarrollo de la enfermedad priónica.

- 40 Se muestra en este documento, utilizando un modelo múrido de tembladera del cordero, que agentes tales como AMos anti-PrP tienen efectos inhibidores sobre la replicación de priones *in vivo*. Se muestra, además, que los niveles de PrP^{Sc} periférica y la infectividad priónica se reducen drásticamente, incluso cuando los anticuerpos se administran primero en el punto de acumulación cercano al máximo de PrP^{Sc} esplénica.

- 45 Además, todos los animales en los que se ha continuado con el tratamiento, se mantienen clínicamente sanos, >200 días después de que animales equivalentes no tratados hayan sucumbido a la enfermedad. Por ello, la presente invención proporciona estrategias inmunoterapéuticas para las enfermedades priónicas.

Por lo tanto, en una realización, la descripción proporciona el uso de agentes, tales como anticuerpos, en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad priónica.

Con prevención y/o tratamiento se pretende abarcar la detención, la suspensión, la parada, la contención, la congelación, la inhibición de la expansión, la inhibición de la replicación, la prevención de la intensificación o el aumento de la carga priónica, o un efecto similar en un sujeto. Preferiblemente, el tratamiento/prevención de la enfermedad incluye, al menos, el retraso, la suspensión o el aplazamiento del inicio de los síntomas clínicos.

- 5 El sujeto es un organismo, preferiblemente un mamífero, preferiblemente un primate, preferiblemente un ser humano.

Agente

- 10 El agente es una entidad que es capaz de inhibir la replicación del(de los) prion(es) *in vivo* en un sujeto. El agente puede comprender uno o varios anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, capaces de unirse a una proteína priónica, miméticos de los mismos o molécula(s) pequeña(s) capaces de unirse a una proteína priónica o a combinaciones de las mismas. Preferiblemente, el agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo. Preferiblemente, el agente comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a una proteína priónica.

Preferiblemente, el agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se produjo contra PrP 91-231.

- 15 Preferiblemente, el agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo que reacciona con PrP^{Sc}.

Preferiblemente, el agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo que reacciona con PrP^c y con PrP^{Sc}.

Preferiblemente, el agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo que es una IgG.

En otra realización, el anticuerpo se produce preferiblemente contra PrP alfa, preferiblemente el anticuerpo se produce contra PrP alfa 91-231.

- 20 Preferiblemente, el anticuerpo reacciona con PrP^{Sc}.

Preferiblemente, el anticuerpo reacciona con PrP^c y con PrP^{Sc}.

Preferiblemente, el anticuerpo reacciona con el epítipo 146-159 de PrP.

Preferiblemente, el anticuerpo es IgG.

Preferiblemente, el anticuerpo es de la subclase IgG1.

- 25 Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos las CDRs de ID SEC N° 3 y/o ID SEC N° 4.

Preferiblemente, el anticuerpo es ICSM 18 o un fragmento o una fusión del mismo.

En otra realización, el anticuerpo se produce preferiblemente contra PrP beta, preferentemente se produce contra PrP beta 91-231.

Preferiblemente, el anticuerpo reacciona con PrP^{Sc}.

- 30 Preferiblemente, el anticuerpo reacciona con PrP^c y con PrP^{Sc}.

Preferiblemente, el anticuerpo reacciona con el epítipo 91-110 de PrP.

Preferiblemente, el anticuerpo es IgG.

Preferiblemente, el anticuerpo es de la subclase IgG2b.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos las CDRs de ID SEC N° 1 y/o ID SEC N° 2.

- 35 Preferiblemente, el anticuerpo es ICSM 35 o un fragmento o una fusión del mismo.

Ventajosamente, cuando el agente es un anticuerpo, dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado. La humanización de anticuerpos es bien conocida en la técnica y el experto en la materia lo puede lograr con facilidad. Por ejemplo, ICSM 18 y/o ICSM 35 pueden estar cada uno ventajosamente humanizados, con referencia a las secuencias que codifican las CDRs que se presentan en este documento. En este sentido,

- 40 ID SEC N° 1 corresponde a ICSM35VH;

ID SEC N° 2 corresponde a ICSM35VK;

ID SEC N° 3 corresponde a ICSM18VH;

ID SEC N° 4 corresponde a ICSM181c.

Una orientación en cuanto a la humanización se puede encontrar, por ejemplo, en la bibliografía tal y como publicaron Greg Winter *et al.*, y las técnicas para la manipulación y la producción de anticuerpos recombinantes se pueden encontrar en Harlow y Lane "Antibodies-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Press.

5 En una realización, los anticuerpos (o fragmentos) se pueden humanizar ventajosamente mediante la preparación de anticuerpos quiméricos.

En otra realización, en los anticuerpos (o fragmentos) se pueden injertar ventajosamente CDRs.

En otra realización, los anticuerpos (o fragmentos) se pueden humanizar totalmente de forma ventajosa, hasta el grado que permita la tecnología.

Composiciones farmacéuticas

10 La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del(de los) agente(s) de la presente invención y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de los mismos).

15 Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal, en medicina humana y veterinaria, y comprenderán típicamente uno cualquiera o varios entre un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se puede seleccionar según la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente - o en adición a los mismos - cualquier aglutinante(s),
20 lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante.

En la composición farmacéutica se pueden proporcionar agentes conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso aromatizantes. Ejemplos de conservantes incluyen el benzoato de sodio, el ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden utilizar antioxidantes y agentes de suspensión.

25 Puede haber diferentes requisitos para la composición/formulación, dependiendo de los diferentes sistemas de administración. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular para ser administrada usando una minibomba o por una vía mucosa, por ejemplo, como una pulverización nasal o un aerosol para inhalar o una solución ingerible, o por vía parenteral en donde la composición se formula mediante una forma inyectable, para la entrega, por ejemplo, a través de una ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación se puede diseñar para ser administrada a través de una variedad de rutas.

30 Cuando el agente se va a administrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debe ser capaz de permanecer estable durante el paso a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debe ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

35 Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de supositorio o supositorio vaginal, tópicamente en forma de loción, solución, crema, pomada o polvo fino, mediante el uso de un parche cutáneo, oralmente en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, solos o en mezcla por adición de excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o se pueden inyectar parenteralmente, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden utilizar mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o monosacáridos suficientes para volver la solución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual,
40 las composiciones se pueden administrar en forma de comprimidos o pastillas que se pueden formular de una manera convencional.

45 Si el agente es una proteína, entonces dicha proteína se puede preparar *in situ* en el sujeto que se va a tratar. Para ello, secuencias de nucleótidos que codifican dicha proteína se pueden suministrar mediante el uso de técnicas no víricas (por ejemplo, mediante el uso de liposomas) y/o técnicas víricas (por ejemplo, mediante el uso de vectores retrovíricos) de modo que dicha proteína se expresa a partir de dicha secuencia de nucleótidos.

En una realización preferida, el agente farmacéutico de la presente invención se administra por vía tópica.

Por lo tanto, preferiblemente el agente farmacéutico está en una forma que es adecuada para la administración tópica.

50 Administración

El término "administrado" incluye la entrega por medio de técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de administración vírica incluyen, pero no se limitan a los mismos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores del virus herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores de baculovirus. Los mecanismos de liberación no víricos incluyen la transfección mediada por lípidos, los liposomas, los

inmunoliposomas, la lipofectina, los anfífilos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de los mismos.

Los componentes de la presente descripción se pueden administrar solos, pero generalmente se administran en forma de una composición farmacéutica - por ejemplo, cuando los componentes están en mezcla por adición con un excipiente, un diluyente o un vehículo farmacéutico adecuado, seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional.

Por ejemplo, los componentes se pueden administrar (por ejemplo, por vía oral o tópica) en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, con impulsos o controlada.

Si el agente farmacéutico es un comprimido, entonces el comprimido puede contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina, agentes disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, de patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de la granulación, tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábica. Adicionalmente, se pueden incluir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Las composiciones sólidas de tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar derivada de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, el agente se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las vías de administración (entrega) incluyen, pero no se limitan a las mismas, una o varias entre: oral (por ejemplo, como un comprimido, una cápsula o como una solución ingerible), tópica, mucosa (por ejemplo, como una pulverización nasal o aerosol para inhalación), nasal, parenteral (por ejemplo, mediante una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural, sublingual.

En un aspecto preferido, la composición farmacéutica se administra por vía tópica.

Es de entender que no todos los componentes del agente farmacéutico se tienen que administrar por la misma vía. Del mismo modo, si la composición comprende más de un componente activo, entonces esos componentes se pueden administrar por diferentes vías.

Si un componente de la presente descripción se administra parenteralmente, entonces los ejemplos de tal administración incluyen una o varias vías entre: las vías de administración del componente intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea; y/o mediante el uso de técnicas de infusión.

Para la administración parenteral, el componente se utiliza mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para volver la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben estar tamponadas adecuadamente (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales, bien conocidas por los expertos en la técnica.

Tal y como se ha indicado, el(los) componente(s) se puede administrar por vía intranasal o por inhalación y se administra convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización en aerosol desde un recipiente presurizado, una bomba, un pulverizador o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A[®]) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA[®]), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador pueden contener una solución o una suspensión del compuesto activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propelente como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Las cápsulas y los cartuchos (fabricados, por ejemplo, con gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, se pueden formular para contener una mezcla en polvo del agente y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Alternativamente, el(los) componente(s) se puede administrar en forma de un supositorio o pesario, o se puede aplicar tópicamente en forma de un gel, hidrogel, loción, solución, crema, pomada o polvo para espolvorear. El(los) componente(s) de la presente invención también se puede administrar por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También se puede administrar a través de la vía pulmonar o rectal. También se puede administrar por la vía ocular. Para el uso oftálmico, los compuestos se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica, con pH ajustado, o, preferiblemente, como

soluciones en solución salina estéril isotónica con pH ajustado, opcionalmente en combinación con un agente conservante tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, se pueden formular en una pomada tal como vaselina.

5 Para la aplicación tópica sobre la piel, el(los) componente(s) se puede formular como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto, por ejemplo, en una mezcla con uno o varios de los siguientes componentes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietilen polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, se puede formular como una loción o una crema adecuadas, suspendidas o disueltas, por ejemplo, en una mezcla de uno o varios de los siguientes componentes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

10 Ventajosamente, el agente se administra de forma que se ponga en contacto con tejido(s) en el que se pueden acumular los priones. Esto se puede realizar convenientemente mediante la inyección directa de una formulación adecuada en el sujeto.

15 Aproximadamente el 0,1% de agente administrado a un sujeto, se puede transportar pasivamente al líquido cefalorraquídeo. Esta proporción puede variar dependiendo del modo exacto de administración y de la naturaleza exacta del agente. Ventajosamente, las técnicas se pueden utilizar con el fin de aumentar esta proporción. Ventajosamente, se puede realizar una aplicación directa del agente en el líquido cefalorraquídeo.

20 Claramente, es ventajoso que el agente se ponga en contacto con tejidos neuronales en los que se sabe que se acumulan los priones. Por ejemplo, es ventajoso que el agente se administre de una manera tal que se ponga en contacto con los tejidos cerebrales. Cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) es un problema conocido en la técnica y una persona experta en la técnica lo puede superar.

Por ejemplo, el agente se puede administrar directamente en el cerebro. Esto podría llevarse a cabo mediante una infusión directa usando un depósito de Ommaya que se extiende en el ventrículo lateral, de una manera similar a la utilizada en el tratamiento de cánceres metastásicos, tales como el cáncer testicular.

25 En otro ejemplo, el agente puede estar unido, preferiblemente unido covalentemente, a un péptido portador tal como un ligando para el receptor de la transferrina, tal como un AMo anti-receptor de transferrina o transferrina o una parte del mismo. En una realización preferida, esta unión se consigue mediante la fusión del agente, tal como un anticuerpo, con el portador, tal como la transferrina. Esto puede conseguirse ventajosamente mediante la producción y la expresión de una fusión de gen recombinante que codifica la transferrina y el anticuerpo o el fragmento de interés. De esta manera, el agente se puede administrar al sujeto a través de cualquier vía adecuada y el(los) mecanismo(s) de transporte propio del sujeto permitirá que el agente cruce la barrera hematoencefálica mediante la acción del receptor de transferrina.

30 En otro ejemplo, el agente se puede administrar en el cerebro mediante el uso de virus neurotróficos no virulentos. Uno o varios de estos virus se inoculan en el sujeto o infectan al mismo. La barrera hematoencefálica es capaz de permitir el transporte pasivo del agente como un anticuerpo en el cerebro. Estos regímenes pueden basarse simplemente en sistemas conocidos, tales como los utilizados en el aclaramiento de virus alfa y/o virus de la influenza, desde el cerebro utilizando anticuerpos. El(los) agente(s) de acuerdo con la presente invención, tales como anticuerpos anti-PrP, tal y como se describen en este documento, se sustituyen simplemente por los anticuerpos antivíricos utilizados en las técnicas existentes.

40 Temporización de la administración

Es una ventaja que el agente pueda ser administrado después de la exposición a los priones.

Preferiblemente, el agente se administra tan pronto como sea adecuado, después de la exposición a los priones.

Preferiblemente, el agente se administra antes de la aparición de los síntomas clínicos.

45 Preferiblemente, el agente se administra antes de la neuroinvasión (es decir, antes de que los priones hayan colonizado el cerebro).

Preferiblemente, el agente se administra antes de la neuroinvasión periférica (es decir, antes de que los priones hayan colonizado la médula espinal y/o los nervios periféricos.)

50 Preferiblemente, el agente se administra dentro de un periodo de 120 días desde la exposición, preferiblemente dentro de un periodo de 117 días desde la exposición, preferiblemente dentro de un periodo de 100 días desde la exposición, preferentemente dentro de un periodo de 80 días desde la exposición, preferentemente dentro de un periodo de 60 días desde la exposición, preferentemente dentro de un periodo de 40 días desde la exposición, preferentemente dentro de un periodo de 30 días desde la exposición, preferentemente dentro de un periodo de 20 días desde la exposición, preferentemente dentro de un periodo de 7 días desde la exposición.

Más preferiblemente, la temporización de la administración se expresa en términos de un porcentaje del periodo de

incubación total (período de incubación promedio). Esto permite tener en cuenta los tiempos de incubación de diferentes especies y se realizan los ajustes necesarios en la temporización de la administración. Ventajosamente, el tiempo total promedio de incubación para el ratón de 195 días, es un ajuste con referencia a los Ejemplos.

5 Preferiblemente, el agente se administra dentro del 62% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 60% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 52% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 41% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 31% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 21% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 16% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 11% del tiempo total de incubación, preferiblemente dentro del 4% del tiempo total de incubación.

10 Si el momento exacto de la exposición a los priones no es conocido, entonces será evidente que se debe utilizar un tiempo estimado de exposición a los priones en la estimación de los tiempos totales de incubación, y por lo tanto la temporización de la administración.

Niveles de dosis

15 Normalmente, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un sujeto individual. El nivel específico de la dosis y la frecuencia de la dosificación para cualquier paciente particular, puede variar y dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud en general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el individuo sometido a terapia.

20 Dependiendo de la necesidad, el agente se puede administrar con una dosis de 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente, la dosificación se puede estimar de acuerdo con las dosificaciones utilizadas en los ejemplos adjuntos. Por ejemplo, dosificaciones de 500 µg a 2 mg por administración por ratón (con un peso de aprox. 25-30 g, con mayor frecuencia aprox. 30 g), se pueden extrapolar para sujetos con pesos diferentes, tales como primates, especialmente seres humanos, empleando sus pesos y calculando de forma correspondiente.

25

Formulación

El(los) componente(s) se pueden formular en una composición farmacéutica, mezclando con uno o varios entre un vehículo, un diluyente o un excipiente adecuado, mediante el uso de métodos que son conocidos en la técnica.

Sal farmacéuticamente activa

30 El agente se puede administrar como una sal farmacéuticamente aceptable. Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable se puede preparar fácilmente mediante el uso de un ácido o una base deseados, según sea apropiado. La sal puede precipitar en la solución y se puede recoger por filtración o se puede recuperar evaporando el disolvente.

Tratamiento

35 Se debe apreciar que, en este documento, todas las referencias a un tratamiento incluyen uno o varios tratamientos curativos, paliativos y profilácticos. Preferiblemente, el término tratamiento incluye por lo menos un tratamiento curativo y/o un tratamiento profiláctico.

El tratamiento puede ser de una o varias enfermedades priónicas (incluyendo la infección con priones), o una dolencia relacionada.

40 Terapia

Los agentes se pueden utilizar como agentes terapéuticos - es decir, en aplicaciones de terapia.

Al igual que con el término "tratamiento", el término "terapia" incluye efectos curativos, efectos de alivio y efectos profilácticos.

La terapia puede ser en seres humanos o en animales.

45 La terapia puede incluir el tratamiento de una o varias enfermedades priónicas/infección con priones, o una dolencia relacionada.

Homología de secuencia

50 Los fragmentos, mutantes, alelos y otros derivados de las secuencias de interés, conservan preferiblemente una homología sustancial con dicha secuencia. Tal y como se usa en la presente memoria, "homología" significa que las dos entidades comparten suficientes características para que la persona experta determine que son similares.

Preferiblemente, la homología se utiliza para referirse a la identidad de secuencia. Por lo tanto, los derivados de las secuencias de interés conservan preferiblemente una identidad de secuencia sustancial con dicha secuencia.

En el contexto de la presente descripción, una secuencia homóloga se interpreta de modo que incluya cualquier secuencia que es al menos 60, 70, 80 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 o 98% idéntica, a lo largo de al menos 5 residuos o bases, preferiblemente 8, 10, 15, 20, 30, 40, o incluso más residuos o bases, con la secuencia de interés, por ejemplo, tal y como se muestra en el listado de secuencias en este documento. En particular, la homología debería considerarse típicamente con respecto a aquellas regiones de la secuencia de interés que pueden ser conocidas por ser funcionalmente importantes, es decir, las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), en lugar de secuencias adyacentes no esenciales, tales como regiones estructurales, excepto, por supuesto, cuando los residuos estructurales contribuyen a la complementariedad, en donde estos residuos se considerarían también funcionalmente importantes. Las comparaciones de la homología se pueden realizar a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias, fácilmente asequibles. En algunos aspectos de la presente invención, no se utilizan penalizaciones por hueco cuando se determina la identidad de secuencia.

La identidad de secuencia relativa se puede determinar con programas informáticos que pueden calcular el porcentaje de identidad entre dos o más secuencias, usando cualquier algoritmo adecuado para determinar la identidad utilizando, por ejemplo, parámetros por defecto. Un ejemplo típico de este tipo de programa informático es CLUSTAL (véase, Thompson *et al.*, 1994 (NAR 22:4673-80) o <http://www.psc.edu/general/software/packages/clustal/clustal.html>). Ventajosamente, el algoritmo BLAST se emplea con parámetros establecidos para los valores por defecto. El algoritmo BLAST se describe con detalle en http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/blast_help.html, que se incorpora en esta memoria como referencia. Otros programas informáticos utilizados para determinar la identidad y/o la similitud entre secuencias incluyen, pero no están limitados a los mismos, el paquete de programas GCG (Devereux *et al.*, 1984 Nucleic Acids Research 12:387), FASTA (Atschul *et al.*, 1990 J Mol Biol. 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Preferiblemente, las comparaciones de secuencias se realizan utilizando el algoritmo simple de búsqueda BLAST, proporcionado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Aunque en general los métodos mencionados en este documento son bien conocidos en la técnica, se puede hacer referencia en particular a Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" (1989) y Ausubel *et al.*, "Short Protocols in Molecular Biology" (1999) 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc.

Breve descripción de las Figuras

Fig. 1: Transferencias Western de PrP^{Sc} digerida con proteinasa K, precipitada con ácido fosfotúngstico procedente de bazos de ratones 60 días después de la infección (pi) con tembladera de RML. Los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal, excepto en el panel j. Cada carril contiene PrP^{Sc} procedente de un ratón individual. Ter; PrP^{Sc} esplénica agrupada, procedente de ratones que sucumben a la tembladera terminal (195 ± 5 días pi). **a**, Inmunoprecipitación de PrP procedente de cerebro de ratón infectado con tembladera, empleando anticuerpos ICSM o BRIC. PK; proteinasa K. **b-e**, ICSM 18 e ICSM 35 inducían reducciones sustanciales en los niveles de PrP^{Sc} esplénica cuando el tratamiento se iniciaba 7 o 30 días pi. **f**, Densitometría de PrP^{Sc} en transferencias Western. ICSM 18 inducía una mayor reducción en los niveles de PrP^{Sc} en los bazos, que ICSM 35, mientras que BRIC 126 no tuvo ningún efecto (*P<0,001 en comparación con bazos no tratados). **g**, ICSM 18 aclaraba eficazmente PrP^{Sc} si el tratamiento comenzaba 7 o 30 días pi. **h**, ICSM 18 inducía una reducción dependiente de la dosis en los niveles de PrP^{Sc} en los bazos, tal y como se determinó mediante densitometría de las transferencias Western (*P<0,001, ANOVA en comparación con el tratamiento con anticuerpo testigo). **i**, ICSM 35 inducía una inhibición más eficaz de la acumulación de PrP^{Sc} cuando el tratamiento se iniciaba 7 días en lugar de 30 días pi. **j**, ICSM 18 e ICSM 35 inhibían la acumulación de PrP^{Sc} en ratones inoculados por vía intracerebral.

Fig. 2: **a-h**, Tinción inmunohistoquímica de bazos con anticuerpos anti-PrP 60 días después de la inoculación intraperitoneal (i.p.) con tembladera de RML: **a**, El bazo de un ratón infectado con tembladera muestra una inmunorreactividad relativamente débil de PrP con ICSM 18 en las células dendríticas foliculares en varios centros germinales. No hay inmunorreactividad de PrP en el bazo después del tratamiento del animal con ICSM 18 (**b**) o ICSM 35 (**c**) o en los testigos sin inocular (**d**). **e**, La inmunotinción con ICSM 35 revela una fuerte inmunorreactividad de PrP en los centros foliculares en los bazos de ratones infectados con tembladera. **f**, Después del tratamiento con ICSM 18, muy pocos folículos son inmunorreactivos hacia PrP y **g**, No hay folículos positivos detectables después del tratamiento con ICSM 35. No hay folículos positivos en bazos testigos (**h**). Barra de escala = 100 µm.

Fig. 3: **a-d**, Transferencias Western de PrP^{Sc} en homogeneizados de cerebro (**a** y **c**) o PrP tratada con proteinasa K, precipitada con ácido fosfotúngstico procedente de bazos (**b** y **d**). Los niveles de PrP^{Sc} estaban ausentes (**a-c**) o se redujeron significativamente (**d**) en el cerebro y el bazo de ratones tratados con ICSM 18 o ICSM 35 a partir de 7 días pi y se sacrificaron 250 días pi. Ratones tratados con anticuerpos (Ab) BRIC testigos, sucumbieron a la tembladera después de 195 días pi. PK; proteinasa K. **e**, Análisis inmunohistoquímico de poblaciones de células inmunes del bazo. Secciones de bazo congeladas procedentes de ratones 60 días pi, se inmunotifieron (depósitos marrones) con antisueros contra linfocitos T (CD4 o CD8), linfocitos B (CD19) o células dendríticas foliculares (CDF-M1). No se observaron diferencias en las poblaciones de CDF o linfocitos entre los ratones sin tratar, los tratados

con ICSM 35, ICSM 18 y BRIC 222 (tratados a partir de 7 días pi). La columna de más a la derecha muestra paneles con un aumento mayor (mayor aum.) de los centros germinales en la columna adyacente (menor aum.). La microfotografía de BRIC 222 de la columna de más a la derecha representa un testigo de anticuerpo no primario. Barra de escala= 100 µm.

Figura 4. Los ratones se pesaron semanalmente a partir de 17 semanas (**panel a**) o 22 semanas (**panel b**) después de la inoculación intracerebral o intraperitoneal de tembladera. La pérdida de peso fue evidente después de la inoculación intracerebral en todos los ratones, excepto en el grupo inoculado con PBS, pero no en los ratones inmunizados pasivamente con ICSM 18 o ICSM 35 a partir de 7 o 30 días después de la inoculación intraperitoneal (pi) de priones de tembladera de RML. Los ratones sin tratar y tratados con BRIC 126 pierden peso de forma constante a partir de 22 semanas pi hasta la muerte por enfermedad tembladera terminal (sin tratamiento; 197 ± 5 días pi, BRIC 126; 195 ± 7 días pi) (confirmado por transferencia Western de PrP^{Sc}).

Figura 5. Inmunotinción de PrP^C en muestras de bazo procedentes de ratones tratados durante 30 días con 2 mg de ICSM 35 o ICSM 18, administrado dos veces a la semana por vía intraperitoneal. Un bazo completo (2 µl de un homogeneizado al 10%) procedente de ratones individuales tratados o sin tratar, se inmunotransfirió y se detectó la PrP^C usando ICSM 18 biotinilado. Cada carril se obtiene a partir de un solo ratón y es representativo de los tres ratones en cada grupo.

Ejemplos

Métodos generales:

Inoculación de ratones FVB/N con inóculo de priones de RML. Con los priones del laboratorio Rocky Mountain (RML) se hicieron pases en ratones FVB/N y el inóculo de prión se preparó a partir de cerebros de ratones enfermos terminales (tiempo de incubación hasta la tembladera terminal, 153 ± 4 días). Los cerebros se homogeneizaron en PBS (10% p/v) con 1% de BSA usando un Ribolyzer (Hybaid). El homogeneizado se centrifugó durante 5 min a 500 x g y el material sobrenadante se agrupó y se congeló a -80° C hasta su uso. El título infeccioso del homogeneizado agrupado se determinó como 8,1 log DL₅₀/g de cerebro mediante un ensayo de infectividad con ratones²⁶ *tga20* indicadores. Ratones FVB/N fueron inoculados por vía intracerebral con 30 µl, o por vía intraperitoneal con 100 µl de 1% de homogeneizado.

Bioensayos de la infectividad. Los ensayos se realizaron en homogeneizados de bazo al 1%.

Partes alícuotas de 30 µl fueron inoculadas por vía intracerebral en grupos de 3 o 4 ratones *tga20* por bazo, tres o cuatro bazos por régimen de tratamiento. El tiempo de incubación hasta la tembladera terminal se determinó y los títulos de infectividad se calcularon utilizando la ecuación $y = 11,45 - 0,088x$ (para RML 4.1), en donde y es el título infeccioso (log DL₅₀), y x es el tiempo de incubación (en días) hasta la enfermedad terminal²⁶.

Inmunización pasiva. A los grupos de ratones se les inyectó dos veces a la semana por vía intraperitoneal, 2 mg (a menos que se indique otra cosa) de anticuerpos monoclonales ICSM 18, ICSM 35, testigo de isotipo IgG₁ (BRIC 222 que reconoce CD44²⁷) o testigo de isotipo IgG_{2b} (BRIC 126 que reconoce CD47²⁸) en PBS. En los animales se controlaron diariamente los síntomas clínicos de tembladera²⁹ y se pesaron semanalmente a partir de 17 semanas después de la inoculación ic o 22 semanas después de la inoculación ip. Los signos clínicos en los ratones no tratados se observaron primero, aproximadamente 4 semanas antes de la enfermedad terminal (día de la muerte) e incluían pelo burdo/decoloración, pérdida de peso progresiva, bradicinesia (movimiento lento), rigidez de la cola, distonía (pie corchete), cifosis (espalda encorvada), ataxia y estupor. Los pesos de los ratones infectados con tembladera (sin tratar) se redujeron antes de la enfermedad terminal a partir de 3 y 4 semanas, respectivamente, en los ratones inoculados por ic e ip (Figura 4). La confirmación de la enfermedad tembladera se realizó por análisis de transferencia Western de PrP^{Sc} en el tejido cerebral y en algunos casos mediante inmunohistoquímica convencional de PrP.

Inmunoprecipitación. La inmunoprecipitación de PrP a partir de los tejidos cerebrales de mürido, utilizando anticuerpos ICSM y BRIC, se realizó tal y como se ha descrito.

Análisis con transferencia Western. Los bazos se homogeneizaron en PBS al 10% p/v y PrP^{Sc} precipitó en 500 µl de homogeneizado, usando ácido fosfotúngstico sódico (NaPTA) tal y como se ha descrito previamente³⁰. El sedimento de PrP^{Sc} se resuspendió en 20 µl de tampón de sarcosilo al 2%, se trató con proteinasa K (50 µg/ml, 50 min, 37°C), se hirvieron en tampón de la muestra (5 min) y 15 µl de partes alícuotas (equivalente a ~2 mg de homogeneizado de bazo) se sometieron a electroforesis a través de geles de SDS-PAGE al 16%. Los homogeneizados cerebrales se diluyeron hasta el 1% (peso/vol) en PBS, se trataron con proteinasa K (50 µg/ml durante 60 min, 37°C) y se sometieron a electroforesis como para los bazos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante transferencia semiseca, se bloquearon con TBST/leche descremada al 5%, se incubaron con ICSM 18 biotinilado (0,1 µg/ml) y se revelaron mediante quimioluminiscencia mejorada (Amersham). La semicuantificación se realizó por análisis densitométrico, utilizando el programa MacBas versión 2.5. Se examinaron por lo menos 3-5 ratones de cada grupo de tratamiento. Las barras en las gráficas son las desviaciones estándar. Para normalizar la señal de PrP^{Sc} entre las transferencias, 10 µl de PrP^{Sc} precipitada procedente de bazos agrupados de ratones afectados con tembladera terminal (Ter), se cargaron en cada gel. La medición densitométrica de PrP^{Sc} procedente de bazos

tratados y sin tratar, se comparó con la muestra estándar de PrP^{Sc} y se ajustó a intensidades relativas.

Histología e inmunohistoquímica. Para la inmunohistoquímica de PrP^{Sc}, los bazo y los cerebros se fijaron en formol al 10%. La infectividad de los priones se inactivó por inmersión en ácido fórmico al 98% y se fijó posteriormente en formol durante 24 horas. Los tejidos se deshidrataron en alcoholes graduados y xileno, se embebieron en parafina, se cortaron secciones con un espesor nominal de 3 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Después de la recuperación del antígeno sometiendo a microondas durante 15 min, las secciones se inmunotifieron con ICSM 18 o ICSM 35 biotinilados en un aparato de tinción automatizada Ventana (www.ventanamed.com). Para la tinción de las células inmunitarias, los bazo se congelaron sobre hielo seco en OCT. Se secaron al aire, las secciones congeladas (8-10 µm) se fijaron en acetona durante 10 min, se secaron al aire durante 15 min y se inactivaron las peroxidases endógenas durante 10 min con 0,1% de H₂O₂. Después de lavar en PBS, las secciones se inmunotifieron para estudiar el marcador de las células dendríticas foliculares, CDF-M1 (1:50), los linfocitos T, CD4 y CD8a o los linfocitos B, CD19 (todos 1:100, adquiridos en Pharmingen) y se visualizaron mediante incubación con IgG de cabra anti-rata biotinilada (1:50) y estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP)/DAB. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina y se montaron para observación microscópica. Para los testigos, se omitieron los anticuerpos primarios.

ELISA de anticuerpos ICSM en suero de ratón. Se recubrieron placas con 96 pocillos para ELISA con PrP⁹⁰⁻²³¹ alfa de ratón recombinante (10 µg/ml) en tampón de recubrimiento de ELISA (bicarbonato de sodio 35 mM, carbonato de sodio 15 mM, pH 9,4) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS más 0,05% de Tween 20 (PBST), se bloquearon con suero de ternera fetal al 10% en medio RPMI y se incubaron con 50 µl de muestras de suero de ratón diluidas en serie durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados, una dilución 1/5000 de una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma), se añadió durante 30 min a 37°C y se lavaron otras tres veces. Las placas se revelaron con tampón OPD antes del análisis espectrofotométrico (490 nm). ICSM 35 o ICSM 18 diluidos en serie, se midieron en paralelo para construir curvas de calibración estándar.

Ejemplo 1: Producción de agentes para uso en la inhibición de priones

PrP⁹¹⁻²³¹ humana recombinante, plegada en conformaciones^{8,9} alfa o beta, se utilizó para producir anticuerpos monoclonales en ratones¹⁰ *Prnp*^{0/0} que no toleran PrP^c.

ICSM 35, un AMo de IgG_{2b} producido contra PrP beta, con alta afinidad tanto hacia PrP^c y PrP^{Sc} de múdo (Fig. 1a) reconoce una región entre los residuos de aminoácidos 91-110.

ICSM 18 (isotipo IgG₁), producido contra PrP alfa, reconoce los residuos 146-159 de PrP de múdo y tiene menor afinidad hacia PrP^{Sc} (Fig. 1a).

Producción de anticuerpos monoclonales. Se produjeron anticuerpos monoclonales ICSM 35 e ICSM 18. Los AMos ICSM y BRIC se purificaron de forma idéntica por afinidad, a partir del material sobrenadante del cultivo, se concentraron y se almacenaron en forma de soluciones estériles sin proteína vehículo a 4°C. Los AMos se utilizaron sin diluir o diluidos en PBS antes de su uso *in vivo*.

Ejemplo 2: Uso de anticuerpos anti-PrP en la inhibición de priones *in vivo*

Ratones FVB/N fueron expuestos por vía intraperitoneal (ip) a homogeneizado de cerebro con tembladera de RML, obtenido a partir de ratones con enfermedad terminal tembladera y tratados con ICSM 35, ICSM 18 o anticuerpos testigos de isotipo BRIC 126 (IgG_{2b}) y BRIC 222 (IgG₁), mediante inyección ip dos veces por semana (2 mg por inyección) a partir de 7 o 30 días después de la inoculación (pi).

ELISA de anticuerpos ICSM en suero de ratón

Los niveles séricos en ratones tratados con ICSM 35 e ICSM 18 (4 ratones/grupo) se cuantificaron mediante ELISA, 30 días después de comenzar con inyecciones intraperitoneales de 2 mg dos veces por semana. Los niveles séricos de ICSM 35 e ICSM 18, 4 días después del último tratamiento, fueron 460 ± 50 y 398 ± 38 µg/ml, respectivamente (media ± DE). La diferencia no era significativa (P<0,10, ANOVA).

Por lo tanto, el análisis de ELISA después de 30 días de tratamiento con AMos no reveló diferencias significativas entre los niveles de los AMos ICSM 35 o ICSM 18 en el suero.

Las transferencias Western de PrP^{Sc} tratada con proteinasa K, precipitada con ácido fosfotúngstico, procedente de bazo de ratones 60 días pi, revelaron que el tratamiento a partir de 7 días pi con ICSM 35 o ICSM 18, pero no con anticuerpos BRIC, inhibía fuertemente la acumulación de PrP^{Sc} en el bazo (Fig. 1b-d).

El análisis a lo largo del tiempo de la acumulación de PrP^{Sc} periférica en los ratones, confirmó que PrP^{Sc} era detectable en el bazo a los 7 días, y se estabilizó 30-40 días después de la exposición periférica, tal y como se ha descrito¹² anteriormente.

El tratamiento de ratones infectados con tembladera con ICSM 35 o ICSM 18, a partir de 30 a 60 días pi, daba como resultado una reducción sustancial en los niveles esplénicos de PrP^{Sc} en comparación con los testigos sin tratar o

con ratones tratados con el anticuerpo de isotipo testigo (Fig. 1e).

ICSM 18 reducía los niveles de PrP^{Sc} en un $99 \pm 1\%$ y $96 \pm 3\%$ (media más/menos desviación estándar, $*P < 0,001$, análisis de la varianza (ANOVA)) después del tratamiento a partir de 7 o 30 días pi, respectivamente (Fig. 1f). ICSM 35 también reducía los niveles de PrP^{Sc} en un $90 \pm 8\%$ y $75 \pm 3\%$ ($*P < 0,001$, ANOVA) durante los mismos periodos de tratamiento, mientras que el anticuerpo de isotipo testigo no alteró los niveles de PrP^{Sc} (Fig. 1f). Las inmunotransferencias se sondaron con ICSM 35 en lugar de ICSM 18, ya que el anticuerpo primario producía resultados indistinguibles.

El tratamiento de los ratones a partir de 7 o 30 días pi con ICSM 18 produjo de manera consistente una pérdida casi completa de la PrP^{Sc} detectable en los bazos, mediante transferencia Western (Fig. 1g) y este efecto era dependiente de la dosis (Fig. 1h). El tratamiento con ICSM 35 a partir de 7 días pi reducía los niveles esplénicos de PrP^{Sc} con una eficacia similar a ICSM 18.

Cuando el tratamiento con ICSM 35 comenzaba a los 30 días pi, la inhibición de la replicación de PrP^{Sc} era sustancial, pero posiblemente incompleta (Fig. 1i). Esto puede reflejar diferencias en la afinidad o la avidez de ICSM 35 e ICSM 18 hacia PrP normal y PrP relacionada con la enfermedad, tal y como se muestra en la Fig. 1a.

Se obtuvieron resultados análogos cuando ratones inoculados por vía intracerebral (ic) fueron tratados con ICSM 18 o ICSM 35 (Fig. 1j). Como ICSM 18 reconoce el epítipo 146-159 de PrP, estos datos concuerdan con que los residuos 132 a 156 que incorporan la hélice 1 de PrP de ratón, tienen un papel crucial en la replicación^{6-7,13-15} de los priones.

Secciones de tejido obtenidas a partir de bazos fijados con formol a los 60 días pi, fueron examinadas mediante inmunohistoquímica convencional de PrP, utilizando ICSM 18 e ICSM 35 (Fig. 2a-h). Ambos AMos se aplicaron a secciones esplénicas adyacentes para asegurar que el anticuerpo unido *in vivo* no bloqueaba falsamente el AMo detector. ICSM 18 produjo una tinción débil de PrP^{Sc} en los bazos de ratones sin tratar, infectados con tembladera (Fig. 2a), mientras que ICSM 35 desarrolló una tinción intensa de PrP^{Sc}, asociada principalmente con los centros germinales (Fig. 2e).

La inmunotinción de PrP^{Sc} se redujo sustancialmente en bazos de ratones tratados con ICSM 18 e ICSM 35 cuando se marcaban con ICSM 18 (Fig. 2b y c) o ICSM 35 (Fig. 2f, 2g y 5) como anticuerpo primario.

Cuantificación de los centros germinales con PrP^{Sc} en ratones tratados con anticuerpos ICSM

Se cuantificó el número de centros germinales que eran positivos para PrP^{Sc}, obtenidos a partir de cada bazo (enmascarado para el tratamiento). Se examinaron al menos 6 secciones de 3 bazos en cada grupo de tratamiento. La tinción de ICSM 35 reveló que $24 \pm 10\%$ (media $\pm$ DE) de los centros germinales eran positivos para PrP^{Sc} en los bazos sin tratar (testigo positivo) y esta se redujo a $1 \pm 3\%$ y $3\% \pm 4$ en bazos tratados con ICSM 35 y en bazos tratados con ICSM 18, respectivamente ($P < 0,0005$, ANOVA). Se observaron reducciones análogas de centros germinales positivos para PrP^{Sc} después de la tinción con ICSM 18.

Como era de esperar, los centros germinales positivos para PrP^{Sc} no se observaron en secciones esplénicas procedentes de ratones sin exponer a priones de RML (Fig. 2d y h). Un bioensayo de homogeneizados esplénicos procedentes de ratones tratados con ICSM 18 e ICSM 35, mostró, respectivamente, una reducción logarítmica de 1,5-3,5 y >4 en los títulos infecciosos, en comparación con los testigos (Tabla 1).

Ejemplo 3: Tratamiento/prevencción de la enfermedad priónica en sujetos

La evidencia de un beneficio clínico acompañante se presenta en este Ejemplo.

El tratamiento es efectivo si se inicia antes de la aparición de la tembladera clínica (Tabla 1).

Los ratones que fueron inoculados por vía intraperitoneal con tembladera de RML y se trataron con ICSM 35 o ICSM 18 (2 mg dos veces por semana) a partir de 7 y 30 días pi, sobreviven durante mucho más tiempo que los ratones no tratados o los ratones tratados con anticuerpo de isotipo testigo (Tabla 1).

La supervivencia media para los ratones no tratados inoculados por vía ip era de 197 ± 5 días. Todos los ratones tratados con ICSM 18 o ICSM 35 a partir de 7 o 30 días después de la exposición ip, sobrevivieron más de 400 días pi en el momento en que se preparaba este manuscrito (Tabla 1); una extensión del periodo de incubación de al menos 100% ($P < 0,001$, ANOVA). Además, no se observaron signos clínicos de tembladera (tal y como se describen en la sección Métodos) o de pérdida de peso (Figura 4) en estos ratones.

Pesos corporales en ratones tratados con el anticuerpo ICSM y en ratones testigos

Ratones sin tratar, inoculados por vía intracerebral e intraperitoneal desarrollaron signos clásicos de tembladera (véase la sección Métodos para los signos clínicos), incluyendo una pérdida de peso progresiva hasta la muerte (Fig. 4a y b). El tratamiento con ICSM 18 o ICSM 35 fracasó en la prevención de la pérdida de peso en los animales inoculados por vía ic (Fig. 4a). Por el contrario, los ratones inoculados por vía ip, tratados con ICSM 18 o ICSM 35,

5 todavía no han mostrado ningún signo clínico (>400 días) o pérdida de peso (>385 días) después de la exposición a RML (Fig. 4b). Los pesos corporales de los ratones sin tratar y de los ratones tratados con anticuerpo de isotipo testigo, se redujeron significativamente (un promedio de 7,4 gramos por ratón en el momento de la muerte, $P < 0,007$, ANOVA, en comparación con los ratones tratados con ICSM) a partir del día 154 pi hasta la muerte por tembladera (Fig. 4b).

Por lo tanto la presente invención proporciona métodos para el tratamiento y la prevención de la enfermedad priónica.

10 Se examinaron tejidos de ratones inoculados por vía ip, tratados con ICSM 18 o ICSM 35, a partir de 7 días pi y sin signos clínicos de tembladera (se sacrificaron 250 días pi). Aquí la PrP^{Sc} no era detectable en el cerebro después de cualquier tratamiento y solo se observaron bajos niveles de PrP^{Sc} en los bazo de ratones tratados con ICSM 35 (Fig. 3a-d). No se observó una disminución de la inmunotinción de PrP^{C} en las muestras de bazo procedentes de ratones tratados con ICSM 35 o ICSM 18, en comparación con los testigos sin tratar (Fig. 5).

Esto ilustra la eficacia de la invención en la inhibición de la replicación de priones *in vivo*.

15 Del mismo modo, no se observó PrP^{Sc} en el cerebro después del tratamiento con ICSM 35, a partir de 30 días pi y se analizó 230 días pi. Se observaron altos niveles de PrP^{Sc} en cerebros y bazo procedentes de ratones tratados con anticuerpo BRIC y de ratones sin tratar que sucumbieron a la tembladera después de la inoculación por vía ip (Fig. 3a-d). Estos hallazgos fueron confirmados por análisis histopatológicos y un bioensayo de la infectividad de estos tejidos está en curso.

Ejemplo 4: Inhibición de la replicación de priones

20 Este Ejemplo ilustra la inhibición de la replicación de priones de acuerdo con la presente invención. Además, se muestra que este efecto es debido a la inhibición de la replicación de los priones, en lugar de a una pérdida general de PrP .

25 Hemos examinado si la inmunización pasiva con AMos anti- PrP afectaba a las poblaciones de células inmunes, ya que el agotamiento selectivo de tipos celulares PrP^+ podría haber contribuido teóricamente a la pérdida de detección de PrP^{Sc} en los bazo de ratones tratados con anticuerpos, descritos en el Ejemplo 3^{16,17}.

Citometría de flujo

Poblaciones de linfocitos T y linfocitos B esplénicos se analizaron por citometría de flujo (Tabla 2). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de las poblaciones de linfocitos T y B procedentes de ratones tratados con ICSM 35 o ICSM 18, en comparación con los testigos con anticuerpos BRIC (prueba t de Student apareada).

30 Tabla 2 Análisis por citometría de flujo de poblaciones de linfocitos T y B esplénicos procedentes de ratones tratados con ICSM 35 o ICSM 18.

Tratamiento con anticuerpo ^a	CD3 ⁺ (%) ^b	CD19 ⁺ (%)
Sin tratar	42,8 ± 3,4	43,4 ± 4,1
ICSM 18	48,7 ± 3,0	37,6 ± 2,6
ICSM 35	48,1 ± 3,9	40,1 ± 3,6
BRIC 126	46,0 ± 5,0	41,1 ± 5,9
BRIC 222	47,6 ± 5,1	37,0 ± 4,6
^a Los ratones (n = 4/grupo) fueron tratados con 2 mg de anticuerpo ICSM o BRIC dos veces a la semana durante 30 días.		
^b Los esplenocitos se recogieron y las suspensiones de células individuales se realizaron por dispersión suave.		

35 Partes alícuotas de 2×10^5 células procedentes de cada bazo se incubaron con cantidades saturantes de anti-CD19-isotiocianato de fluoresceína y anti-CD3-ficoeritrina conjugadas directamente (ambas IgG₁) (Pharmingen, GB) y se analizaron mediante citometría de flujo en un instrumento FACS de Calibur (Becton Dickinson, GB). La proporción de linfocitos B (CD19⁺) y linfocitos T (CD3⁺) en las poblaciones de células mononucleares esplénicas seleccionadas, se determinó utilizando el programa CellQuest y la significación de las diferencias observadas se analizó mediante ANOVA. <1% de las células eran doble positivas.

40 No se observaron diferencias en las poblaciones de linfocitos T y B esplénicos entre los ratones sin tratar inoculados con tembladera y los ratones tratados con anticuerpos (examinados a los 60 días pi), tal y como se determinó por inmunotinción de secciones de tejido con criostato (Fig. 3e, véase también la Tabla 2).

45 Las células dendríticas foliculares (CDFs) son un sitio importante de acumulación de PrP^{Sc} después de la infección periférica^{17,18} con priones. La inmunotinción de secciones de bazo procedentes de ratones sin tratar, reveló células CDF-M1⁺ dispersas entre los centros germinales o en pequeños grupos dentro del centro germinal (Fig. 3e). Por el contrario, los bazo tratados con anticuerpo ICSM o BRIC revelaban frecuentemente un mayor número de células

CDF-M1⁺ agrupadas estrechamente dentro del centro germinal (Fig. 3e). Estos datos muestran claramente que el tratamiento prolongado con anticuerpos anti-PrP no induce la supresión del tipo celular CDF en el bazo y muestran que la reducción sustancial de los niveles de PrP^{Sc} observados en los bazos tratados con AMos anti-PrP, es debida a la inhibición directa de la producción de PrP^{Sc}. Esto se ilustra adicionalmente mediante inmunotransferencia de PrP^C inalterada en homogeneizados de bazo procedentes de ratones tratados con ICSM 35 o ICSM 18 (Figura 5).

Ejemplo 5: Cartografiado de epítomos y métodos más detallados

Resumen:

Las enfermedades priónicas son un grupo de trastornos neurodegenerativos invariablemente fatales que incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en los seres humanos, la tembladera en ovinos y caprinos, y la encefalopatía espongiforme bovina en el ganado bovino. El agente infeccioso o prión se compone en gran parte de una isoforma anormal (PrP^{Sc}) de una proteína celular normal codificada por un hospedador, PrP^C. La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} es un proceso dinámico y por razones que no están claras, la distribución del cambio espongiforme y la deposición de PrP^{Sc} varía entre las cepas de priones. Una explicación para esto podría ser que la eficacia de la transformación en cualquier región dada del cerebro, depende de interacciones favorables entre las conformaciones de PrP^C y la cepa del prión que se está propagando dentro de ella. Sin embargo, la identificación de conformaciones específicas de PrP^C ha estado hasta ahora obstaculizada por la falta de paneles adecuados de anticuerpos que discriminan subespecies de PrP^C en condiciones naturales. En este estudio, mostramos que los anticuerpos monoclonales producidos contra la proteína priónica humana recombinante, plegada en las conformaciones alfa o beta, muestran una heterogeneidad sorprendente en su especificidad hacia los truncamientos y las glicoformas de PrP^C de cerebro de ratón. A continuación, mostramos que algunas de estas isoformas de PrP^C se expresan de forma diferente en ciertas regiones del cerebro del ratón. Esto sugiere que la variación en la expresión de las conformaciones de PrP^C en diferentes regiones del cerebro, puede dictar el patrón de deposición de PrP^{Sc} y la vacuolización, característico para diferentes cepas de priones.

La proteína priónica celular (PrP^C) se expresa en casi todos los sitios y se conserva en varias especies de mamíferos (Oesch *et al.*, 1991). A pesar de que los mayores niveles de PrP^C se encuentran en las neuronas (Bendheim *et al.*, 1992), su papel fisiológico exacto sigue siendo desconocido y ratones transgénicos carentes de PrP^C (Prnp^{0/0}) tienen poca anomalía fenotípica (Bueler *et al.*, 1992). PrP^C puede tener un papel fisiológico en la diferenciación neuronal (Wion *et al.*, 1988), la transmisión sináptica (Collinge *et al.*, 1994) y un trabajo reciente muestra su alta afinidad hacia el cobre (Jackson *et al.*, 2001). PrP^C está anclada en la superficie celular por un resto de glicosilfosfatidilinositol (GPI) carboxi-terminal (Stahl *et al.*, 1990). Se han identificado dos sitios de glicosilación no obligatoria, ligadas a Asn, en los residuos 180 y 196 y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en 178 y 213 en PrP^C (Caughey, 1993). La PrP^C madura y totalmente glicosilada de ratón migra a 33-35 kDa sobre geles electroforéticos y su equivalente no glicosilada a 27 kDa (Haraguchi *et al.*, 1989). En el cerebro humano, también se han identificado otras 2 proteínas priónicas truncadas amino-terminales, que son el resultado de una escisión proteolítica endógena. Sus formas no glicosiladas migran respectivamente, a 18 kDa y 21-22 kDa (Jimenez-Huete *et al.*, 1998).

Las enfermedades priónicas son enfermedades neurodegenerativas transmisibles, invariablemente fatales que incluyen la tembladera en ovejas y cabras, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en bovinos y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en humanos. El agente infeccioso o prión se compone principalmente de PrP^{Sc}, una isoforma de PrP^C insoluble en detergente y resistente a la proteasa (Prusiner, 1982). La adquisición de resistencia a la proteasa se explica por la conversión posterior a la traducción y autocatalítica de la PrP^C, desde una conformación en gran medida alfa-helicoidal, a una rica en lámina beta (PrP^{Sc}). Dentro de las especies, el fenotipo de la enfermedad no es uniforme y las "cepas" de priones se pueden diferenciar basándose en el período de incubación y los cambios neuropatológicos que inducen en líneas endogámicas de ratón infectadas de forma experimental. Actualmente, la opinión predominante es que la diversidad de cepas se determina por variaciones en la conformación de PrP^{Sc} o en la composición de la glicoforma (Bessen y Marsh, 1994; Collinge *et al.*, 1996; Telling *et al.*, 1996). Neuropatológicamente, la variación regional precisa en la vacuolización y la deposición de PrP^{Sc} sugiere una orientación específica de la cepa, en determinadas poblaciones neuronales (Bruce *et al.*, 1994a). Sin embargo, queda por explicar cómo, durante la propagación del prión, PrP^{Sc} se acumula selectivamente en algunas regiones del cerebro y en otras no. Una hipótesis atractiva sería que conformaciones alternativas de PrP^{Sc} interaccionan de forma más o menos eficaz con subespecies o isoformas de PrP^C, expresadas de forma diferencial en ciertas regiones del cerebro. El objetivo de este ejemplo fue determinar, por tanto, si existe tal variación anatómica en la expresión de las isoformas de PrP^C en el sistema nervioso central (SNC).

Producción de anticuerpos

Primero producimos y caracterizamos un nuevo panel de anticuerpos monoclonales (AMos) que muestran una afinidad diferencial hacia las formas truncadas y glicosiladas de PrP^C natural, y luego lo utilizamos para estudiar la distribución anatómica de estas isoformas heterogéneas de PrP^C en secciones recién congeladas de cerebro de ratón. Este trabajo indica que de hecho existen diferencias cualitativas en la expresión de PrP^C en el cerebro normal, lo que apoya la noción de que tales diferencias pueden dictar el patrón de deposición de PrP^{Sc} y de vacuolización, característico de diferentes cepas de priones.

Producción de los anticuerpos ICSM

Todos los experimentos con ratones se han realizado cumpliendo nuestras directrices institucionales y del Ministerio de Interior. Ratones FVB-N *Prnp*^{0/0} fueron inmunizados por vía subcutánea con 50-100 µg de PrP⁹¹⁻²³¹ recombinante humana, plegada ya sea en la conformación alfa (para producir ICSM 1 a 26) o beta (para producir ICSM 35) (Jackson *et al.*, 1999b) en adyuvante, los días 0, 21, 42, y, finalmente, reforzados por vía intraperitoneal el día 50 con 50 µg en PBS. Tres días más tarde, los ratones fueron sacrificados y las suspensiones de células individuales de esplenocitos se crioconservaron. Estas se descongelaron después y se fusionaron a continuación con células NS0 no secretoras, utilizando tecnología convencional y los hibridomas se seleccionaron posteriormente para estudiar la reactividad con PrP alfa o beta y con PrP natural. Los hibridomas positivos se clonaron varias veces hasta que se estabilizaron.

ELISA con péptidos

Placas de ELISA de unión elevada se recubrieron con 50 µl de una solución de 10 µg/ml de péptidos solapantes con 15 a 20-meros de PrP de ratón y humanos en tampón de recubrimiento de ELISA (bicarbonato de sodio 35 mM, carbonato de sodio 15 mM, pH 9,4). Las placas se incubaron durante 1 h a 37°C y después se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) - 0,05% de Tween. Después de bloquear con RPMI suplementado con 10% de suero de ternera fetal, se añadieron 50 µl del AMo relevante (como material sobrenadante del cultivo), durante 1 h a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-Tween, se añadió una dilución 1/5000 de una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma, Reino Unido), durante 30 min a 37°C y se lavó 3 veces más. La placa se reveló a continuación con tampón OPD y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 3 M, antes del análisis espectrofotométrico.

Inmunoprecipitación de PrP^C de múrido

Tejidos cerebrales procedentes de tres ratones FVB/N y FVB/N *Prnp*^{0/0} (Zurich I (Büler *et al.*, 1992)) se homogeneizaron (10% de p/v en PBS) con un homogeneizador Dounce, y se centrifugaron a 1000 x g. El material sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso posterior. Para la inmunoprecipitación, los homogeneizados cerebrales se diluyeron hasta 0,5% en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, cloruro sódico 150 mM, 1% de Nonidet P40, 0,5% de desoxicolato de sodio) con una mezcla de inhibidores de proteasa (Roche Biochemicals, GB). La solución se incubó a continuación (dilución 1:1) con 10 µg/ml de AMos ICSM purificados en PBS o con material sobrenadante del hibridoma puro, durante 2 h, a 4°C en un rotador. Los testigos negativos consistían en la omisión del AMo de captura o IgG₁ (28-14-8S, un AMo anti-MHC H-2D^b (Ozato *et al.*, 1980) y testigos de isotipo IgG_{2b} (Avent *et al.*, 1988). Los complejos inmunes se adsorbieron a continuación durante una noche a perlas de proteína G-agarosa (Biomedicals Roche, Reino Unido) a 4°C en un rotador. Las perlas se lavaron a continuación con tampones con alto o bajo contenido en sales, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Después del último lavado, las perlas se resuspendieron en tampón de Laemmli (Laemmli, 1970), se calentaron a 100°C durante 5 min para separar/desnaturalizar la proteína unida y las perlas se sedimentaron y el material sobrenadante se eliminó.

Inmunoprecipitación secuencial de PrP^C de ratón

Para agotar el homogeneizado de cerebro de PrP^C de longitud completa, 0,5% de homogeneizado de cerebro se incubó (dilución 1:1) con 50 µg/ml de ICSM 35 purificado (véanse los resultados) durante 3 h, a 4°C en un rotador. Los complejos inmunes se adsorbieron a continuación durante una noche a perlas de proteína G-agarosa a 4°C en un rotador. Las perlas se sedimentaron después y los fragmentos de PrP^C contenidos en el material sobrenadante se inmunoprecipitaron (dilución 1:1) con 10 µg/ml de AMos ICSM purificados o con material sobrenadante, antes de la adsorción a la proteína G, tal y como se ha descrito anteriormente.

Desglucosilación enzimática de PrP^C inmunoprecipitada

Un parte alícuota de 10-20 µl de la PrP^C inmunoprecipitada y desnaturalizada posteriormente, se digirió con 1000 U de PNGasa recombinante (New England Biolabs, Reino Unido) durante 2 horas a 37°C, en 1% de Nonidet P40 y el tampón del propietario. Las proteínas desglucosiladas se precipitaron a continuación, en 3 volúmenes de acetona fría y se resuspendieron en 10-20 µl de tampón Laemmli.

Inmunotransferencias

Muestras de proteínas inmunoprecipitadas (desglucosiladas o no) se dejaron migrar en geles de poliacrilamida al 12%, se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Reino Unido) y se inmunotransfirieron con 0,2 µg/ml de ICSM 18 biotinilado, evitando la detección del anticuerpo de la inmunoprecipitación. Después de varios lavados con PBS-Tween, se añadió 1/10000 de dilución de estreptavidina-HRP (Sigma, Reino Unido). La inmunorreactividad se visualizó con un kit de quimioluminiscencia mejorado sobre películas autorradiográficas (ECL+, Amersham, Reino Unido). Los marcadores del peso molecular biotinilados (Amersham) se utilizaron para correlacionar con precisión la movilidad electroforética del inmunoprecipitado con su peso molecular.

Inmunohistoquímica de PrP^C de ratón

Estudios inmunohistoquímicos se realizaron en cinco ratones FVB/N y FVB/N *Prnp*^{0/0} (Zurich I). Los ratones fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital. Los cerebros se extrajeron rápidamente, se embebieron en compuesto OCT y se congelaron sobre hielo seco. En un criostato se cortaron secciones de 8 µm, se fijaron en acetona durante 10 min y se secaron al aire. La peroxidasa endógena se inactivó durante 30 minutos con una solución al 0,3% de H₂O₂ en metanol. Después de lavar en PBS, se bloqueó la unión no específica de anticuerpos con suero de cabra normal durante 30 min. Las secciones se tiñeron después durante 1 h, ya sea con 10 µg/ml de AMos ICSM o con material sobrenadante de hibridoma puro. Estas concentraciones fueron optimizadas para la unión específica, utilizando secciones equivalentes de ratón sin PrP. Después de lavar en PBS, se añadió una dilución 1/100 de IgG anti-ratón conjugada con HRP (Sigma, Reino Unido) durante 45 min. La actividad de la peroxidasa se reveló con tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina durante 3-10 min (Sigma, Reino Unido). Las secciones se contra-tiñeron con hematoxilina (Harris, Reino Unido), se montaron y se cubrieron para la observación microscópica.

Nomenclatura

La numeración de los residuos de PrP se corresponde a PrP de ratón a lo largo de todo el estudio.

Resultados

Cartografiado de epítomos de los anticuerpos monoclonales ICSM

Los AMos ICSM 1 a 26 se obtuvieron en ratones FVB/N *Prnp*^{0/0} inmunizados con PrP⁹¹⁻²³¹ humana recombinante, producida en *E. coli* y replegada en una conformación similar a PrP^C, predominantemente alfa-helicoidal (Jackson *et al.*, 1999a). ICSM 35 se obtuvo después de la inmunización con PrP⁹¹⁻²³¹ recombinante humana, replegada en una conformación beta (PrP beta) (Jackson *et al.*, 1999a). Por consiguiente, los epítomos de todos estos AMos deben estar entre el codón 91 y 231 (Fig. 1A). Para definirlos aún más, se realizó un ELISA de péptidos con péptidos solapantes de 15 a 20-meros de ratón y ser humano, que cubren esta secuencia. Se mostró que ICSM 18 se unía fuertemente al péptido 146-159, una región central que abarca la primera hélice α de PrP^C (Riek *et al.*, 1996). ICSM 15 y 17 reconocían una región similar, entre los residuos 140 y 159, aunque ICSM 15 no reconoce PrP^C murina (Fig. 2F). ICSM 35 reconocía un péptido entre los residuos 96 y 109 (Fig. 1A). Ninguno de los otros AMos ICSM utilizados en este estudio reconocían péptidos sintéticos absorbidos a placas de ELISA o inhibían la unión del AMo a una proteína recombinante, en ensayos de competición, lo que sugiere que sus epítomos son dependientes de la conformación.

Sumario de los Ejemplos

En esta memoria se describe por primera vez que la replicación periférica sustancial de priones se puede suprimir con eficacia mediante inmunización pasiva. Es importante destacar que el tratamiento comenzó posteriormente al inicio de la replicación periférica del prión y, en el caso del grupo de tratamiento de 30 días pi, durante la fase estabilizada de acumulación¹² de PrP^{Sc}. El tratamiento continuado ha retrasado la aparición de tembladera en más de un 100% del período de incubación habitual en ratones FVB/N de tipo silvestre, lo que ilustra un tratamiento/prevenición eficaz de la enfermedad priónica, de acuerdo con la presente invención. Por el contrario, las intervenciones terapéuticas previas solo muestran un beneficio si el tratamiento comienza antes o inmediatamente después del día de la inoculación¹⁹⁻²⁴, lo que refleja una neutralización aislada del inóculo en contraposición con la inhibición de la replicación de los priones de acuerdo con la presente invención.

Es posible que la transferencia pasiva de estos anticuerpos anti-PrP tenga un efecto reducido tardío en el periodo de incubación, cuando se han desarrollado los signos clínicos o en sujetos inoculados por vía ic, lo más probable es que refleje una translocación inadecuada del anticuerpo anti-PrP a través de la barrera hematoencefálica (BHE)²⁵. El transporte hematoencefálico de los agentes de la presente invención se ha descrito anteriormente en la sección de "administración".

Además, no se encontraron pruebas de reacciones autoinmunes en los sujetos. Si se encontrara cualquiera de estos problemas, por ejemplo, en el tratamiento de seres humanos con ECJ o con otras enfermedades priónicas, con formas humanizadas de estos anticuerpos y/u otros anticuerpos monoclonales anti-PrP, se pueden adoptar estrategias inmunosupresoras sin apartarse del espíritu o del alcance de la invención.

Tabla 1: Efecto de la inmunización pasiva con AMos ICSM sobre la infectividad esplénica y la supervivencia de ratones FVB/N inoculados con tembladera de RML.

Inoculación ^a IC o IP	Tratamiento ^b con anticuerpo	Inicio del tratamiento (días pi)	Bioensayo ^d en bazo		Ratones FVB/N que sucumben a la tembladera (n/n ₀)	Tiempo medio de supervivencia (días pi)
			Mortalidad: ratones tga20 que sucumben a la tembladera (n/n ₀) ^e	Título esplénico: log DL ₅₀ de unidades infecciosas medias/ml de 10% de homogeneizado		
IC	ICSM 35	7			6/6	152 ± 7
IC	ICSM 35	CO ^c			8/8	148 ± 10
IC	ICSM 18	7			5/5	151 ± 2
IC	ICSM 18	CO			7/7	149 ± 3
IC	BRIC 126	7			5/5	147 ± 4
IC	Ninguno	-			11/11	151 ± 7
IP	ICSM 35	7	15/15	3,5(2,7-4,3) ^f	0/6 ^g	>400
IP	ICSM 35	30			0/5	>400
IP	ICSM 35	CO			6/6	193 ± 4
IP	ICSM 18	7	3/12	<1,5	0/6 ^g	>400
IP	ICSM 18	30	1/10	<1,5	0/5	>400
IP	ICSM 18	CO			5/5	193 ± 5
IP	BRIC 126	7	9/9	6,0	6/6	195 ± 7
IP	BRIC 126	30			4/4	198 ± 4
IP	Ninguno	-	13/13	6,0	15/15	197 ± 5

^a, El título infeccioso del homogeneizado agrupado de cerebro con tembladera de RML se determinó como 8,1 log DL₅₀/g de cerebro mediante el ensayo de infectividad con ratones²⁶ tga20 indicadores. Los ratones FVB/N fueron inoculados por vía intracerebral (IC) con 30 µl o por vía intraperitoneal (IP) con 100 µl de 1% de homogeneizado.

^b, Dos veces a la semana hasta 375 días pi, a continuación una vez a la semana, 2 mg por inyección.

^c, CO, el tratamiento comenzó en el inicio clínico (tal y como se describe en la sección Métodos), 129-136 días pi (ratones inoculados ic) y 168-177 días pi (ratones inoculados ip)

^d, Determinado 60 días después de la infección de ratones FVB/B inmunizados pasivamente y sin tratar.

^e, n/n₀, número de animales que sucumben a la tembladera/número de animales inoculados.

^f, Rango de log DL₅₀ de unidades infecciosas/ml de 10% de homogeneizado.

^g, Tres ratones tratados con ICSM 18 y dos con ICSM 35 (todos sin síntomas de la enfermedad) fueron sacrificados 250 días después de pi para análisis de transferencia Western e histopatológico de los tejidos.

Referencias

1. Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. & Hill, A. F. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature* **383**, 685-690 (1996).
- 5 2. Bruce, M. E. *et al.* Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501 (1997).
3. Hill, A. F. *et al.* The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**, 448-450 (1997).
4. Will, R. G. *et al.* A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925 (1996).
5. Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13363-13383 (1998).
- 10 6. Enari, M., Flechsig, E. & Weissmann, C. Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9295-9299 (2001).
7. Peretz, D. *et al.* Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**, 739-743 (2001).
8. Jackson, G. S. *et al.* Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* **283**, 1935-1937 (1999).
- 15 9. Jackson, G. S. *et al.* Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 1-13 (1999).
10. Bueler, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582 (1992).
11. Beringue, V. *et al.* Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the brain. *Brain*.
- 20 12. Beringue, V. *et al.* Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J. Virol.* **74**, 5432-5440 (2000).
13. Souan, L. *et al.* Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunisation. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2338-2346 (2001).
- 25 14. Heppner, F. L. *et al.* Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* **294**, 178-182 (2001).
15. Westaway, D & Carlson, G. A. Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *TIBS* **27**, 301-307 (2002).
- 30 16. Klein, M. A. *et al.* PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat. Med.* **4**, 429-433 (1998).
17. Montrasio, F. *et al.* Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**, 1257-1259 (2000).
18. Brown, K. L. *et al.* Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1308-1312 (1999).
- 35 19. McKenzie, D., Kaczkowski, J., Marsh, R. & Aiken, J. Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection. *J. Virol.* **68**, 7534-7536 (1994).
20. Ingrosso, L., Ladogana, A. & Pocchiari, M. Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J. Virol.* **69**, 506-508 (1995).
- 40 21. Farquhar, C., Dickinson, A. & Bruce, M. Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* **353**, 117 (1999).
22. Brown, P. Drug therapy in human and experimental transmissible spongiform encephalopathy. *Neurology* **58**, 1720-1725 (2002).
23. Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H. & Kretzschmar, H. Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* **360**, 229-230 (2002).
- 45 24. Sigurdsson, E. M. *et al.* Immunisation delays the onset of prion disease in mice. *Am. J. Pathol.* **161**, 13-17 (2002).

25. Bard, F. *et al.* Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6**, 916-919 (2000).
26. Brandner, S. *et al.* Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339-343 (1996).
- 5 27. Anstee, D. J. *et al.* New monoclonal antibodies in CD44 and CD58: their use to quantify CD44 and CD58 on normal human erythrocytes and to compare the distribution of CD44 and CD58 in human tissues. *Immunology* **74**, 197-205 (1991).
28. Avent, N. D. *et al.* Protein-sequence studies on Rh-related polypeptides suggest the presence of at least two groups of proteins which associate in the human red-cell membrane. *Biochem. J.* **256**, 1043-1046 (1988).
- 10 29. Dickinson, A. G., Meikle, V. M. & Fraser, H. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J. Comp. Pathol.* **78**, 293-299 (1968).
30. Wadsworth, J. D. *et al.* Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**, 171-180 (2001).
- 15 Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal y como se reivindica no debe limitarse erróneamente a dichas realizaciones específicas. En efecto, se entiende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en química, biología o campos relacionados, están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 – ICSM35VH

ATGGAATGGACCTGGGTCATTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGAAGGTGT
CCACTCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG
GGGCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATtCAGTAAC
TCCTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGGAAAGGTCTTGA_gTGGAT
TGGACGGATTTATCCTGAATATGGACATGCTGACTACAATGGGAAGTTCG
AAGGCAAGGCCACACTGACTGCTGACAGATCCTCCAGCACAGCCTACATG
CACCTCAGCAGCCTGACGTCTGAGGACTCTGCGGTCTACTTCTGTGCACG
AGCCCCACTACGGTACCCCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTC
TCACAGTCTCCTCA

SEC ID NO: 2 – ICSM35VK

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGGTCTCCTGTTGCTCTGTTTTCAAGG
TACCAGATGTGATATCCAGATGAC_aCAGAcTTCATCCTCCCTGTCTGCCT
CTCTGGGAGACAGAGTCTCCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTTCC
AATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAA_aACCAGATGGAACTGTTAAACTCCT
GATCCACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTtCAGTG
GCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCCACCTGGAGGAA
GAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATGCG_cTTCCCTCCGAC
5 GTTCGGTGGCGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

SEC ID NO: 3 – ICSM18VH

ATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGT
CCTCTCTGAGGTCCAGCTACAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTG
GGTCTTCAGTGA_gATATCCTGCAAGGCATCTAGAAACACATTCACTGAC
TATAACTTGGACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGACACTTGAGTGGAT
TGGAAATGTTTATCCTAACAATGGTGTTACTGGCTACAACCA_gAA_gTTCA
GGGGTAAGGCCACACTGACTGTAG_aACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATG
GAGCTCCACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCCCT
TTATTACTAC_gAT_gTCTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCT
CTGCA

SEC ID NO: 4 – ICSM181c

ATGGATTTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGT
 CATAATATCCAGAGGACAAATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAATCATGT
 CTGCATCTCCAGGGGAGAAgGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGT
 GTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAG
 ATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCA
 GTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGTATGGAG
 GCTGAAGATGCTGCCACTTATTTCTGCCACCAGTGGAGAAgTAACCCATA
 CACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCAC
 CAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGT
 GCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGT
 CAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTT
 GGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTC
 ACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGC
 CACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGTTAGTGA

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRs codificadas por la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 3 e ID SEC N° 4.
- 5 2. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de CDRs codificadas por la secuencia de nucleótidos de ID SEC N° 1 e ID SEC N° 2.
3. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso como medicamento.
4. Uso de un anticuerpo o de un fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad priónica.
- 10 5. Uso de un anticuerpo o de un fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una neuropatología asociada con una infección con priones.
6. Uso de un anticuerpo o de un fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección con priones.
- 15 7. Uso de un anticuerpo o de un fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la replicación de priones.
8. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método de tratamiento de una enfermedad priónica.
9. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método de
- 20 tratamiento de una neuropatología asociada con una infección con priones.
10. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método de tratamiento de una infección con priones.
11. Anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en un método de tratamiento de la replicación de priones.
- 25 12. Un método para inhibir la replicación de priones *in vitro* que comprende poner en contacto dicho prión con un anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
13. Un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 u 8 a 11, o un uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, o un método según la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo reacciona con PrP^{Sc}.
- 30 14. Un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o un anticuerpo o un fragmento del mismo para uso en las reivindicaciones 8 a 11, o un uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, o un método según la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo reacciona con PrP^c y con PrP^{Sc}.
15. Un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o un anticuerpo o un fragmento del mismo para uso en las reivindicaciones 8 a 11, o un uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, o un método según la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo es una IgG.
- 35

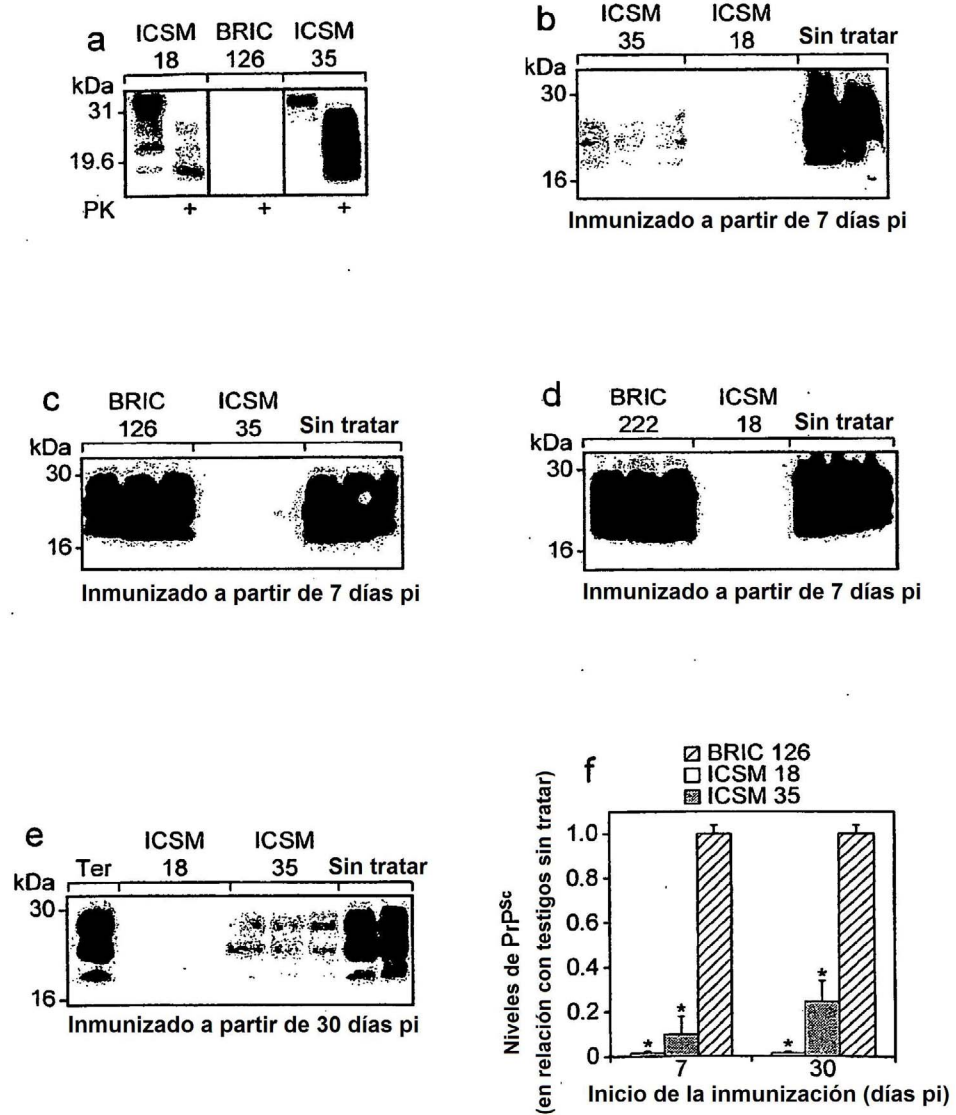


FIG. 1

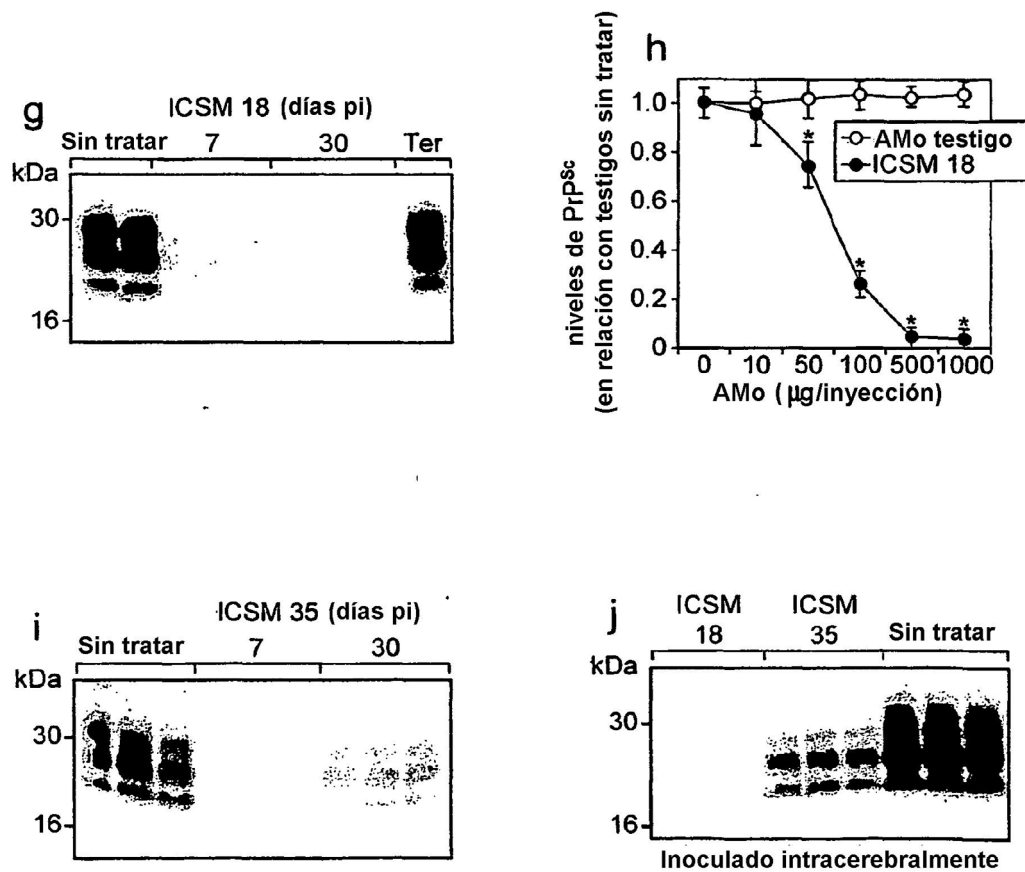


FIG. 1 CONT.

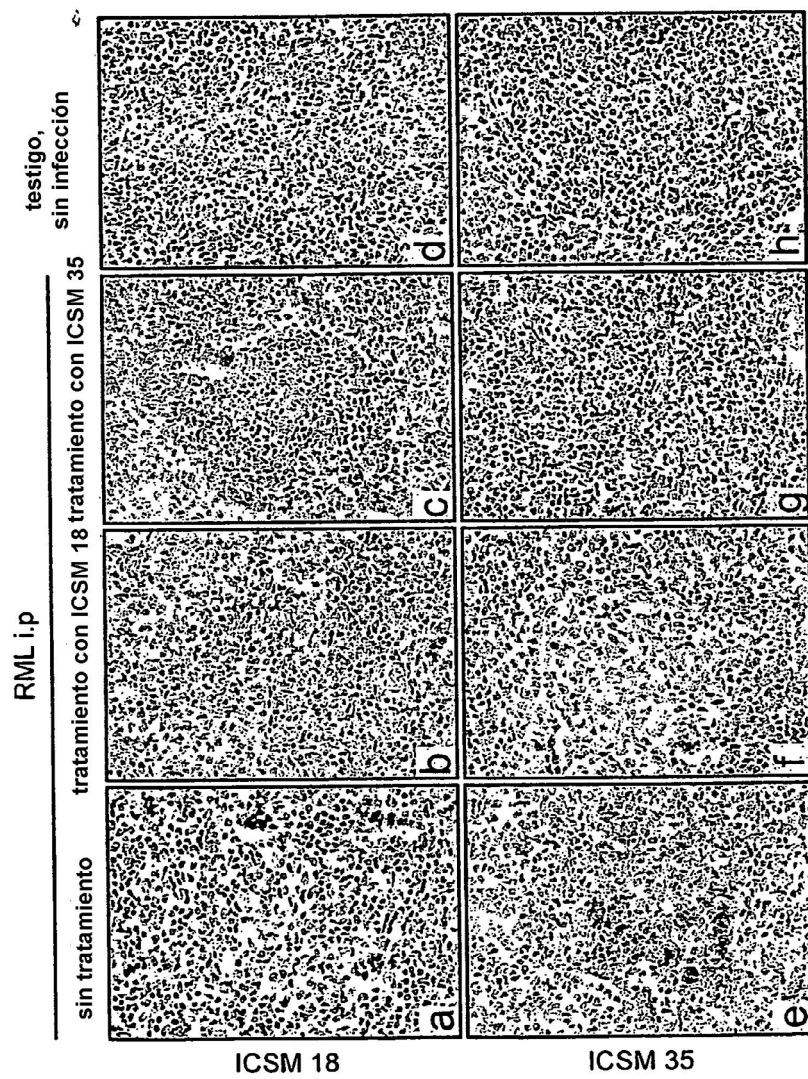


FIG. 2

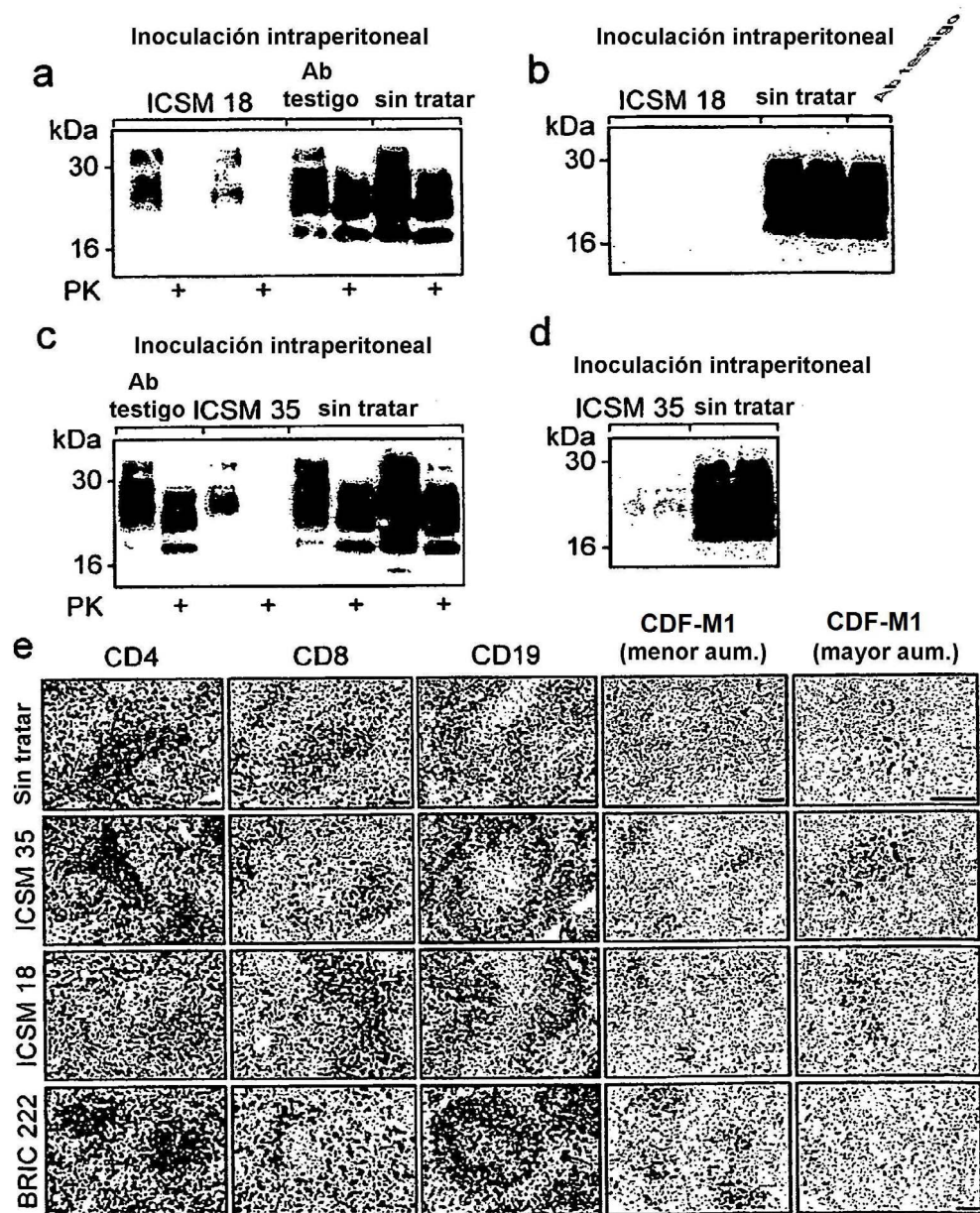


FIG. 3

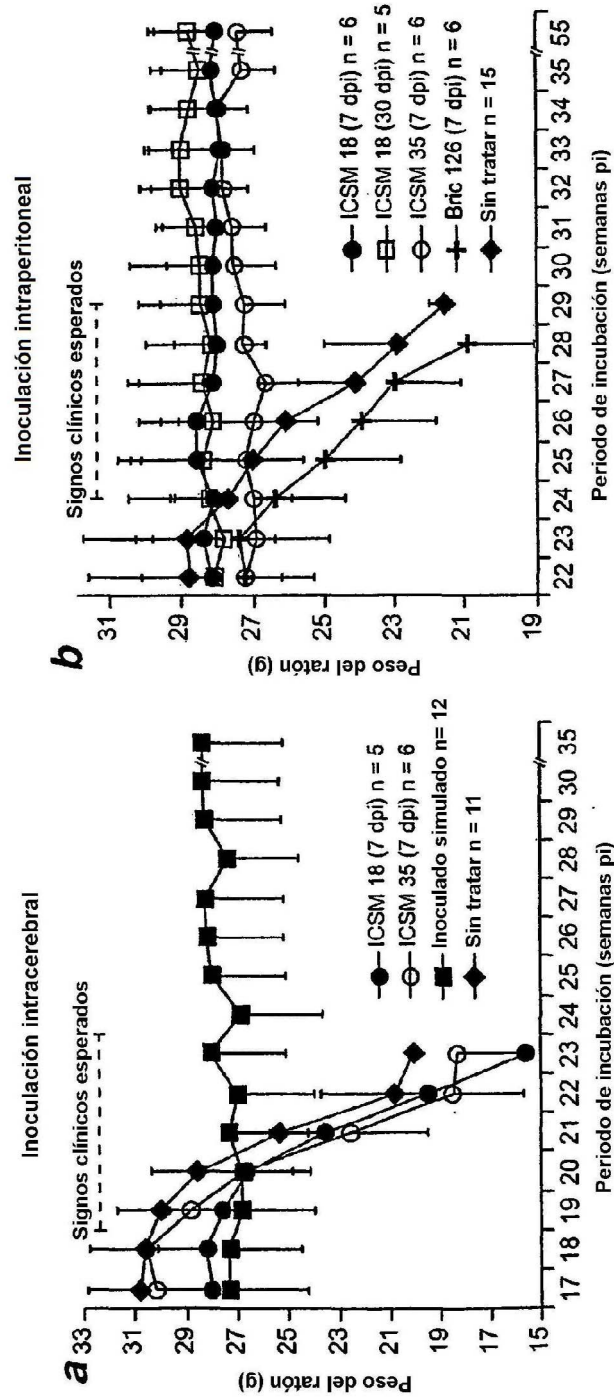


FIG. 4

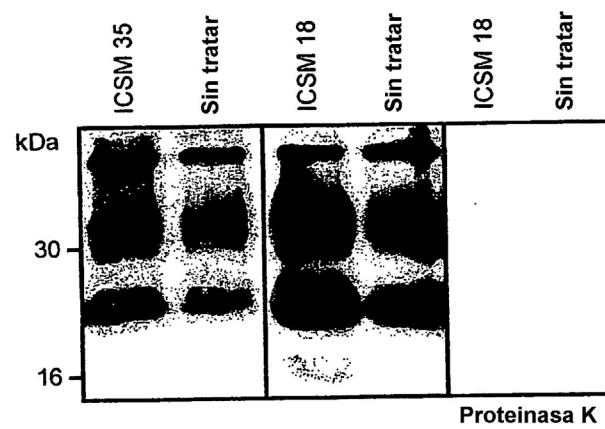


FIG. 5