(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 522 823**

(21) Número de solicitud: 201330557

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

18.04.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

18.11.2014

(56) Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070313

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (100.0%)
Centro de Innovación e Transferencia de Tecnoloxía, Edif. Emprendia Campus Sur
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES

(72) Inventor/es:

PASTRANA GONZÁLEZ, Miguel Ángel

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **Uso de partículas proteicas polimerizadas generadas a partir de proteína priónica para el tratamiento de prionopatías**

(57) Resumen:

Uso de partículas proteicas polimerizadas generadas a partir de proteína priónica para el tratamiento de prionopatías.

La presente invención se refiere al uso de partículas proteicas generadas a partir de proteína priónica recombinante (rPrP) sometida a un proceso de polimerización para el tratamiento y/o prevención de prionopatías. Tales partículas se comportarían como una cepa priónica "atenuada" con entidad propia, inofensiva, pero cuya capacidad de auto-propagación in vivo le permitiría competir por la conversión del sustrato, PrP^{C}, con una cepa tóxico-infecciosa convencional, de modo que la administración de este tratamiento inocuo consigue ralentizar la aparición de signos clínicos y la progresión normal de la enfermedad, lo que se traduce en una extensión del periodo de incubación y un incremento significativo del tiempo de supervivencia. Consecuentemente, el uso de las partículas proteicas de la presente invención constituye una estrategia profiláctica o terapéutica eficaz frente a patologías de origen priónico.

ES 2 522 823 A1

USO DE PARTÍCULAS PROTEICAS POLIMERIZADAS GENERADAS A PARTIR DE PROTEÍNA PRIÓNICA PARA EL TRATAMIENTO DE PRIONOPATÍAS

DESCRIPCIÓN

La presente invención se encuadra en el campo de la biomedicina, concretamente dentro del uso de partículas proteicas polimerizadas, generadas a partir de proteína priónica recombinante (rPrP), para la fabricación de un medicamento, y particularmente indicadas para el tratamiento y/o prevención de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) o prionopatías.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las prionopatías son un tipo de afecciones neurodegenerativas, transmisibles y de desenlace invariablemente fatal que afectan a humanos y otros mamíferos. Desde un punto de vista etiológico, el agente causal o inductor de tales patologías, el prion, ha sido descrito como una pequeña partícula infecciosa de naturaleza proteica con capacidad de auto-replicación, propagación y transmisión intra e interespecífica. Sin dejar de alertar explícitamente del riesgo de desencadenamiento de un episodio epizoonótico o epidemiológico, como el acaecido recientemente en la conocida “crisis europea de las vacas locas”, tales circunstancias afectan y trascienden al ámbito de la sanidad animal y conllevan evidentes implicaciones adicionales al de la salud pública.

A lo largo de las últimas décadas se han ido acumulando numerosos indicios que sugieren que el componente único o principal del prion es una isoforma anormal e infecciosa de la proteína priónica celular (PrP^{C}) codificada en el genoma del huésped, conocida como PrP^{Sc}, de *scrapie* (Prusiner, S. B., 1982, *Science* 216:236-44). Precisamente, el evento central del paradigma priónico parece ser la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc}. Un proceso mediante el cual esta última, facultada por su actividad autocatalítica, albergaría la capacidad de auto-propagación para mantener indefinidamente su propio crecimiento a expensas de la primera, que habrá de servirle como sustrato. En consecuencia, este patógeno, desprovisto de material genético alguno (ácidos nucleicos), se convierte en una entidad competente para transmitir información biológica a través de un mecanismo molecular del que aún se desconocen

los detalles. Aunque su estructura permanece igualmente por determinar, conformacionalmente la PrP^{Sc} es una molécula rica en hoja β e incorrectamente plegada que exhibe una profusa propensión a la agregación, lo que le confiere propiedades bio-físicas/químicas, estructurales y neuropatológicas características y diferenciales respecto de la PrP^{C}. Entre las primeras destaca el aumento de la resistencia parcial a determinados agentes físicos y químicos, incluyendo una menor susceptibilidad a diferentes proteasas, como la proteinasa K (PK), o el incremento de la insolubilidad incluso en presencia de detergentes.

La PrP^{C} constituye la isoforma "sana" de la proteína, una sialoglicoproteína soluble y monomérica, que se une a la membrana plasmática por su cara extracelular a través de un dominio de anclaje a glicosil fosfatidil inositol (GPI). En este caso, la posibilidad de aplicar técnicas de alta resolución ha permitido elucidar su estructura, aunque a día de hoy su función fisiológica continúa siendo un enigma. Tal y como refleja el grado de identidad, se trata de una secuencia altamente conservada en mamíferos, que se expresa de forma endógena, ubicua y constitutiva en la práctica totalidad de los tejidos del organismo, aunque preferentemente en el tejido nervioso (neuronal).

Por contra, la conformación aberrante PrP^{Sc}, siempre involucrada en este tipo de desórdenes de naturaleza priónica, y con independencia de su origen esporádico/disperso, hereditario/familiar/genético (gen *Prnp*) o infeccioso/adquirido (casos iatrogénicos), se acumula principalmente en el cerebro y resulta esencialmente una molécula neurotóxica que adquiere las mencionadas capacidades de auto-replicación, propagación y transmisión para invadir otras células del organismo o infectar otros individuos; propiedades que se sitúan entre las más relevantes, transcendentes y definitorias de cuantas se asocian a este agente poco convencional. No en vano, *a priori* todas las cepas priónicas – variantes que se asocian con diferentes alternativas conformacionales de la PrP^{Sc} (Tanaka, M., *et al.*, 2004, *Nature* 428:323-8) – descritas hasta la fecha, parecen compartir *sensu lato* o *stricto* tales atributos.

Actualmente, el tratamiento de las enfermedades priónicas sigue siendo un gran desafío para la ciencia médica. Una revisión bibliográfica exhaustiva de las estrategias terapéuticas ensayadas hasta el momento, pone de manifiesto la ausencia de métodos

de tratamiento o prevención eficaces frente a las infecciones animales o humanas provocadas por priones; así como los obstáculos o posibilidades para combatir dichos trastornos (Trevitt, C.R. & Collinge, J., 2006, *Brain* 129:2241-65). No obstante, se han identificado un buen número de drogas "antiprionicas", la mayoría de las cuales tienen como diana la PrP^{C} o la PrP^{Sc}; o, alternativamente, van dirigidas contra receptores o co-receptores de la PrP. Entre los tratamientos experimentales desarrollados hasta la fecha se incluye el uso de anfotericina B, quelantes de cobre, colorantes con afinidad por amiloides como el rojo congo, dimetil sulfóxido (DMSO), esteroides, estatinas, polianiones sulfatados, tri- y tetra-ciclinas, antraciclinas, tetrapirroles, péptidos "*β-sheet breakers*", quinacrina (mepacrina), suramina, curcumina, porfirinas, poliaminas, antivirales, ARN aptámeros, ARN de interferencia, inhibidores de p53 o de proteína quinasa, etc. Algunos de estos compuestos consiguen prolongar el periodo de incubación (PI) de la enfermedad en animales infectados, aunque a menudo presentan importantes limitaciones derivadas de su toxicidad, farmacocinética, etc.; y en cualquier caso, como se ha indicado, sin que ninguna de ellas represente realmente una cura eficaz frente a este tipo de patologías.

Característicamente, las infecciones priónicas no desencadenan una respuesta inflamatoria e inmune clásica. Sin embargo, el indispensable transporte de priones desde la periferia al sistema nervioso central (SNC), donde ejercen principalmente su acción patogénica, parece ser un requisito altamente dependiente del sistema linforeticular. En consecuencia, la activación del sistema inmune (SI) podría, paradójicamente, favorecer, más que dificultar, el acceso y propagación de los priones a través del sistema nervioso (SN). A pesar de ello, se han ensayado aproximaciones terapéuticas basadas en la estimulación de la respuesta inmune contra las prionopatías. Así, la vacunación de ratones hembra de la cepa CD-1 con 2-3 meses de edad mediante la administración a intervalos variables - 1-2 veces al mes - de sucesivas dosis de rPrP (fragmento 23-230) de ratón sin procesar (50µg recPrP/100µl), a través de rutas de inoculación parenteral (subcutánea) y usando activación policlonal convencional y adyuvantes pro-inflamatorios (Freund's), conlleva un retraso en la aparición de los signos clínicos de la enfermedad inducida intraperitonealmente (ip) con homogenado de cerebro, 10 o 1000 veces diluido, de la cepa de *scrapie* adaptada a ratón 139A (Sigurdsson, E. M., *et al*., 2002, *Am J Pathol* 161:13-7). Sin embargo, tanto la aproximación de rescate como la preventiva

experimentan un incremento modesto del PI de aproximadamente dos semanas en el mejor de los casos. Curiosa e inesperadamente, los resultados de la profilaxis contravienen la lógica exhibida en el grupo rescatado, ya que es precisamente frente al inóculo infeccioso más concentrado cuando se observa una mayor eficacia del tratamiento con dicho antígeno. Además, las prácticas de inmunización activa a menudo se ven obstaculizadas por su toxicidad potencial y la auto-tolerancia a PrP. Tampoco se puede descartar que la falta de homogeneidad, debida, por ejemplo, a la diferencia de edad entre los individuos que componen un determinado grupo, pudiera constituir en sí misma una fuente de variabilidad.

En base a la exigua prolongación del PI exhibida, el éxito preventivo alcanzado en otro estudio de inmunización activa, con péptidos sintéticos derivados de la PrP, puede calificarse igualmente de modesto. En esta ocasión, la profilaxis aplicada a ratones NMRI implica la administración de 6 inyecciones ip en total, a intervalos de 3-4 semanas, con 50µg de un péptido unido covalentemente a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), previamente mezclado en PBS (Tampón Fosfato Salino) y un volumen equivalente de adyuvante acuoso Montanide IMS-1313. Este antígeno KLH-conjugado es el correspondiente a los aminoácidos 105–125 codificados por el alelo murino *PRNP-a* (nº de acceso en GenBank M18070). Dos semanas después de la última inmunización, los animales se someterían a exposición oral con 50µl de un homogenado de cerebro al 10% preparado a partir de ratones infectados con la cepa 139A en estado terminal (Schwarz, A., *et al*., 2003, *Neurosci Lett* 350:187-9). En aparente contradicción con lo expuesto en el ensayo anterior, la inmunización con 150µg de rPrP murina purificada (fragmento 90-230) descrita en este mismo artículo resultó completamente ineficaz; algo que sugiere que la prevalencia observada en uno y otro caso podría ser quizás achacable a la variabilidad interindividual.

En posteriores intentos por evitar las desventajas de tales aproximaciones y tratar de mejorar los resultados previos, Sirgurdsson *et al*. desarrollaron ensayos basados en la vacunación oral con una cepa atenuada de *Salmonella* (WO2005019412 y Goñi, F., *et al*., 2005, *Neuroscience* 133:413-21). Este tipo de soporte bacteriano ha sido ampliamente utilizado, tanto en ratones como en seres humanos, para presentar antígenos extraños y provocar una respuesta inmune de la mucosa. Para verificar la hipótesis de que esta aproximación pudiera jugar un papel importante al desencadenar

una respuesta humoral de la mucosa gastrointestinal que active la acción neutralizante de la inmunoglobulina A (IgA), se llevaron a cabo experimentos con *S. typhimurium aroC LVR01*, cepa previamente transformada con un vector plasmídico que porta una o dos copias de la secuencia que codifica para la PrP de ratón, usando el mismo modelo animal e inóculo infeccioso (cepa 139A) de experimentos precedentes. Según detallan sus autores, la inmunización oral, repetida 7 días y 4 semanas después de la vacuna original, de hembras CD-1 con 6 semanas de edad con dicha cepa bacteriana mediante intubación intragástrica, evita los problemas de tolerancia a PrP sin que se adviertan indicios de toxicidad, y consigue prevenir, o retrasar significativamente, los efectos de una ulterior exposición oral, transcurridas siete semanas, con 100µl de una dilución 1:5 del inóculo infeccioso a través de sonda gástrica. Para ello fue necesario el uso de bicarbonato sódico ($NaHCO_3$), pH 8,3, e hidróxido de aluminio (4:1; v/v) que contribuye a neutralizar las secreciones gástricas y aumentar supervivencia de LVR01 en el ambiente bajo en pH del estómago, y proporciona capacidad adyuvante en la mucosa intestinal; a la par que se optimizó el procedimiento de inoculación empleado para reducir vómitos, etc. Los resultados revelan que aproximadamente 1/3 de los animales tratados (30%) sobreviven sin signos clínicos de infección tras 350-500 días post-inoculación (dpi), mientras que todos los animales control adolecen de signos clínicos de infección priónica por encima de los 300 dpi. Resalta, por tanto, el hecho de que el 70% de los ejemplares tratados sucumban igualmente a la enfermedad antes de los 300 dpi. Nuevamente, y al margen de que este análisis de los resultados carece o no expresa el grado de significación estadística con respecto a la media, la aplicabilidad de este método queda limitada a la esfera de lo meramente preventivo.

En términos generales, la transmisión oral es una vía de contagio relativamente ineficaz y de escasa incidencia en el conjunto de las EETs; una disminución de la "penetrancia" que a menudo se traduce en una mayor inestabilidad del PI, no siendo tampoco inusual que afecte a la proporción de animales que sucumben a la infección ("*attack-rate*"). En virtud de esta premisa, un análisis más crítico y profundo de los datos aportados sugiere que el método de inoculación empleado en el ensayo previamente descrito, gráfico de la transmisión oral a través de la ingesta de alimentos contaminados, podría estar introduciendo una variabilidad acorde con el grado de reproducibilidad y dispersión observado. Pero quizás, la mayor restricción práctica de esta aproximación provenga del propio diseño experimental, por cuanto el modelo

propuesto no se ajusta o representa estrictamente un verdadero mecanismo de acción frente a la patología priónica *per se*, sino contra el proceso de invasión periférico del agente infeccioso, por lo que, en última estancia ni evita, ni previene, ni resulta representativo de las formas más frecuentes, eficaces, invasivas o "virulentas" de transmisión de la enfermedad.

Por su parte, también se han llevado a cabo varios intentos por frenar o paliar los efectos de las afecciones priónicas en respuesta a la inmunización pasiva; tentativas basadas fundamentalmente en la administración seriada de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-PrP. Una vez más, se observa un ejemplo de ello en un trabajo publicado por Sigurdsson *et al*., donde varios grupos de ratones CD-1 hembra de 2 meses de edad se someten semanalmente hasta su sacrificio a una dosis ip (50µg/500µl PBS) con diversos mAb anti-PrP; un tratamiento profiláctico post-exposición al agente infeccioso vía ip con una dilución 1/10 o 1/1000 de un homogenado de cerebro de la cepa 139A. El leve efecto preventivo de la vacuna exhibido frente a la dilución 1/10 del inóculo infeccioso representa aproximadamente un 10% de prolongación del PI; mientras que a la dilución 1/1000, el tratamiento con uno de los anticuerpos, 8B4, parece prevenir de la enfermedad al 10% de los animales (Sigurdsson, E. M., *et al*., 2003, *Neurosci Lett* 336:185-7).

Simultáneamente, otro grupo de investigación describe cómo la aplicación de una dosis ip continua de mAb anti-PrP (1-2 veces por semana; 2mg por inyección) en ratones FVB/N previamente inoculados con un extracto preparado a partir de cerebros de ratones infectados de *scrapie* en fase terminal con la cepa priónica RML (*Rocky Mountain Laboratory*), consiguió reducir los niveles periféricos de PrP^{Sc}, retardando el proceso de neuroinvasión y el desarrollo de la enfermedad. En este caso, la notable extensión del PI exhibida en los animales infectados por vía ip, contrasta con la total ineficacia terapéutica del tratamiento observada en los individuos infectados intracerebralmente (ic). Muy probablemente debido a que la barrera hemato-encefálica supone un obstáculo infranqueable para el acceso de los anticuerpos al cerebro; un órgano no sólo directamente involucrado y de capital relevancia en este tipo de desórdenes, sino precisamente una ruta, ic, cuya praxis experimental constituye la vía de inoculación que más se asemeja y mejor reproduce, cualitativa y cuantitativamente, las condiciones en las que habitualmente se desarrollan, operan y propagan las

principales formas de transmisión de la enfermedad, las EETs genéticas o espontáneas. Por tanto, en el mejor de los casos, el espectro de aplicabilidad de esta estrategia queda reducido a las formas infecciosas aunque periféricas de la enfermedad; tales como la transmisión oral o determinadas formas iatrogénicas (transfusiones sanguíneas, etc), entre las que probablemente podría situarse la variante de Creutzfeldt–Jakob (vCJD); pero en definitiva, variantes que hoy en día se consideran prácticamente erradicadas o de escasa incidencia en la naturaleza. Además, no se ha descartado la posibilidad de que este procedimiento pudiera desencadenar efectos autoinmunes indeseados en humanos (White, A.R., *et al*, 2003. *Nature* 422:80-3). De hecho, la inmunización activa ensayada en humanos frente a la enfermedad de Alzheimer exhibió una alta toxicidad (Münch, G. and Robinson S.R., 2002, *J Neural Transm* 109:1081-7).

En suma, la homogeneidad de los individuos de un determinado grupo, la necesidad de mejorar y producir anticuerpos monoclonales específicos anti-PrP, los problemas de toxicidad o/y farmacocinéticos, las restricciones de aplicabilidad derivadas del propio diseño experimental - a menudo exclusivamente aplicables a infecciones periféricas en modo profiláctico - o el exigente requerimiento especialmente en referencia a la frecuencia de dosificación, representan algunos de los principales obstáculos del conjunto de factores que comúnmente afecta al rendimiento, la solvencia, el buen funcionamiento o la susceptibilidad a los tratamientos terapéuticos fundamentados en la activación de una respuesta de carácter inmunológico en particular, pero perfectamente extensibles al resto de aproximaciones sugeridas hasta la fecha. Un cúmulo de limitaciones, desventajas y/o efectos adversos derivados, que condiciona considerablemente su viabilidad, ámbito de aplicabilidad o eficacia potencial; lo que dificulta extraordinariamente su eventual extrapolación al ámbito clínico, justifica la ausencia actual de tratamientos aptos y redunda en la necesidad de desarrollar estrategias más sólidas y eficaces para hacer frente a las prionopatías.

Por otro lado, conviene señalar que toda aproximación anterior fundamentada en el uso de rPrP previamente sometida a un proceso de polimerización o amplificación, ha tenido invariablemente una finalidad radicalmente distinta, o incluso opuesta, a la del uso terapéutico. En efecto, al margen de los estudios involucrados en un análisis más directo de las características y propiedades del material generado con fines

estructurales o de cualquier otro tipo, la principal finalidad de dicho material no ha sido otra que la generación *in vitro* de priones recombinantes. Los arduos e intensos esfuerzos dedicados en los últimos tiempos a superar algunos de los principales escollos y dificultades técnicas para llevar a cabo con éxito tal empresa, han permitido finalmente producir priones "sintéticos" *in vitro*. Fundamentalmente, esta síntesis de nuevas cepas transmisibles e infecciosas a partir de rPrP se ha basado en dos tipos de estrategia: (i) utilizando diferentes protocolos de fibrilación (Makarava, N., *et al*., 2010, *Acta Neuropathol*. 119:177-87) o (ii) mediante PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*) en presencia de determinados "cofactores" (Wang, F., *et al*., 2010, *Science* 327:1132-5).

Por tanto, se hace necesario disponer de métodos de tratamiento y prevención seguros para combatir eficazmente las EETs o prionopatías.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención propone una nueva estrategia terapéutica basada en el uso de partículas proteicas generadas a partir de proteína priónica recombinante (rPrP) sometidas a un proceso de polimerización para el tratamiento y/o prevención de Encefalopatias Espongiformes Transmisibles (EETs) o prionopatías.

En ausencia de una terapia eficaz hasta la fecha, la estrategia aquí propuesta se fundamenta en la generación de unas partículas de naturaleza proteica con entidad propia, a las que se ha designado "protocepa". Estas se corresponderían con una "cepa priónica atenuada" inocua (no tóxica) para el organismo, pero "activa" gracias a su capacidad auto-propagativa, basada en la auto-replicación y transmisibilidad. La co-existencia *in vivo* de la protocepa inofensiva con una cepa tóxico-infecciosa "clásica" induciría entre ambas una relación de competencia por la conversión del sustrato, la PrP^{C}. La interferencia causada a través de este mecanismo de "contrafuego" afectaría a la disponibilidad de sustrato, ralentizando el proceso de replicación del agente infeccioso y, consecuentemente, la progresión normal de la enfermedad. Por consiguiente, el uso de las partículas proteicas de la presente invención está indicado como tratamiento y/o prevención eficaz frente a un amplio espectro de patologías de origen priónico.

La síntesis *in vitro* y *de novo* de esta nueva entidad con características y propiedades de cepa priónica a partir de rPrP, o partícula proteica de la invención, requiere una fase previa destinada a la "activación" de la molécula, consolidada durante el proceso de polimerización descrito en la presente invención. Un estado probablemente adquirido como consecuencia de un cambio conformacional en su estructura, que a su vez conlleva una alteración en el estado de agregación. En definitiva, una conformación susceptible de alcanzar una cierta capacidad de auto-propagación que la faculte como un "agente antiprionico", específica y directamente diseñado para actuar contra el agente infeccioso en alguna de las fases clave de su mecanismo de acción operante, y de este modo obstaculizar, retardar, condicionar o impedir, en mayor o menor medida, el proceso de replicación del auténtico prion.

Cabe destacar que a pesar de que ciertas aproximaciones descritas en el estado de la técnica han abordado el tratamiento o prevención de prionopatías en base al uso de rPrP, en ningún caso contemplan una fase previa de "activación" de la molécula; sino meramente su aplicación directa y continua en estado "natural" de monómero "no-activado", para su uso como antígeno desencadenante de una respuesta inmunitaria. En este sentido, se trata de estrategias preventivas no necesaria, directa y específicamente dirigidas contra el mecanismo íntimo de replicación del prión, sino más bien contra el proceso de invasión, y en cualquier caso, susceptibles de afectar también a la isoforma sana de PrP, pudiendo generar problemas de autoinmunidad.

Por su parte, tal y como se ha destacado anteriormente, los diferentes protocolos de polimerización aplicados a rPrP han tenido un objetivo distinto al propuesto en la presente invención, incluso radicalmente opuesto al fin terapéutico, como la producción *in vitro* de priones "sintéticos" a partir de material recombinante, con el propósito de ahondar en los mecanismos de infección y transmisibilidad de estos agentes.

Como se verá posteriormente en los ejemplos, las partículas proteicas de la presente invención generadas *de novo* mediante síntesis *in vitro* partir de rPrP, fueron sometidas a un proceso de polimerización previo a la constatación y evaluación *in vivo* de su eficacia terapéutica cuando se aplican al tratamiento de una prionopatía. A tal fin, el diseño experimental incluye una serie de bioensayos realizados sobre un

modelo animal ampliamente utilizado en la investigación con priones, el hámster sirio dorado (SHa). Con el propósito de valorar en paralelo el mayor número de aspectos y parámetros relacionados directamente con la estrategia, como la capacidad de respuesta, rendimiento, eficacia, dinámica o posología del tratamiento, el estudio incluye principalmente diferentes combinaciones de tres variables (Tabla 2): tiempo (modo profiláctico y terapéutico) y vía de administración del tratamiento (ic, ip), y ruta de inoculación del agente infeccioso (ic, ip). Los resultados obtenidos muestran una alteración del curso normal de la enfermedad en los animales infectados y sometidos a tratamiento, observándose incrementos estadísticamente significativos en los tiempos de supervivencia (TS), que llegan a superar incluso el 50% respecto del grupo equivalente de animales infectados sin tratar (control positivo). Paralelamente, el seguimiento continuo y riguroso de los grupos de animales no infectados pero igualmente expuestos al tratamiento (control negativo), no evidenció indicio alguno de toxicidad, de lo que se deduce un alto grado de inocuidad de las partículas proteicas de la invención. Estos resultados revelan la eficacia terapéutica de la estrategia propuesta por la presente invención.

Cabe nuevamente destacar que los resultados de eficacia aquí representados se derivan de la administración de una única dosis por ejemplar del tratamiento con las partículas de la presente invención. Efectivamente, aunque fácilmente ampliable en cantidad y frecuencia, la dosis ensayada ha resultado ser suficiente para retrasar con éxito la aparición de signos clínicos y el avance o evolución de la enfermedad, y en consecuencia, prolongar ampliamente el periodo de incubación (PI) y el TS del individuo. Esto supone, por un lado, una considerable ventaja frente a estrategias precedentes. Por otro, resulta coherente con la puesta en marcha de un mecanismo de acción basado en el auto-ensamblaje, la propagación (auto-replicación y transmisión) y la competencia por la conversión del sustrato, mediante el cual las partículas de la invención inducirían una respuesta automática capaz de perpetuarse indefinidamente a través de una amplificación exponencial en cadena, proporcionando un mecanismo de autodefensa adquirido que protege al organismo frente a una eventual infección priónica. En este aspecto, un *modus operandi* que recuerda conceptualmente al de activación del SI, donde una simple agresión externa o exposición del sujeto al antígeno - por ejemplo, mediante la vacuna con un virus atenuado - provoca la señal que desencadena una reacción adaptativa o adquirida

compleja, integrada, especifica, automática y en cascada que acaba por estimular el reclutamiento indefinido de anticuerpos.

Por ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una partícula proteica polimerizada cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78% de identidad con SEQ ID NO: 1 y cuyo peso molecular es igual o superior a 30.000 Da, para la fabricación de un medicamento. O alternativamente, a una una partícula proteica polimerizada cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78% de identidad con SEQ ID NO: 1 y cuyo peso molecular es igual o superior a 30.000 Da para su uso como medicamento. De ahora en adelante se hará referencia a la "partícula proteica polimerizada cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78% de identidad con SEQ ID NO: 1 y cuyo peso molecular es igual o superior a 30.000 Da" como "partícula proteica de la invención".

El término "% de identidad" con respecto a un polipéptido o proteína se refiere al porcentaje de aminoácidos de la secuencia en cuestión que son idénticos a los aminoácidos de la secuencia con la que se compara, después de alinear dichas secuencias y de introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad sin tener en cuenta las sustituciones conservadoras. El alineamiento puede llevarse a cabo por un experto en la materia usando herramientas públicas, como por ejemplo, los programas BLAST, BLASTP, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un experto en la materia puede determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para alcanzar el máximo alineamiento de las secuencias que se comparan. En la presente invención, el % de identidad se calcula, preferiblemente, mediante la herramienta BLASTP.

SEQ ID NO: 1 es la secuencia aminoacídica de la isoforma sana y madura de la proteína priónica humana (HuPrP), cuyo peso molecular es 22.747Da. Se entiende por "isoforma madura de la PrP" aquella que resulta del procesamiento de la proteína tras la eliminación del péptido señal inicial, que dirige la proteína hacia el retículo endoplasmático, región 1-22, 1-24 o 1-28 según la especie (*spp*.) considerada, y del propéptido o secuencia C-terminal hidrofóbica que sirve de anclaje al grupo GPI, regiones 231-253, 231-254, 232-254, 234-256, 235-257 o 242-264 dependiendo de la

spp. (Tabla 1). El precursor de la PrP humana o PrP inmadura es aquella de nº de acceso en UniProtKB/SwissProt P04156.

Otros organismos distintos a humano que también son susceptibles de ser afectados por prionopatías, son por ejemplo, aunque sin limitarnos, hámster, ratón, vaca, oveja, cabra, ciervo, reno/caribú, alce, rata o visón. Las secuencias aminoacídicas de la PrP madura homólogas o equivalentes de estos organismos presentan al menos un 78% de identidad con la SEQ ID NO: 1 de humano, como se muestra en la tabla 1.

Organismo (*Spp.*)	**Secuencia de la PrP madura**	**Identidad con la SEQ ID NO: 1 (%)**	**PM de la PrP madura (Da)**	**Nº acceso de PrP inmadura (UniProtKB)**	**Posición del péptido señal inicial y propéptido en la PrP inmadura**
Homo sapiens	SEQ ID NO: 1	100%	22747.0	P04156	1-22 231-253
Mesocricetus auratus	SEQ ID NO: 2	93%	22973.2	P04273	1-22 232-254
Mus musculus	SEQ ID NO: 3	92%	23019.3	P04925	1-22 231-254
Bos taurus	SEQ ID NO: 4	90%	23469.7	P10279	1-24 242-264
Ovis spp.	SEQ ID NO: 5	91%	22743.0	P23907	1-24 234-256
Capra hircus	SEQ ID NO: 6	91%	22743.0	P52113	1-24 234-256
Cervus nippon	SEQ ID NO: 7	91%	22789.1	Q6B507	1-24 234-256
Cervus elaphus nelsoni	SEQ ID NO: 8	90%	22790.0	P67986	1-24 234-256
Rangifer tarandus	SEQ ID NO: 9	91%	22789.1	Q5UAF3	1-24 234-256
Alces alces	SEQ ID NO: 10	90%	22789.0	H9NAW6	1-24 234-256
Ratus norvegicus	SEQ ID NO: 11	92%	22254.3	P13852	1-28 232-254
Mustela vison	SEQ ID NO: 12	78%	22689.9	P40244	1-24 235-257

Tabla 1. Características de las secuencias de la PrP madura e inmadura de distintas especies de mamíferos.

Por tanto, la tabla 1 muestra las secuencias de la PrP madura de distintos organismos, aunque sin limitarnos a ellos, que también se incluyen dentro del alcance de la presente invención. De hecho, todos los indicios y evidencias acumulados hasta la fecha apuntan a que un mecanismo de acción común subyace a todas las EETs, lo que sumado a los fundamentos de la presente estrategia, el alto grado de virulencia de la cepa utilizada en los ejemplos posteriores (263K), y los propios resultados

experimentales obtenidos de tales ensayos realizados en roedores, resulta plausiblemente de gran relevancia para su extrapolación o/y aplicación al resto de prionopatías animales y humanas.

En una realización preferida, la secuencia aminoacídica de la partícula proteica de la invención tiene al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 91%, más preferiblemente al menos un 92%, más preferiblemente al menos un 93%, más preferiblemente al menos un 95%, aún más preferiblemente al menos un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida, la secuencia aminoacídica de la partícula proteica de la invención es la SEQ ID NO: 2, secuencia aminoacídica de la isoforma sana y madura de la proteína priónica de *Mesocricetus auratus*, o hámster sirio dorado, que presenta un 93% de identidad con la SEQ ID NO: 1. En otra realización aún más preferida, la secuencia aminoacídica de la partícula proteica de la invención es la SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, la secuencia aminoacídica de la partícula proteica de la invención consiste en la SEQ ID NO: 13, la cual es el fragmento comprendido entre los aminoácidos 90 y 231 (PrP27-30), ambos inclusive, de la PrP inmadura de humano de número de acceso en UniProtKB P04156. Esta SEQ ID NO: 13 presenta un porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 1 del 100% con respecto a una cobertura del 70% de la SEQ ID NO: 1.

El término “partícula proteica polimerizada” se refiere a una proteína que se encuentra en estado polimerizado; entendiendo por “polimerización” el proceso mediante el cual monómeros o subunidades se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de mayor peso molecular, que incluye estados de agregación con distinto grado de ordenación, tanto de conformaciones bien estructuradas (fibrilares o amiloides) como de otras más indeterminadas, amorfas o estocásticas. En la presente invención, se entiende por “monómero o subunidad” a una proteína cuya secuencia aminoacídica tiene al menos un 78%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 91%, más preferiblemente al menos un 92%, más preferiblemente al menos un 93%, más preferiblemente al menos un 95%, aún más

preferiblemente al menos un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. En una realización aún más preferida, el monómero es la proteína cuya secuencia aminoacídica es la SEQ ID NO: 1. En otra realización aún más preferida, el monómero es la proteína cuya secuencia aminoacídica es la SEQ ID NO: 2. En otra realización aún más preferida, el monómero es la proteína cuya secuencia aminoacídica es la SEQ ID NO: 13. Preferiblemente, el proceso de polimerización tiene como finalidad la activación del monómero, induciendo un cambio conformacional en su estructura que faculte su capacidad auto-propagativa e induce en paralelo un cambio en el estado de agregación. Como sucede con la PrP^{Sc}, resulta muy probable que el carácter insoluble, heterogéneo y polimérico de las partículas proteicas de la invención no facilite su cristalización y, por tanto, dificulte la determinación de su (ultra)estructura que permita constatar un cambio conformacional en la estructura del monómero inicial mediante el uso de técnicas de alta resolución como la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) o cristalografía de rayos-X. Sin embargo, *a priori* un experto en la materia podría verificar objetivamente dicho cambio conformacional en base a ciertas propiedades o características - estructurales o arquitecturales, morfológicas, agregacionales, etc. - de las partículas polimerizadas recién formadas, evidenciadas directa o indirectamente a través de la aplicación de diferentes estrategias analíticas, tales como: i) tinción con agentes específicos de estructura amiloide como hematoxilina-eosina, rojo Congo o el fluoróforo tioflavina T (ThT) y posterior análisis cualitativo por microscopia óptica, o cuantitativo, espectrofotométrico o espectrofluorométrico, respectivamente; ii) mediante diferentes variantes de la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), por ejemplo, previa tinción negativa con acetato de uranilo, citrato de plomo o molibdato de amonio, o previa ultra-congelación de la muestra por criogenización (crio-EM); iii) cuantificación de la variación en la composición en estructura secundaria de la proteína - proporción relativa en el contenido de α-hélice y hoja-β - mediante espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR); iv) caracterización del grado de solubilidad en base al fraccionamiento por sedimentación, (ultra)centrifugación, y subsiguiente análisis de fracciones derivadas mediante inmunodetección (*Western blot*, WB) o EM; v) estudio de la susceptibilidad o resistencia a peptidasas o proteasas (PK, tripsina, quimotripsina, termolisina, pepsina, etc.) y posterior análisis por WB; vi) determinación del patrón proteolítico mediante proteólisis parcial o limitada con peptidasas y posterior análisis de los fragmentos generados por inmunodetección (WB) o espectrometría de

masas (MALDI-TOF, LC-MS/MS como nanoLC-ESI-Q-q-TOF, etc.); vii) discriminación de isoformas con anticuerpos monoclonales específicos anti-PrP (3F4, 6H4, W226, R1, R2, R20, 6D11, 12B2, 2A11, Sha31, etc.), basada en el mapeo epitópico o el grado de exposición o accesibilidad al epítopo en función del estado de desnaturalización de la proteína, o mediante el uso de anticuerpos amiloidogénicos, antígeno-genéricos que reconocen específicamente epítopos conformacionales, como anti-oligómeros A11 o anti-fibras WO1 o 2; viii) eventualmente mediante el uso de otras técnicas de análisis estructural indirectas de baja resolución como: patrón de difracción de rayos-X de la partícula/fibra, entrecruzamiento químico (BS^3) o marcaje superficial de la molécula con, por ejemplo, tetranitrometano (TNM) o anhídrido acético (Ac_2O), intercambio de hidrogeno/deuterio (H/D), cristalografía electrónica (cristales bidimensionales), etc.

En otra realización preferida, la partícula proteica de la invención posee un grado de polimerización de oligómero. El término “oligómero” se refiere a un complejo proteico compuesto por dos o más monómeros (multímero), preferiblemente compuesto por entre 2 y 40 monómeros, más preferiblemente de entre 2 y 25 monómeros. En otra realización preferida, la partícula proteica de la invención posee un grado de polimerización superior al de oligómero. Las estructuras oligoméricas son las precursoras de las protofibras. Por tanto, ejemplos de “grado de polimerización superior al de oligómero” son, aunque sin limitarnos, protofibra y fibra. Se entiende por “protofibra” al polímero en un estadio intermedio entre oligómero y fibra. Se entiende por fibra un grado de polimerización superior al de protofibra.

Así, la partícula proteica de la invención, al encontrarse en estado polimerizado, presenta un peso molecular igual o superior a 30.000 Da, que es un peso molecular superior al del monómero de PrP maduro de cualquiera de las especies contempladas en la tabla 1. En otra realización preferida, cuando la secuencia aminoacídica de la partícula proteica de la invención es la SEQ ID NO: 2, el peso molecular de dicha partícula está, preferiblemente, comprendido entre 30.000 y 918.928 Da, donde 918.928 Da es el PM del oligómero correspondiente a 40 monómeros de SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, el peso molecular de dicha partícula está comprendido entre 30.000 y 574.330 Da, donde 574.330 Da es el PM del oligómero correspondiente a 25 monómeros de SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, cuando la secuencia

aminoacídica de la partícula proteica de la invención es la SEQ ID NO: 1, el peso molecular de dicha partícula está, preferiblemente, comprendido entre 30.000 y 909.880 Da, donde 909.880 Da es el PM del oligómero correspondiente a 40 monómeros de SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, el peso molecular de dicha partícula está comprendido entre 30.000 y 568.675 Da, donde 568.675 Da es el PM del oligómero correspondiente a 25 monómeros de SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida, la partícula proteica de la invención se obtiene a partir de un procedimiento de polimerización que comprende la incubación de una proteína cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 91%, más preferiblemente al menos un 92%, más preferiblemente al menos un 93%, más preferiblemente al menos un 95%, aún más preferiblemente al menos un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que consiste en la SEQ ID NO: 1, en la SEQ ID NO: 2 o en la SEQ ID NO: 13: i) intercalada con al menos una fase de sonicación, o ii) en condiciones desnaturalizantes.

En una realización preferida, la incubación de la proteína se intercala con una o varias fases de sonicación. En dicha realización preferida, cada fase de incubación seguida de una fase de sonicación constituye un ciclo de incubación-sonicación. A su vez, la sucesión de varios ciclos de incubación-sonicación constituye una ronda, y en su caso, la sucesión de varias rondas constituye una serie, caracterizada por el aporte de sustrato “fresco” en cada nueva ronda. En dicha realización preferida, las fases de incubación-sonicación se caracterizan por los parámetros siguientes: elementos y condiciones del medio de incubación, temperatura de la fase de incubación, duración de la fase de incubación, y frecuencia, amplitud y potencia de los pulsos de sonicación. En una realización más preferida, las fases de incubación-sonicación están caracterizadas por: i) Fase de incubación: temperatura entre 30-45ºC y duración entre 1-60 min; ii) Fase de sonicación: frecuencia de entre 1-10 pulsos, una amplitud/pulso de entre 1-60 s y potencia/pulso de entre 40-80% de la potencia del sonicador.

En otra realización más preferida, el medio de incubación comprende una “fuente de sustrato y/o co-factores” tales como homogenado de cerebro sano (HCS) al 5-20%, rPrP, lípidos (fosfolípidos), ARNs (poli A, etc.), etc. En una realización aún más

preferida, el medio de incubación tiene un pH de entre 2-10 y además comprende: una solución tamponante o amortiguadora (PBS, etc.), sales (NaCl, etc.); surfactantes o tensoactivos tales como detergentes (Tritón X-100, etc.); inhibidores de proteasas (Complete®, etc.); agentes quelantes (EDTA, etc.); o cuentas de teflón o silicio.

En otra realización preferida, el número de ciclos de incubación-sonicación de cada ronda está entre 1 y 200, más preferiblemente entre 1 y 100, aún más preferiblemente entre 1 y 50. En una realización más preferida, el número de rondas de cada serie está entre 1 y 100, más preferiblemente entre 1 y 50 y aún más preferiblemente entre 1 y 25. En otra realización más preferida, el número de series está entre 1 y 100, más preferiblemente entre 1 y 50, y aún más preferiblemente entre 1 y 25.

En otra realización preferida, la incubación de la proteína se realiza en condiciones desnaturalizantes. En una realización más preferida, la incubación en condiciones desnaturalizantes comprende la incubación en presencia de cualquiera de los elementos seleccionados de la lista que consiste en:

- agentes caotrópicos, tales como urea, tiourea, hidrocloruro de guanidina (HCl-Gnd), iso-tiocianato de guanidina (GndSCN), etc.,
- agentes reguladores del pH, tales como ácidos (HCl, ácido acético, etc.), álcalis o bases (NaOH, etc.), etc.,
- agentes reguladores de la fuerza iónica o la tensión superficial, tales como surfactantes o tensoactivos, por ejemplo, detergentes iónicos como sodiododecil sulfato (SDS),
- agentes reguladores de la polaridad, tales como disolventes orgánicos polares (próticos/apróticos) o apolares como agua, etanol, ácido acético, acetona, tetrahidrofurano (THF), fenoles, dimetilsulfóxido (DMSO), dietiléter, 1,1,1-trifluoro-2-propanol (TFIP), benceno, tolueno, xileno, cetonas, tetracloruro de carbono, hexano, ciclohexano, etc., o
- agentes reguladores de la temperatura,

solos o en cualquiera de sus combinaciones. En el contexto de la presente realización preferida de la invención, se entiende por “agente regulador” de cualquiera de los parámetros mencionados, aquel capaz de mantener dicho parámetro en un valor que cause condiciones desnaturalizantes.

En una realización más preferida, la incubación en condiciones desnaturalizantes comprende la incubación en presencia de agentes caotrópicos. En una realización aún más preferida, los agentes caotrópicos son urea y/o hidrocloruro de guanidina. Preferiblemente, la concentración de urea está comprendida entre 0,1 y 5M, más preferiblemente entre 2 y 4M, y la concentración de hidrocloruro de guanidina está comprendida entre 0,1 y 3M, más preferiblemente entre 1 y 2M. Aún más preferiblemente, la concentración de urea es de 3M y la de hidrocloruro de guanidina es de 1M.

En una realización más preferida, la incubación en condiciones desnaturalizantes comprende la incubación en presencia de elementos adicionales tales como: agentes quelantes, como los ácidos sintéticos aminocarboxílicos, ácido nitrilotriácetico (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido trans-1,2-ciclohexilendinitrilotetracético (CDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido de etileno glicol tetraacético (EGTA), etc; reductores como β-mercaptoetanol, ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), tributilfosfina (TBP), Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP); inhibidores de proteasas serínicas, aspárticas o metalo-proteasas (Complete®, Pefabloc®, etc.); Albúmina de Suero Bovino (ASB); imidazol; sales orgánicas o inorgánicas (NaCl, $MgCl_2$, etc.); sustancias anfipáticas (anfolitos o anfolinas), tensoactivas o surfactantes sintéticas o naturales como detergentes iónicos (aniónicos o catiónicos), no iónicos o anfóteros tales como SDS, sodioundecil sulfato (SUS), sulfonato de sodio, tauroclorato de sodio, bromuro de catiltrimetil amonio (CTAB), N-Laurilsarcosina (Sarkosyl), β-octil-glucósido (βOG), octil-β-D-glucopiranósido, N-octil-β-D-glucopiranósido, octil-β-D-maltopiranósido, n-dodecil-β-D-maltósido (DDM), dodecilfosfocolina (DPC), deoxicolato de sodio (DOC), Tritón (X-100 o 114), Nonidet P-40 (NP-40), nonil fenol polioxietilenado (Igepal® CA-630), Empigen® BB, Tween-20 o 80, Zwittergent (ZW 3-10, 12, 14 o 16), CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato), CHAPSO (3-(3-clolamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propanosulfonato), sulfonato de alquilbenceno (ABS-14), etc.; betaina, sulfobetaina (SB-10 o 12) o amidosulfobetaina; amidas como formamida, dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMAc), N-metilpirrolidona (NMP), etc.; hidratos de carbono mono-, di- o polisacáridos como glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, agarosa, etc.; glicósidos como la digitonina; lípidos, incluyendo ácidos grasos saturados o insaturados, como octanoato de metilo, nonanoato, decanoato, undecanoato, laurato, tridecanoato,

miristato, pendecanoato, palmitato, heptadecanoato, glicolípidos (gangliósidos como la ceramida) o fosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE o cefalina), fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilserina, 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG), etc.; polianiones naturales o sintéticos como RNA hepático, poli-A RNA, etc.; enzimas o agentes hidrolíticos frente a diversos tipos moleculares: lipasas (A, etc.), fosfodiesterasas o nucleasas (exo o endonucleasas, DNasas y RNasas como benzonasa, lisonasa, etc.), glicosilasas, glucosidasas (N-glucosidasa F o PGNasa F); peptidasas y glicoproteinasas (PK, tripsina, quimotripsina, termolisina, pepsina, heparinasa I, II o III, condroitinasa ABC, etc.), 2-nitro-5-(tiocianato)-benzoico (NTCB); alcoholes como metanol, etanol, glicerol, propanol, etc., solos o en cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, la incubación en condiciones desnaturalizantes se realiza además a un pH comprendido entre 2 y 10, preferiblemente a pH ácido, y más preferiblemente, en un rango de pH entre 4 y 6, y aún más preferiblemente a pH 5. Dicho pH puede conseguirse, por ejemplo, añadiendo acetato sódico a la solución donde se encuentra la partícula proteica en proceso de polimerización.

En otra realización preferida, la incubación en condiciones desnaturalizantes se realiza además a una temperatura comprendida entre 30 y 45 ºC, más preferiblemente entre 35 y 40 ºC, y aún más preferiblemente a 37ºC.

En otra realización preferida, la incubación en condiciones desnaturalizantes se realiza además en condiciones de agitación. En una realización más preferida, dicha agitación se realiza evitando la rotación sobre sí misma del vial que contiene a la muestra. En otra realización más preferida, la agitación tiene lugar entre 100-1200 rpm, más preferiblemente a 600 rpm.

En otra realización preferida, el procedimiento de polimerización se realiza a partir de una forma recombinante de la proteína cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78%, un 80%, un 85%, un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 95% o un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que consiste en la SEQ ID NO: 1, en la SEQ ID NO: 2 o en la SEQ ID NO: 13. Es decir, la proteína cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78% de identidad con SEQ ID NO: 1 puede expresarse

mediante técnicas de producción de proteínas recombinantes y posteriormente purificarse mediante métodos de purificación de proteínas bien conocidos en el estado de la técnica. La proteína recombinante así producida será posteriormente sometida al proceso de polimerización referido anteriormente para dar lugar a la partícula proteica de la invención.

En otra realización preferida, tras el procedimiento de polimerización se lleva a cabo o bien una diálisis bioquímica de la solución que comprende a la partícula proteica polimerizada, o bien una dilución de la misma. El principal propósito de la diálisis o de la dilución es disminuir la concentración de aquellas sales que pudiesen resultar nocivas para el individuo. Se entiende por “diálisis bioquímica” al proceso de separación en función del tamaño de las diferentes moléculas de una solución en base a la diferencia de concentración, índice de difusión o presión osmótica a ambos lados de una membrana semipermeable, cuyo diámetro de poro determina el tránsito a su través. Una técnica comúnmente empleada, por ejemplo, para eliminar sales de una solución de proteína. En una realización más preferida, tras el procedimiento de polimerización se lleva a cabo una diálisis bioquímica de la solución que comprende a la partícula proteica polimerizada. En una realización aún más preferida, la diálisis comprende el uso de una membrana semipermeable con diámetro de poro no superior a 30.000 Da. En una realización más preferida, la diálisis o la dilución se lleva a cabo al pH en el que fue previamente polimerizada la partícula proteica, preferiblemente a un pH comprendido entre 2 y 10, más preferiblemente a pH ácido, más preferiblemente en un rango de pH entre 4 y 6, y aún más preferiblemente a pH 5. Dicho pH puede conseguirse, por ejemplo, añadiendo acetato sódico a la solución en la que se encuentra la partícula proteica polimerizada.

En otra realización preferida, tras la diálisis o dilución de la solución que comprende a la partícula proteica polimerizada, se somete la partícula proteica polimerizada obtenida a un tratamiento termo-cíclico. En una realización aún más preferida, el tratamiento termo-cíclico consiste en ciclos que comprenden cambios bruscos de temperatura. En una realización aún más preferida, el tratamiento termo-cíclico consiste en 5 ciclos de 1 min de incubación a 80 ºC seguidos de 1 min de incubación a 37 ºC. Este tratamiento termo-cíclico se conoce como “*annealing*” o “anillado” y se lleva a cabo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, según el procedimiento descrito por

Makarava *et al.* (Makarava N., *et al*., 2010, *Acta Neuropathol*., 119:177-187). En otra realización preferida, el tratamiento termo-cíclico de la partícula proteica polimerizada obtenida tras la diálisis o dilución, se lleva a cabo en presencia de cualquiera de los elementos seleccionados de la lista que consiste en: albúmina, incluyendo Albúmina de Suero Bovino (ASB), leche, suero, gelatina y homogenado de cerebro. Dichos elementos tienen, probablemente, una función inespecífica, actuando preferiblemente como estabilizador; en un proceso análogo al que se realiza con numerosos virus con el fin de que estos puedan resistir a la inoculación. En una realización más preferida, el tratamiento termo-cíclico de la partícula proteica polimerizada se realiza en presencia de homogenado de cerebro. El homogenado de cerebro al que se refiere esta realización de la invención, procede preferiblemente de un individuo sano, es decir, que no presenta una enfermedad conformacional de proteína, específicamente una prionopatía. Además, dicho homogenado procede preferiblemente de un individuo de entre 3 y 8 semanas de edad, preferiblemente de 4 semanas. Preferiblemente, el homogenado de cerebro se perfunde previamente a su puesta en contacto con la proteína. Más preferiblemente, el homogenado de cerebro se perfunde con una solución tamponante o tampón, más preferiblemente, se perfunde con PBS. Preferiblemente, el homogenado de cerebro se utiliza en un rango de concentración entre 5-20% (p/v) en una solución tamponante o amortiguadora (tampón). Más preferiblemente se utiliza a una concentración del 10% (p/v). Se entiende por “solución tamponante o amortiguadora” aquella capaz de mantener el pH en un valor determinado. Soluciones tamponantes conocidas por el experto en la materia incluyen, sin limitarnos, Tris (Tris(hidroximetil)aminometano), TBS (tampón tris salino), TEA (Tris, acetato y EDTA), PBS (Tampón fosfato salino), MOPS (Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), Bicina (N,N-Bis(2-hidroxietil)-glicina), Tricina (N-[Tris(hidroximetil)metil]glicina), SSC (Tampón salino de citrato de sodio), ácidos aminosulfónicos como CHES (Ácido 2-(ciclohexilamino)-etanosulfónico), MES (Ácido 2-morfolino etano sulfónico), HEPES (Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacinil-(1)] etanosulfónico), CAPS (Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico) o CAPSO (ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxi-1-propano sulfónico), HEPPS (Ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-propanosulfónico), TAPS (Ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico), TES (Ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico), PIPES (Ácido piperacin-1,4-bis(2-etanosulfónico), etc. Más preferiblemente la solución tamponante es PBS. Preferiblemente, el tampón ejerce su acción tamponante en un

rango de pH 5-9. Más preferiblemente, la solución tamponante mantiene el pH en un valor de 7,2 ± 0,4. En otra realización preferida, el tratamiento termo-cíclico de la partícula proteica polimerizada obtenida tras la diálisis o dilución, se lleva a cabo, además en presencia de una sustancia surfactante o tensoactiva como un detergente, ya sea iónico o no iónico. Preferiblemente, el detergente es Triton X-100.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la partícula proteica de la invención.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En una realización preferida, el medicamento de la invención es para la prevención y/o tratamiento de una prionopatía.

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una prionopatía en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye: i) inhibir los efectos causados como consecuencia de una prionopatía, es decir, detener el desarrollo de dicha condición patológica; ii) aliviar los efectos causados como consecuencia de una prionopatía, es decir, causar la regresión de la misma o de su

sintomatología; iii) estabilizar los efectos causados como consecuencia de una prionopatía.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la prionopatía, es decir, evitar que se produzca dicha condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

Se entiende por “prionopatía” o “Encefalopatía Espongiforme Transmisible” el grupo de enfermedades neurodegenerativas cuyo agente causal es un prión, siendo este último una isoforma anormal, tóxica e infecciosa de la PrP^{C}, conocida como PrP^{Sc}. Además de la mencionada ausencia de activación del SI, este tipo de enfermedades se caracterizan por el largo período de incubación (PI) que precede a la aparición de los síntomas o signos clínicos de deterioro neurológico, a la que sobreviene una evolución clínica fatal e irreversible que culmina necesaria, incondicional e irremediablemente con la muerte del individuo. Las EETs cursan con una serie de alteraciones neurológicas y conductas anormales que manifiestan un declive progresivo de las funciones cognitivas y motoras, que incluye trastornos de tipo afectivo-emocional, conductual, psicomotriz o psiquiátrico. No obstante, el cuadro clínico asociado a este tipo de patologías letales puede variar considerablemente en función de la cepa priónica implicada, la especie afectada, y el estadio o evolución de la enfermedad, pudiendo manifestarse: ataxia cerebelar (como descoordinación motora, inestabilidad, distonía), hiperexcitabilidad, hiperestesia, discinesia, parestesia, hiperactividad, tremor, temblor, debilidad, flaqueza, cefalea, mioclonías, artralgia, alteraciones del equilibrio y la marcha (e. g. marcha tambaleante “*Waddling gait*”), movimientos coreicos (e.g. “cabeceo” o “*head bobbing*”), bradiquinesia, cifosis, espalda aplanada o “*flattened back*”, pérdida de masa corporal, deshidratación, aspecto desaliñado, descargas oculares pegajosas (legañas) y oclusión palpebral, pelaje encrespado y/o decolorado, incontinencia, hemorragias nasales, infecciones urogenitales, alteración de la motilidad ocular, “*erect posture*” (dificultad para erguirse sobre las patas traseras) y “*supine position*” (dificultad para incorporarse y/o mantenerse a cuatro patas; el individuo permanece tumbado lateralmente y exhibe un movimiento “natatorio” de las extremidades), rigidez de la cola, paraplejia y tetraplejia, apatía, embotamiento,

agresividad, depresión, psicosis, demencia, letargia, insomnio, estupor, catalepsia, etc. A simple vista no se aprecia el verdadero daño cerebral, sin embargo, un examen histopatológico *post-morten* revela una neuropatología caracterizada por cuatro rasgos principales: i) una peculiar degeneración espongiforme (espongiosis), consistente en una microvacuolización del citoplasma de las células nerviosas (neuronas y neuropilo), que da nombre a estas encefalopatías; ii) muerte neuronal; iii) hipertrofia y proliferación de la astroglía (gliosis astrocítica o astrogliosis reactiva); iv) deposición o presencia de acúmulos de PrP^{Sc} en forma de placas o agregados fibrilares (fibras) de tipo amiloide.

Desde el punto de vista del diagnóstico fisiopatológico, la detección del fragmento de PrP^{Sc} resistente a PK, PrP27-30, resulta un hecho crítico, dado que su presencia se ha convertido en el único marcador molecular patognomónico válido y definitivo de la enfermedad. Así mismo, la “penetrancia” con que se manifiestan este tipo de afecciones va a depender de aspectos tan variables como los relacionados con: el grado identidad de las secuencias y la "adaptabilidad" conformacional - asociada a la "promiscuidad" de la molécula - entre la PrP^{Sc} exógena (cepa donadora) y la PrP^{C} de la especie receptora u hospedadora (relacionado con la anteriormente conocida como barrera de “especie”); el modelo y cepa animal; la vía de transmisión; o la carga priónica (cantidad de proteína con capacidad contagiante). Además de la cepa priónica, ruta de transmisión (inoculación), especie o modelo y cepa animal, el PI puede variar dependiendo del sexo o la edad del individuo. En los modelos experimentales la eficiencia de la transmisión decrece según el orden siguiente: inoculación cerebral > intravenosa > intraperitoneal > subcutánea > intragástrica.

El concepto de cepa priónica se asocia a las diferentes variantes o alternativas conformacionales de la PrP^{Sc}, y encierra la capacidad de un agente infeccioso exclusivamente proteico de codificar la información necesaria para determinar la especificidad fenotípica de las diferentes afecciones que provoca; no solo en relación al perfil lesional neurológico, patológico (vacuolización/deposición) y clínico (síntomas o signos), o al propio PI, sino también a las propiedades y características bioquímicas o moleculares de la PrP^{Sc} (patrón electroforético de glicosilación y/o proteolítico, estado de agregación, resistencia a proteasas, grado de solubilidad…), etc. En este contexto, parámetros tan recurrentemente asociados a las distintas cepas, como el PI,

o incluso el propio fenómeno de la barrera de transmisión (dícese del fenómeno de aparente naturaleza estocástica que expresa el grado de resistencia que un individuo de una determinada especie presenta frente a la infección con una cierta cepa o conformación priónica), no estarían sino evidenciando empíricamente el efecto combinado del grado de "penetrancia" con el que las antedichas propiedades de auto-replicación, propagación y transmisión se manifiestan potencial o fenotípicamente en las diferentes especies. En la presente invención, el término "prionopatía" incluye todas las variantes, cepas, formas (genéticas, esporádicas y adquiridas), adaptaciones, tipos y subtipos moleculares descritos de ETTs.

En una realización más preferida, la prionopatía se selecciona de la lista que consiste en:

- la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o *Creutzfeldt-Jakob Disease* (CJD/ECJ), incluyendo la "varíante" vCJD,
- el Insomnio Familiar Fatal (IFF) o *Fatal Familial Insomnia* (FFI), o el Insomnio Letal Esporádico (ILe),
- el síndrome *de Gerstmann-Straüssler-Scheinker* (GSS),
- la prionopatía sensible a proteasa *o Protease-Sensitive Prionopathy* (PSPr),
- el Kuru,
- la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) o *Bovine Spongiform Encephalopathy* (BSE) o "enfermedad de las vacas locas", incluyendo la Encefalopatia Espongiforme Amiloidea Bovin*a* (EEAB) *o Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy* (BASE),
- el *scrapie* o prurito lumbar, o tembladera de cordero, o *Encefalopatía Espongiforme Transmisible* (EET) ovina y caprina, incluyendo el *scrapie* atípico,
- la Enfermedad Debilitante Crónica (EDC) o *Chronic Wasting Disease* (CWD),
- la Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV) o *Transmisible Mink Encephalopathy* (TME) y
- la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) o *Feline Spongiform Encephalopathy* (FSE).

En otra realización preferida, la prionopatía afecta a un mamífero que se selecciona de entre humano, hámster, ratón, vaca, oveja, cabra, ciervo, reno/caribú, alce, rata o visón. En una realización más preferida, el mamífero es un humano.

El medicamento de la invención puede administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, oral, tópica o parenteral. En otra realización preferida, el medicamento de la invención es de administración oral o parenteral. Más preferiblemente, la administración es parenteral. Dentro de la administración parenteral se incluye, pero sin limitarse, la administración intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intratecal, intracraneal/intracerebral, subcutánea, intraorbital, intracapsular, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna o bomba de infusión. Aún más preferiblemente, la forma de administración es intravenosa, intraperitoneal o intracerebral, aún más preferiblemente intraperitoneal o intracerebral.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la partícula proteica de la invención, de ahora en adelante “composición de la invención”. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad (antioxidante), la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El “vehículo farmacéuticamente aceptable”, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente.

La composición de la presente invención puede formularse para su administración a un animal, preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así, puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

Preferiblemente, la composición de la invención comprende la partícula proteica de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de partícula proteica de la invención que produzca el efecto deseado en el tratamiento y/o prevención de una prionopatía. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia o tipo de enfermedad que presente el individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos o componentes. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la

invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Imágenes de tinción negativa representativas del aspecto y el estado de agregación de partículas proteicas constituidas por recSHaPrP23-231 polimerizada, PS1 (**A**, **B**, **C** y **D**). Compárense con verdaderos priones en muestras de PrP^{Sc} purificada, cepa 263K, correspondientes a la fracción oligomérica y sensible a PK, $sPrP^{Sc}$ (**E**), aislada a partir de la dispersión total, $tPrP^{Sc}$ (**F**), extraídas de Pastrana, M.A. "Tesis Doctoral": "Aislamiento y caracterización de una fracción de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K ($sPrP^{Sc}$); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}", 2008, Universidad de Santiago de Compostela. Las barras de escala indicadas en nanómetros (nm) permiten la calibración en función de la magnitud de la resolución de la imagen en cada caso.

Fig. 2. Enfoque terapéutico. Resultados obtenidos para los grupos (n≥6) de hámster sirio dorado (SHa) sometidos a tratamiento por vía ic – a excepción del tratado ip a tiempo 0, grupo $+0_{ip}$ – con partículas proteicas PS1 a distintos tiempos, en meses, post-inoculación ip con la cepa priónica 263K, grupos +0, +1, +2 y +3; respecto del grupo (n=8) equivalente de animales infectados ip no tratados, C_{ip}^{+}. **A**: Representación gráfica de la función de supervivencia (Kaplan-Meier) mostrando el % de supervivencia con respecto al tiempo (dpi). **B**: Análisis estadístico indicando la TS promedio ± SEM (barras de error) en dpi y el nivel de significación estadística (t-Student; α=0,05): $^{ns}P>0,05$; *P<0,05; **P<0,01.

Fig. 3. Terapia frente a una infección ic. Resultados para el grupo de SHa (n=10) tratado ic con partículas proteicas PS1, $+0_{ic}$, post-infección ic con *scrapie*, $+0_{ic}$, frente al correspondiente control positivo (n=5) de animales inoculados ic sin tratar, grupo C_{ic}^{+}. **A**: Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) mostrando el % de supervivencia frente al tiempo (dpi). **B**: Análisis comparativo donde se indica la TS promedio ± SEM (barras de error) en dpi y el nivel de significación estadística entre ambos grupos (T-Test; α=0,05): ***P<0,001.

Fig. 4. Enfoque preventivo. Resultados para los grupos de SHa (n≥5) sometidos a profilaxis por vía ic con partículas proteicas PS1 1, 2 o 3 meses antes de la transmisión ip del prion, grupos -1, -2 y -3, en relación al grupo (n=8) equivalente infectado ip no tratado, C_{ip}^{+}. **A**: Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) mostrando el % de supervivencia frente al tiempo (dpi). **B**: Análisis discriminante indicando la TS promedio ± SEM (barras de error) en dpi y el nivel de significación estadística (prueba t-student; α=0,05): ****P<0,0001.

Fig. 5. Dinámica de la eficacia del tratamiento con el tiempo. La gráfica muestra una perspectiva general de los resultados donde la eficacia del tratamiento con partículas proteicas PS1 por vía ic - en términos del incremento del tiempo de supervivencia, ΔTS (%), observado para todos los grupos de SHa infectados ip con la cepa 263K - aumenta simultánea y progresivamente con el tiempo; definido este como el periodo transcurrido desde el punto de aplicación del tratamiento, en meses, respecto del instante de transmisión de la prionopatía, t=0. En base al valor del coeficiente R^2, los datos derivados de este estudio de asociación se ajustan adecuadamente a una función sigmoidea. La línea de tendencia evidencia que la precocidad del tratamiento aumenta su eficacia; una correlación positiva que pone de manifiesto la relación de dependencia entre ambas variables y, cuya ecuación de la curva permite, a su vez, realizar estimaciones predictivas del grado de eficacia del tratamiento en base al punto de aplicación y el estadio infeccioso del animal en este modelo roedor.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

A continuación se describen una serie de ejemplos específicos basados en los ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la eficacia *in vivo* de la estrategia terapéutica utilizada, fundamentada en el uso de las partículas proteicas de la presente invención en la prevención y/o tratamiento de las prionopatías. En ellos se detalla el diseño, obtención y análisis de la eficacia de este tratamiento mediado por partículas con capacidad auto-propagativa (auto-replicante y transmisible), “protocepa” PS1. Estos ejemplos se incluyen meramente con fines ilustrativos, toda vez que proporcionan una prueba de principio a cerca de la naturaleza de la invención que aquí

se reivindica, sin que en ningún caso hayan de ser interpretados como limitaciones de la misma o de su campo de aplicabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS.

I. Producción de PrP recombinante: expresión, aislamiento y purificación.

En términos generales, el proceso de producción de la proteína recombinante se realizó conforme a procedimientos ampliamente estandarizados sujetos a pequeñas particularidades o modificaciones que se describen a continuación. Para la expresión de la secuencia completa de la proteína priónica recombinante madura de hámster sirio (SHa) comprendida entre los residuos 23–231, recSHaPrP23-231 (SEQ ID NO: 2), bacterias competentes de la especie *Escherichia coli* [Rosetta™(DE3), Novagen®] fueron transformadas mediante estrés térmico con 20 ng/µl del vector de *pOPINE* (In-Fusion™, BD Clontech, OPPF-UK); un plásmido de DNA con tecnología de clonación de alto rendimiento (HTP) cuya estructura incluye principalmente: la secuencia del gen que codifica para la proteína especificada, modificada con un codon STOP que precede a la cola C-terminal de histidinas “His-Tag”; una metionina N-terminal y promotor IPTG-inducible; y la secuencia del gen de resistencia al antibiótico “ampicilina” (*ampR*). El crecimiento selectivo de las colonias transformadas se realizó en placa con 2% LB/1,5% Agar (Sigma) y 50 µg/ml ampicilina (Sigma). La colonia seleccionada se incubó en medio de cultivo LB (Sigma) y 20 µg/ml ampicilina a 225 rpm a 37 ºC, creciendo hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO_{600}) de 0,6-0,8 unidades (Spectronic BioMate 3, Thermo). La sobreexpresión del gen de interés se indujo adicionando a la mezcla una concentración final de 1mM IPTG (Sigma). Finalmente, la suspensión se centrifugó a 5.000*g* (Rotor JA-10, Avanti™ J-20 Centrifuge, Beckman Coulter) durante 5 min a 4 ºC.

Para promover la lisis celular, el extracto bacteriano fue resuspendido en tampón 50mM Tris-HCl (Sigma), pH 8.0; 5mM EDTA (Sigma); 1% Triton X-100 (Sigma); 1mM PMSF (Fluka), 100 µg/ml lisozima (Fluka); añadiendo posteriormente 5 µg/ml (100 U/ml) DNase I (Sigma), 20mM $MgCl_2$. Durante la fase de aislamiento, los cuerpos de inclusión sedimentados se solubilizaron en condiciones desnaturalizantes con el tampón 20mM Tris-HCl, pH 8.0; 6M Gnd-HCl (Sigma); 0.5M NaCl; 10mM β-

mercaptoetanol (Sigma). Para eliminar la presencia de cualquier material insoluble, la suspensión fue centrifugada a 20.000*g* (rotor JA-17, Avanti™ J-20 Centrifuge, Beckman Coulter) durante 20 min a 4ºC, y filtrada en función del grado de turbidez (0,45 µm, Millex®-MP, Millipore).

El proceso de purificación del lisado de *E. coli* se llevó a cabo mediante Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC), utilizando una columna pre-empaquetada y precargada con una matriz de resina de Niquel/Ni^{2+}-Sefarosa, His Trap™ FF Crude, 5 ml (GE Healthcare Life Sciences), y tamponando en presencia de 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM NaCl, 5mM imidazol, 2M Gnd-HCl.

La recSHaPrP23-231 (SEQ ID NO: 2) se eluyó de la columna con un tampón 20mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM NaCl, 500mM imidazol, 2M Gnd-HCl. Previa adición de Gnd-HCl hasta una concentración final de 6M, el eluato se concentró ~33 veces con dispositivos Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el proceso de renaturalización ("*refolding*") de la proteína recombinante, el volumen concentrado del purificado IMAC se diluyó 10 veces en tampón de elución 6M Gnd-HCl, y posteriormente se sometió a diálisis durante 3 h a 4 ºC en agitación, utilizando un volumen suficientemente amplio, 1-2 l, de 20mM acetato sódico, pH 6.5, y una membrana SnakeSkin® Pleated Dialysis Tubing 10,000 MWCO (Thermo Scientific). Tras 2 h, el tampón de diálisis fue eliminado y reemplazado por un volumen "fresco". Posteriormente, la solución de proteína obtenida de este modo se sometió a liofilización (LABCONCO). Finalmente, la proteína liofilizada se mantuvo a 4 ºC para su uso ulterior e inmediato.

Todas las soluciones fueron preparadas con H_2O ultra-pura "milli-Q" (Millipore), y convenientemente filtradas con instrumentos adaptados al volumen requerido (0,22-0,45 µm, Millex® o 0,10 µm, Stericup Express® PLUS, Millipore); maximizando las condiciones de esterilidad del material utilizado durante todo el proceso.

El rendimiento, grado de pureza y especificidad en base al peso molecular relativo de la proteína obtenida tras este proceso se analizó mediante SDS-PAGE (gel 12%) y

posterior tinción con Azul Coomassie en presencia de marcadores estándar (Precision Plus Protein™ Standards All Blue, Bio-Rad); especificidad a su vez verificada por Western blot en membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) usando una dilución 1:5000 de 3F4 (Dako, Glostrup, Denmark), un anticuerpo monoclonal específico anti-PrP que reconoce el epítopo ~107-TNMKHMAGA-115 (SEQ ID NO: 14). Por su parte, la concentración y el rendimiento absoluto se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico (Spectronic BioMate 3, Thermo), midiendo la absorbancia a 280 nm (PM = 22973,2 Da; coeficiente de extinción de la proteína = 62005; ExPASy, ProtParam).

II. Polimerización de la PrP.

La recSHaPrP23-231(SEQ ID NO: 2) liofilizada se disolvió en 6M Gdn-HCl para preparar una solución concentrada de proteína, 4 mg/ml. Para el proceso de polimerización dicha solución se diluyó a una concentración final de proteína de 0,6 mg/ml, en un volumen de reacción de 1,2 ml, y se incubó a 37ºC en 20mM acetato sódico, pH 5.0, 1M Gdn-HCl, 3M urea, 150mM NaCl durante 4-7 días en continua agitación horizontal a 600 rpm (Thermomixer Comfort, Eppendorf); evitando la rotación de los tubos sobre su propio eje. Invariablemente, durante todo el proceso se utilizó material (puntas de pipeta, viales) de baja adherencia (Eppendorf). La solución así obtenida se dializó durante toda una noche a 4 ºC con agitación, en un volumen suficientemente amplio, 1-2 l, de 10mM acetato sódico, pH 5.0; usando una membrana SnakeSkin® Pleated Dialysis Tubing 10,000 MWCO (Thermo Scientific), y reemplazando el tampón de diálisis transcurridas varias horas. Las partículas proteicas obtenidas tras este proceso se designaron como “protocepa PS1”.

Finalmente, la caracterización del material generado tras este proceso se llevó a cabo mediante análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) con un aparato Philips CM-12 (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands), previa tinción negativa de la muestra. Esta se llevó a cabo mediante la aplicación de una gota de 5-10 µl de la suspensión sobre una rejilla de cobre de malla 400 recubierta de una película de Formvar/Carbono (Ted Pella Inc.). La gota se mantuvo 2 min a temperatura ambiente y se secó cuidadosamente por capilaridad tocando el borde con un trozo de papel de filtro. A continuación se realizaron dos lavados con sendas gotas de H_20 milli-Q,

retirando igualmente el exceso por capilaridad. La muestra se tiñó durante 1-2 min depositando una gota de una solución acuosa convenientemente filtrada (Millex®, Millipore) de 2% acetato de uranilo (Electron Microscopy Sciences, PA, USA), retirando nuevamente el exceso por capilaridad.

Como referencia o control positivo se utilizaron auténticos priones extraídos de muestras de PrP^{Sc} previamente purificada a partir de cerebros de SHa infectados con la cepa 263K en estado terminal, usando una versión ligeramente modificada del método propuesto por Diringer *et al*. (Diringer, H., *et al*., 1997, *Intervirology* 40, 238-46), y finalmente resuspendidas en tampón 20mM Tris-HCl, 1% sarkosyl, pH 8.5, en ausencia de proteasas (PK); tanto de la dispersión total, $tPrP^{Sc}$, como de la fracción sensible a PK aislada a partir de esta, $sPrP^{Sc}$ (Pastrana, M. A., *et al*., 2006, *Biochemistry* 45:15710-7).

III. Fase de estabilización del medicamento: "anillado".

Durante la fase final de producción del medicamento basado en partículas proteicas PS1, la proteína recSHaPrP23-231 (SEQ ID NO: 2) polimerizada se sometió a un proceso de incubación termo-cíclico en presencia de homogenado de cerebro sano (HCS), basado esencialmente en el procedimiento de anillado o "*annealing*" previamente descrito por Makarava *et al*. (Makarava, N., *et al*., 2010, *Acta Neuropathol*. 119:177-87). El cerebro utilizado en dicho proceso se extrajo de un hámster sirio con cuatro semanas de edad previamente perfundido con 1X PBS (Sigma). Una vez pesado, el cerebro se homogenizó al 10% en PBS hasta obtener una dispersión homogénea usando un homogenizador Dounce (Wheaton Industries Inc, NJ, USA), en presencia del cóctel inhibidor de proteasas 1X Complete™ (Roche Diagnostic, Alemania). Tras una incubación de 30 min en hielo, el homogenado fue transferido a un tubo nuevo desechando cualquier resto de material grueso que se hubiere depositado en el fondo. La solución dializada de recSHaPrP23-231 polimerizada se mezcló en proporción ½ (v/v) con el HCS al 10% previamente preparado, $[HCS]_{Final}$ = 5%, en presencia de 0.1% Triton® X-100 (Sigma). La mezcla se dispuso en alícuotas de 50 µl en tubos de PCR de 0,2 ml, pared fina y tapa abovedada (MβP), y se sometió a 5 ciclos de 1 min de incubación a 80 ºC seguidos de 1 min de incubación a 37 ºC, empleando un termociclador (FlexCycler Analytikjena, EcoGen). El

volumen combinado de todas las alícuotas se transfirió inmediatamente al animalario, dispuesto para ser usado como potencial medicamento.

De cara a una eventual optimización del producto o del proceso de producción, esta pudiera ser una fase prescindible en la síntesis del medicamento. En efecto, según afirman sus propios autores, el procedimiento resulta igualmente eficaz cuando el anillamiento de las partículas se induce en presencia de Albúmina de Suero Bovino (ASB), lo que sugiere que el HCS – más allá de su hipotético papel en el aporte de los co-factores necesarios para llevar a cabo el proceso de conversión - ejerce una función inespecífica, actuando, probablemente, como simple estabilizador. Una etapa de estabilización análoga al que se realiza con numerosos virus a base de leche, suero, albúmina o gelatina con el fin de que estos puedan resistir a la inoculación.

IV. Bioensayo.

Todos los procedimientos que implican el uso de animales de experimentación se llevaron cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones, requisitos y criterios bioéticos conforme al riguroso cumplimiento de la normativa vigente que en materia de "protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos" determina la Directiva 86/609/CEE del Consejo de la UE, establece el RD 1201/2005 a nivel estatal, y regula el Decreto 296/2008 según la autoridad autonómica o local pertinente (Xunta de Galicia). Así pues, todos los esfuerzos fueron encaminados a garantizar el bienestar y minimizar, en la medida de lo posible, el sufrimiento excesivo o innecesario de los animales.

Para constatar *in vivo* la validez de la nueva estrategia terapéutica sugerida y evaluar la actividad y eficacia potencial del tratamiento fundamentado en las propiedades adquiridas por la rPrP polimerizada frente a patologías priónicas, se emplearon ejemplares de la cepa LVG “Crl:LVG(SYR)” (Charles River, Alemania) perteneciente a la especie *Mesocricetus auratus*, un roedor comúnmente conocido como “hámster sirio dorado” (SHa). Este modelo animal, frecuentemente utilizado en la investigación sobre priones, muestra una gran susceptibilidad a la infección con la cepa priónica 263K. En la elaboración y el desarrollo de este estudio se establecieron grupos de hembras, n≥6 ejemplares/grupo, con cuatro semanas de edad y 60-70 g de peso; individualmente

identificadas mediante la implantación de un crotal en el pabellón auricular. En definitiva, grupos de hembras de SHa infectadas con la cepa 263K fueron sometidas a tratamiento con PS1, generada *de novo* mediante síntesis *in vitro* a partir de recSHaPrP23-231 (SEQ ID NO: 2) polimerizada según la descripción previa.

El presente estudio incluye principalmente diferentes combinaciones de tres variables (ver Tabla 2): (i) tiempo, entendido como el instante en que se aplica el tratamiento, utilizando una aproximación profiláctica *versus* terapéutica, siempre respecto de la transmisión del inóculo infeccioso (tiempo 0, t=0); (ii) vía de administración del tratamiento, examinando la viabilidad del acceso ic e ip al organismo; y (iii) ruta de inoculación del agente infeccioso, ic o ip. Este diseño experimental pretendía analizar, responder y evaluar en paralelo el mayor número posible de aspectos y parámetros diferentes relacionados con el desarrollo de la presente estrategia y que afectan directamente a la capacidad de respuesta del tratamiento, tales como: rendimiento, eficacia, dinámica, posología, etc.

Experimentalmente, aunque de un modo un tanto simplificado por la relevancia de las excepciones (ver Tabla 2), la mayor parte de los ensayos se centraron en el estudio del comportamiento del tratamiento cuando este se aplicó por vía ic frente a la infección priónica inducida por ruta ip. Lógicamente, dado el exiguo PI que caracteriza a una cepa priónica tan eficaz, estable y virulenta como 263K para el hospedador empleado, este parámetro se tuvo en consideración a la hora de definir los distintos tiempos de administración del tratamiento en función del estadio infeccioso del animal; procurando no exceder, máxime de cara a la aproximación estrictamente terapéutica, el TS estimado para dicha cepa, que *a priori* varía entre los ~3 y ~4,5 meses post-inoculación ic o ip, respectivamente. En consecuencia, se determinaron puntos de aplicación del tratamiento específicos que abarcan el t=0 y 1, 2 o 3 meses pre- y post-infección con 263K, posibilitando el análisis desde una perspectiva profiláctica *versus* terapéutica, tal y como se indica en la Tabla 2.

Así mismo, cabe subrayar que el tratamiento frente a esta prionopatía se llevó a cabo siguiendo siempre la misma pauta posológica, cuyo régimen de distribución establece la aplicación de una dosis única y exclusiva del tratamiento a cada ejemplar. Dosis que

se corresponde con un volumen de 10 y 50 µl, según se suministre por vía ic o ip, y se estima equivalente a ~2,5 y ~12,5 µg de proteína recombinante, respectivamente.

Por su parte, el inóculo infeccioso se obtuvo a partir del cerebro extraído de un hámster infectado con la cepa 263K en fase clínica terminal, con el que se preparó un homogenado al 10% en PBS, 1X Complete™, usando un homogenizador Dounce (Wheaton Industries Inc, NJ, USA). Para la transmisión de la enfermedad priónica, los hámsteres se inocularon ic - ruta específica de inoculación de acceso directo al cerebelo, que atraviesa el cráneo lateralmente a nivel del foramen postglenoide del escuamoso derecho - con 5 µl de una dilución 1:10 de este homogenado de cerebro al 10%; o con el equivalente a un volumen cinco veces superior, 25 µl, cuando el acceso se realizó a través de la ruta ip.

Paralelamente, se establecieron cinco grupos control (ver Tabla 2): (i) dos controles positivos que se corresponden a hámsteres inoculados con la cepa priónica 263K a través de la ruta ic (C_{ic}^{+}) o ip (C_{ip}^{+}) sin tratar, (ii) dos controles negativos formados por ejemplares no infectados pero sí tratados con partículas proteicas PS1 por vía ic (C_{ic}^{-}) o ip (C_{ip}^{-}), y (iii) un control absoluto constituido por animales sanos, i.e., no infectados y no sometidos tratamiento (C_{abs}).

Todos los animales inoculados por vía ic fueron previamente anestesiados con una dosis ip de 15-17 µl/g_SHa de avertina, una solución 1:1 (p/v) de los reactivos 2,2,2-Tribromoetanol y 2-Metil-2-butanol (Sigma-Aldrich) al 2% en PBS. Invariablemente, las inoculaciones ic se practicaron con jeringuillas de alta precisión, 22-26s/2''/2 (Hamilton Company), adecuadas al volumen requerido; mientras que las ip se inyectaron con aguja hipodérmica estándar de 25G (Sterican®, B/Braun).

A partir de su inoculación, se realizó un seguimiento continuo de la evolución de los animales. Por motivos éticos, a medida que la manifestación de signos clínicos inequívocos de EET evidenciaba la proximidad a un estadio terminal, los animales fueron sacrificados mediante la aplicación de un protocolo eutanásico basado en la exposición a CO_2.

Durante la autopsia, los cerebros de los animales fueron extraídos asépticamente y seccionados simétrica y longitudinalmente en dos hemisferios; siendo el derecho inmediatamente congelado a -80 ºC para posteriores análisis bioquímicos, y el izquierdo directamente fijado en Formalina (Formaldehy Solution 10% Neutralized, stabilized with methanol PRS, Panreac) para futuros estudios histopatológicos.

V. Obtención de datos y análisis de los resultados.

Tras un seguimiento exhaustivo e individualizado de la evolución de los animales atendiendo especialmente a la aparición, manifestación y desarrollo de signos clínicos inequívocos de EET (e.g. ataxia, hiperestesia, tremor, hiperexcitabilidad, temblor, etc.), se computó el tiempo de supervivencia (TS) para cada ejemplar; definido como “días transcurridos tras la inoculación con el agente infeccioso”, y expresado en días post-inoculación (dpi). Estos datos quedan reflejados en las correspondientes curvas de supervivencia (Fig. 2A, 3A y 4A). En particular, los resultados obtenidos en este estudio de asociación fueron sometidos a un análisis estadístico discriminante para contrastar en cada caso la afirmación sustentada en la hipótesis nula, H_0: “el tratamiento no resulta eficaz”; frente a la hipótesis alternativa, $H_{a:}$ “el tratamiento resulta eficaz”. A tal fin, se calculó en primera instancia la media aritmética o promedio del TS para cada grupo ($n \geq 6$), así como el error estándar de la media ($TS_p \pm SEM$). A continuación, se evaluó la magnitud de las diferencias en TS_p observadas entre los distintos grupos y su nivel de significación estadística, valor *p*, aplicando el estadístico paramétrico *t-Student* (prueba de 2 colas), y un grado de confianza, α, de 0,05. Finalmente, se calculó el porcentaje de incremento del TS medio, ΔTS (%), derivado en cada caso de la diferencia entre el valor de la media de supervivencia observado para un determinado grupo sometido a tratamiento, y el obtenido para el correspondiente control positivo sin tratar, C^+ (Fig. 2B, 3B y 4B). Paralelamente, se realizó un análisis comparativo de supervivencia entre cada grupo tratado y el pertinente C^+ utilizando el estimador de Kaplan-Meier, software “GraphPad Prims 5.01”.

A continuación se esgrimen los resultados para constatar la medida en que la estrategia empleada ha servido para paliar los efectos derivados de esta patología priónica en el citado roedor.

RESULTADOS.

EJEMPLO 1. Caracterización de partículas proteicas PS1.

De cara a la subsiguiente fase de polimerización, durante el proceso de producción de recSHaPrP23-231 (SEQ ID NO: 2) se llevó a cabo un seguimiento del curso de la expresión y purificación, mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Azul Coomassie, Western blot y espectrofotometría. Este análisis confirmó en grado satisfactorio la magnitud de parámetros como: rendimiento, pureza, especificidad y concentración (datos no mostrados).

La caracterización mediante el análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) pone de manifiesto el aspecto y estado de agregación de partículas proteicas PS1 (Fig. 1). La tinción negativa evidencia la presencia de material particularizado, e incluso de agregados de tipo fibrilar, en muestras de recSHaPrP23-23 (SEQ ID NO: 2) previamente sometida al proceso de polimerización descrito con anterioridad (Fig. 1A, 1B, 1C y 1D). Estas estructuras comparten ciertas similitudes y diferencias en cuanto a la presencia agregados de aspecto más o menos estructurado (fibrilar o amiloide), amorfo (posiblemente oligomérico), indeterminado o estocástico, con respecto a las muestras usadas como referencia o control positivo que se corresponden con auténticos priones, como el purificado total de PrP^{Sc} extraído de la cepa 263K, $tPrP^{Sc}$ (Fig. 1F), y la fracción oligomérica y sensible a PK aislada a partir de esta, $sPrP^{Sc}$ (Fig. 1E). Esto sugiere la co-existencia de partículas con diferente estado de agregación/polimerización en PS1. Así mismo, la desigualdad morfológica apreciada entre $sPrP^{Sc}$ y $tPrP^{Sc}$, al margen de sus propiedades bioquímicas diferenciales, pone de manifiesto la diversidad estructural potencial entre dos especies moleculares pertenecientes a la misma cepa, procedentes del mismo extracto cerebral y tratadas en idénticas condiciones, y que *a priori* solo difieren en su estado de agregación (Pastrana, M. A., *et al*., 2006, *Biochemistry* 45:15710-7). A su vez, debe considerarse que el aspecto que presentan las muestras puede variar dependiendo de las condiciones del medio: solución solubilizante/dispersante (pH; tipo y concentración de detergente, presencia de proteasas, etc), extracción, incubación y almacenamiento (agitación, sonicación, temperatura, etc), e incluso de la técnica analítica empleada: TEM, crio-EM, etc (Pastrana, M.A. “Tesis Doctoral”: “Aislamiento y caracterización de

una fracción de PrP^{Sc} sensible a proteinasa K ($sPrP^{Sc}$); estudios estructurales sobre la PrP^{Sc}", 2008, Universidad de Santiago de Compostela).

Así, se comprobó la presencia de partículas proteicas polimerizadas, en grado variable pero superior al estado de monómero. En efecto, el proceso de polimerización requiere de la "activación" previa de la molécula, probablemente consecuencia de cambios conformacionales en la estructura de la molécula de PrP. Una nueva conformación susceptible de adquirir una cierta capacidad de auto-replicación y transmisibilidad y de alterar el estado de agregación de la partícula. En definitiva, una cepa inofensiva capaz de autopropagarse y competir con una cepa tóxico-infecciosa por la conversión del sustrato, PrP^{C}, acorde con la naturaleza de "protocepa" propuesta.

LA APLICACIÓN DE UNA "PROTOCEPA" (PS1) GENERADA *IN VITRO* Y *DE NOVO* RETRASA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD Y AUMENTA LA SUPERVIVENCIA EN ANIMALES EXPUESTOS A UNA PRIONOPATÍA

EJEMPLO 2. Enfoque terapéutico.

En esta aproximación, varios grupos de hámsteres previamente inoculados a través de la ruta ip con la cepa priónica 263K (t=0), fueron posteriormente sometidos a terapia con una dosis única de partículas proteicas PS1 por vía ic. El mencionado tratamiento fue aplicado específicamente a t=0 o transcurrido un periodo de 1, 2 o 3 meses post-infección, grupos +0, +1, +2 y +3, respectivamente (Tabla 2). La supervivencia de cada ejemplar en tales circunstancias queda reflejada en la representación gráfica del análisis de supervivencia realizado con el estimador de Kaplan-Meier (Fig. 2A). Del análisis de los resultados mediante la prueba t-Student (α=0,05) para el grupo +3 (n=5) se desprende un TS_p de 159,2 ± 11,6 dpi, que equivaldría a un ΔTS del ~13% pero carente de significación estadística, P>0,05. Sin embargo, el resto de los grupos (n=6) experimentaron un retardo en la aparición de signos clínicos característicos de EET asociados a la cepa 263K (ataxia, hiperestesia, tremor, hiperexcitabilidad, temblor, etc.) en respuesta al tratamiento. Esta ralentización de la progresión la enfermedad hacia un estadio terminal que prolonga el PI, se tradujo en valores de TS_p estadísticamente significativos (Test-T; α=0,05). Así, el grupo +2 alcanzó un TS_p de 164,5 ± 7,7 dpi y un ΔTS del ~16% (*P<0,05); mientras que los grupos +1 y $+0_{ic}$

mostraron un TS_p de 172,0 ± 11,4 y 176,3 ± 12,0 dpi, lo que supone ΔTS del ~22 y ~25% (**P<0,01), respectivamente (Fig. 2B).

Sorpresivamente, los animales (n=6) también respondieron positivamente al tratamiento cuando éste se administró por vía ip a t=0 post-infección ip, grupo $+0^{ip}$ (Fig. 2A y B). Para este grupo se observó un TS_p de 169,5 ± 7,1 dpi y un ΔTS estadísticamente significativo del ~20%, **P<0,01 (Test-T; α=0,05). Además de su valor terapéutico añadido, dado que la eficacia del tratamiento pone de manifiesto su viabilidad para hacer frente a la infección desde la periferia, este resultado supone una considerable ventaja práctica, ya que permite aumentar y facilitar sustancialmente su aplicabilidad como potencial fármaco.

Naturalmente, los parámetros de eficacia descritos para los grupos sometidos a tratamiento especificados hasta el momento, se han inferido del análisis comparativo respecto del correspondiente grupo de referencia, constituido por hámsteres (n=8) inoculados por la vía ip con la cepa 263K sin tratar (C_{ip}^{+}), que exhibieron un TS_p de 140,8 ± 2,3 dpi (Fig. 2).

Atendiendo al PI y TS que caracteriza a la cepa 263K, cabría esperar que el tratamiento de los animales a los tres meses post-infección, grupo +3, resultase “tardío” y por tanto ineficaz. No en vano, la ausencia de significación estadística advertida en este caso no permite rechazar H_0 y aceptar H_a. Sin embargo, en la curva de supervivencia se observa que 2 de los 5 ejemplares de este grupo +3 responden individual y positivamente al tratamiento (Fig. 2A). Esto denota cierto grado de eficacia incluso cuando se parte de un escenario ciertamente “desfavorable”. Considerando brevemente las discrepancias o desviaciones achacables a esta variabilidad interindividual, las curvas de supervivencia apuntan en cada grupo un número considerable de individuos que sobreviven claramente más allá del valor porcentual expresado por ΔTS, que se deriva en cada caso de la diferencia entre las medias ponderadas de los grupos implicados. Sirva a modo de referencia mencionar que, entre el último animal en perecer del grupo control C_{ip}^{+} (150 dpi) y sus homólogos en los grupos +2, +1 o +0 (202-203 dpi), el ΔTS se correspondería con un ~35%, un valor substancialmente superior al obtenido en cualquiera de estos grupos. Igualmente, en esta aproximación terapéutica se observa que el % de animales que responden

positivamente al tratamiento aumenta a medida que nos acercamos temporalmente al t=0, instante en que se indujo la infección, grupos +3 < +2 < +1 < +0 (Fig. 2 y Tabla 2).

En paralelo, se testó la eficacia del tratamiento frente a una infección inducida por vía ic. Indudablemente, este ensayo implica un "obstáculo" añadido para combatir con éxito los efectos adversos de la enfermedad, al tiempo que resulta de especial relevancia en el contexto en que habitualmente se desarrollan este tipo de proteinopatías. A pesar de las "condiciones adversas", el tratamiento de los animales a t=0 por vía ic tras una infección provocada a través de la misma ruta, grupo $+0_{ic}$ (n=10), evidenció un TS_p de 119,3 ± 3,7 dpi y un ΔTS medio estadísticamente significativo del ~30% (Prueba t de Student; α=0,05), ***P<0,001; frente a los 91,6 ± 4,6 dpi del control positivo sin tratar (C_{ic}^{+}), formado por un grupo de hámsteres (n=5) inoculados por la vía ic con la cepa 263K (Fig. 3B). Además, en este caso la respuesta se muestra más estable y uniforme, toda vez que valores extraídos del análisis de la variabilidad interindividual - concebida en los términos apuntados con anterioridad - no difieren considerablemente del ΔTS observado para las medias entre ambos grupos.

Así mismo, en la función escalonada (Kaplan-Meier) representativa del análisis de supervivencia no se advierte solapamiento alguno entre la curva obtenida para dicho grupo, $+0_{ic}$ (n=10), y la correspondiente al control positivo sin tratar, grupo C_{ic}^{+} (n=5). De hecho, todos los ejemplares tratados experimentan un efecto positivo y tangible que incide en la extensión del PI, alterando el curso "normal" de la prionopatía que encarna dicho grupo C_{ic}^{+} (Fig. 3A).

EJEMPLO 3. Enfoque preventivo.

En este caso, la eficacia del tratamiento se evaluó desde una perspectiva de carácter profiláctico. Diferentes grupos de hámsteres sanos se sometieron a tratamiento preventivo ic con el material recombinante polimerizado (PS1), bien uno, dos o tres meses antes de ser expuestos al agente tóxico-infeccioso, grupos -1, -2 y -3, respectivamente. En los tres casos los animales respondieron favorablemente a la profilaxis, exhibiendo un elevado nivel de significación estadística, ****P<0,0001(Test-T; α=0,05); una vez más, probabilidad inferida fruto de la comparación establecida frente al ya descrito control positivo, C_{ip}^{+}, constituido por hámsteres (n=8) no

sometidos a tratamiento pero infectados con la cepa 263K por la ruta ip, que sucumbieron con un TS_p de 140,8 ± 2,3 dpi. Concretamente, el grupo -1 (n=6) exhibió un TS_p de 206,7 ± 10,3 que se corresponden con un ΔTS del ~46%; entretanto, en el grupo -2 (n=5) se observó un TS_p de 203,4 ± 11,3 dpi y un ΔTS del ~44%; y por último, el grupo -3 (n=6) respondió al tratamiento con un TS_p de 215,0 ± 14,8 dpi y un ΔTS del ~52% (Fig. 4B). Nuevamente, cabe destacar el valor de los datos derivados del análisis de la variabilidad interindividual observada, por cuanto subyace y transciende la potencialidad terapéutica de la estrategia utilizada. Así por ejemplo, entre el último animal en perecer del grupo control C_{ip}^{+} (150 dpi) y su equivalente en el grupo tratado -3 (283 dpi), el ΔTS podría suponer incluso el ~88%.

La gráfica de supervivencia (Kaplan-Meier) revela nuevamente una ausencia de solapamiento entre los ejemplares pertenecientes a grupos sometidos a tratamiento profiláctico, grupos -3, -2 y -1, y el control positivo no tratado, C_{ip} (n=8). En contraposición con la progresión observada en dicho control, donde todos los ejemplares responden positivamente al tratamiento, sucumbiendo a la enfermedad con un amplio retardo (Fig. 4A). Por tanto, los resultados sugieren que la aplicación del inóculo que contiene la PrP polimerizada es capaz de inducir en el hospedador un mecanismo de autoprotección o autodefensa frente a la enfermedad.

Al igual que el grupo control absoluto, C_{abs} (n=5), formado por hámsteres sanos, no infectados ni sometidos a tratamiento, los dos controles negativos constituidos por ejemplares (n=6) expuestos exclusivamente al tratamiento con partículas proteicas PS1, via ic (C_{ic}^{-}) o vía ip (C_{ip}^{-}), sobrevivieron asintomáticos más allá de los 500 días (Tabla 2), sin evidencia de toxicidad ni manifestación de un cuadro clínico característico de EET o afección alguna. Cuando menos, esta ausencia aparentemente total de fenotipo o contraindicaciones, exhibida por ambos controles negativos, sugiere el alto grado de inocuidad *in vivo* del tratamiento ensayado. Esto mismo parece evidenciarse de los resultados preliminares del estudio histopatológico.

La presencia de grupos con un tamaño de n<6 (n=5) está ligada a la muerte accidental de algún ejemplar por causas no relacionadas con la enfermedad de *scrapie*.

Grupo	Ruta de Inoculación (Sc)	Tratamiento (PS1)*	Tiempo† (meses)	n/n_o	TS_p ± SEM (dpi)	*Valor P*	ΔTS (%)
+3	ip	ic	+3	5/5‡	159,2 ± 11,6	ns	13
+2	ip	ic	+2	6/6	164,5 ± 7,7	<0,05	16
+1	ip	ic	+1	6/6	172,0 ± 11,4	<0,01	22
+0	ip	ic	+0	6/6	176,3 ± 12,0	<0,01	25
$+0^{ip}$	ip	ip	+0	6/6	169,5 ± 7,1	<0,01	20
$+0_{ic}$	ic	ic	+0	10/10	119,3 ± 3,7	<0,001	30
-1	ip	ic	-1	6/6	206,7 ± 10,3	<0,0001	46
-2	ip	ic	-2	5/5‡	203,4 ± 11,3	<0,0001	44
-3	ip	ic	-3	6/6	215,0 ± 14,8	<0,0001	52
C_{ic}^{+}	ic	/	/	5/5‡	91,6 ± 4,6	/	/
C_{ip}^{+}	ip	/	/	8/8	140,8 ± 2,3	/	/
C_{ic}^{-}	/	ic	/	0/6	>500	/	/
C_{ip}^{-}	/	ip	/	0/6	>500	/	/
C_{abs}	/	/	/	0/5	>500	/	/

*Con independencia de la vía de acceso, intracerebral (ic) o intraperitoneal (ip), todos los animales tratados se sometieron a una única dosis con las particulas proteicas generadas a partir de recSHaPrP23-231 polimerizada, protocepa PS1; †punto de aplicación del tratamiento, en meses, respecto del instante de inoculación con el prion, t=0, en modo preventivo (-) o terapéutico (+).

SHa: hámster sirio dorado, cepa LVG; **Sc**: inóculo de *scrapie* a base de homogenado al 10% en PBS de cerebro infectado con la cepa 263K; **C**: grupo control positivo (+, SHa infectados ic o ip), negativo (-, animales no infectados pero sometidos a tratmiento ic o ip) o absoluto (abs, ejemplares sanos, sin infectar ni tratar).

Ratio **n/n_o**: proporción de SHa que sucumben a la enfermedad del total de ejemplares del grupo; ‡n<6 se debe a la muerte accidental de algún ejemplar por causas no relacionadas con el *scrapie*.

TS_p ± SEM (dpi): tiempo de supervivencia promedio ± error estándar de la media (días post-inoculación); Δ**TS**: % de incremento del TS medio. El nivel de significación estadística, *valor P*,se obtuvo del análisis con el estadístico t-student, α=0,05; ns: no significativo (P>0,05).

Tabla 2. Diseño experimental del bioensayo mostrando el efecto del tratamiento con particulas proteicas PS1 en la supervivencia de SHa inoculados con la cepa de *scrapie* 263K.

En general, y con independencia de la dosis aplicada, puesto que es fija, los datos muestran que el nivel de eficacia del tratamiento varía en función de las variables previamente mencionadas: tiempo y vía de aplicación del mismo, y ruta de inoculación del agente infeccioso. A su vez, una reagrupación o puesta en común de los datos

obtenidos para los grupos que constituyen el grueso de este estudio - es decir, aquellos donde los animales han sido tratados por vía ic a distintos tiempos frente a una infección ip - y su posterior representación gráfica en función del tiempo, ofrece una perspectiva general comparada de los resultados que ilustra la dinámica de la eficacia de la presente estrategia terapéutica para este modelo animal (Fig. 5). En efecto, el análisis de asociación entre ambas variables refleja la variabilidad observada en la magnitud de la respuesta para cada grupo, e indica que la eficacia del tratamiento, en términos del porcentaje de ΔTS (eje Y), es dependiente del tiempo (eje X), entendiendo este como el periodo transcurrido desde su punto de aplicación, en meses, respecto del instante de transmisión de la prionopatía, t=0. Ambas variables aumentan simultánea y progresivamente. Como muchos otros sistemas complejos, los resultados parecen ajustarse razonablemente a una función sigmoidal, que muestra una progresión temporal desde unos niveles bajos al inicio, y alcanza valores máximos transcurrido un cierto tiempo. La línea de tendencia evidencia que la precocidad del tratamiento aumenta su eficacia; una correlación positiva que pone de manifiesto la relación de dependencia entre ambas variables, permite describir su evolución, y realizar estimaciones predictivas acerca de la eficacia del tratamiento en función de su punto de aplicación y el estadio infeccioso del animal para este roedor. Así, según la validación experimental, y el valor del coeficiente R^2=0,9458, el efecto posible o probable de este comportamiento vendrá dado por la ecuación polinómica de tercer orden:

$$\mathbf{y = 0{,}3611x^3 + 0{,}25x^2 - 9{,}5635x + 30{,}143}$$

En general, atendiendo al margen derecho del perfil de la curva, inmediatamente se desprende que la eficacia de tratamiento disminuye paulatinamente a medida que éste se aplica en una etapa cada vez más avanzada de la enfermedad. Por otro lado, el comportamiento observado en las condiciones ensayadas sugiere un cierto efecto de saturación en la fase profiláctica, grupos -3, -2 y -1. Por último, en este tipo de funciones la transición se produce en una región típicamente caracterizada por una fuerte aceleración intermedia. En efecto, según la pendiente de la curva en el tramo más próximo al punto de inoculación con la cepa infecciosa, t=0, pequeñas variaciones en el tiempo auguran una mayor tendencia a las fluctuaciones drásticas en la magnitud de la respuesta al tratamiento (Fig. 5).

Esta asociación no azarosa entre variables se ajusta al mecanismo de acción propuesto en la presente estrategia para el tratamiento basado en partículas proteicas PS1. En efecto, conforme al *modus operandi* de una cepa priónica y el elevado PI que caracterizan a las EETs, este mecanismo de propagación es compatible con la correlación positiva predicha anteriormente, donde la precocidad del tratamiento aumenta su eficacia (Fig. 5). No obstante, son varios los indicios o evidencias que se acomodan parsimoniosa y coherentemente a los postulados de la hipótesis de trabajo, avalando el mecanismo de acción a modo de "contrafuego" propuesto para el procedimiento "antipriónico" desarrollado; conceptualmente basado en la capacidad de auto-propagación y la consecuente competencia por la conversión del sustrato, PrP^C, entre la cepa "atenuada" (protocepa PS1) y la infecciosa. En efecto, esto mismo se puede inferir igualmente en consonancia con otras observaciones: (i) las partículas proteicas presentan un mínimo estado de agregación o polimerización, superior al del monómero; (ii) la magnitud de la eficacia es un efecto derivado de la mera administración de una dosis única y exclusiva de dicho tratamiento. Aunque fácilmente ampliable, esta dosis constituye una importante ventaja frente a otras aproximaciones previas, y una evidencia indirecta acerca del mecanismo de auto-defensa automático e indefinido que esta estrategia proporciona al organismo; análogo en este aspecto a la respuesta inmune.

En definitiva, los resultados revelan la eficacia terapéutica de esta novedosa estrategia inocua e inofensiva, apoyan la validez de los postulados planteados en la hipótesis de partida y constituyen por sí mismos una verdadera "prueba de principio" que avala la posibilidad de "combatir los priones usando sus propias armas".

En una doble analogía con el campo de la genética, el término "ingeniería proteómica" se refiere al conjunto de tecnologías que permite intervenir, manipular o modificar el fenotipo de un individuo actuando directa e intencionadamente sobre su proteoma. En el caso que nos ocupa, la metodología para desarrollar nuevas cepas priónicas *in vitro* abre de algún modo la posibilidad de generar protocepas (PS) "dominantes" cuya eficacia de auto-replicación supere a la de la cepa tóxico-infecciosa en la competencia por el sustrato, hasta incrementar su PI incluso más allá de la esperanza de vida de la propia especie.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una partícula proteica polimerizada generada a partir de proteína priónica cuya secuencia aminoacídica presenta al menos un 78% de identidad con SEQ ID NO: 1, cuyo peso molecular es igual o superior a 30.000Da, para la fabricación de un medicamento.

2. Uso según la reivindicación 1, donde la secuencia aminoacídica de la partícula proteica polimerizada tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1.

3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la secuencia aminoacídica de la partícula proteica polimerizada tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia aminoacídica de la partícula proteica polimerizada tiene al menos un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia aminoacídica de la partícula proteica polimerizada es SEQ ID NO: 1.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la partícula proteica polimerizada posee un grado de polimerización de oligómero.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la partícula proteica polimerizada posee un grado de polimerización superior al de oligómero.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la polimerización se realiza a partir de una forma recombinante de la proteína priónica.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho medicamento es para la prevención y/o el tratamiento de una prionopatía.

10. Uso según la reivindicación 9, donde la prionopatía se selecciona de la lista que consiste en: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Síndrome de Gerstmann-Sträussler-

Scheinker, Insomnio Familiar Fatal , Insomnio letal esporádico, Kuru, prionopatía sensible a proteasa, Encefalopatía Espongiforme Bovina, Encefalopatia Espongiforme Amiloidea Bovina, *Scrapie*, Enfermedad Debilitante Crónica, Encefalopatía Transmisible del Visón y Encefalopatía Espongiforme Felina.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde dicha prionopatía afecta a un mamífero que se selecciona de entre humano, vaca, oveja, cabra, ciervo, alce, reno/caribú, rata, ratón, visón y hámster.

12. Uso según la reivindicación 11, donde dicho mamífero es un humano.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la administración del medicamento es oral o parenteral.

14. Uso según la reivindicación 13, donde la administración es parenteral.

15. Uso según la reivindicación 14, donde la administración es intravenosa, intraperitoneal o intracerebral.

16. Una composición farmacéutica que comprende una partícula proteica polimerizada como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente.

FIG. 1

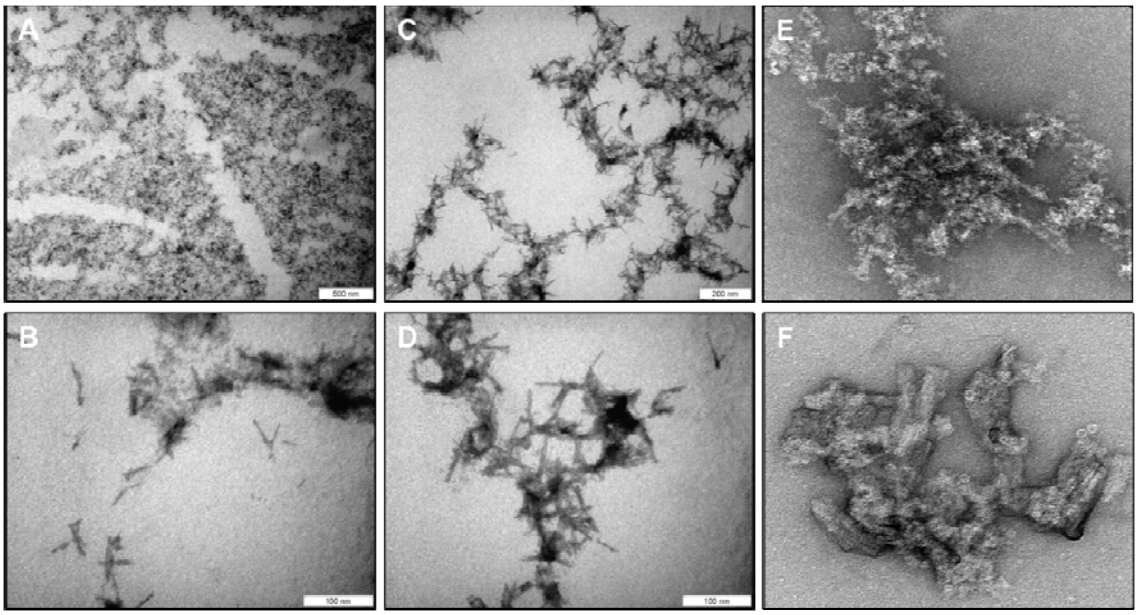


Fig. 2

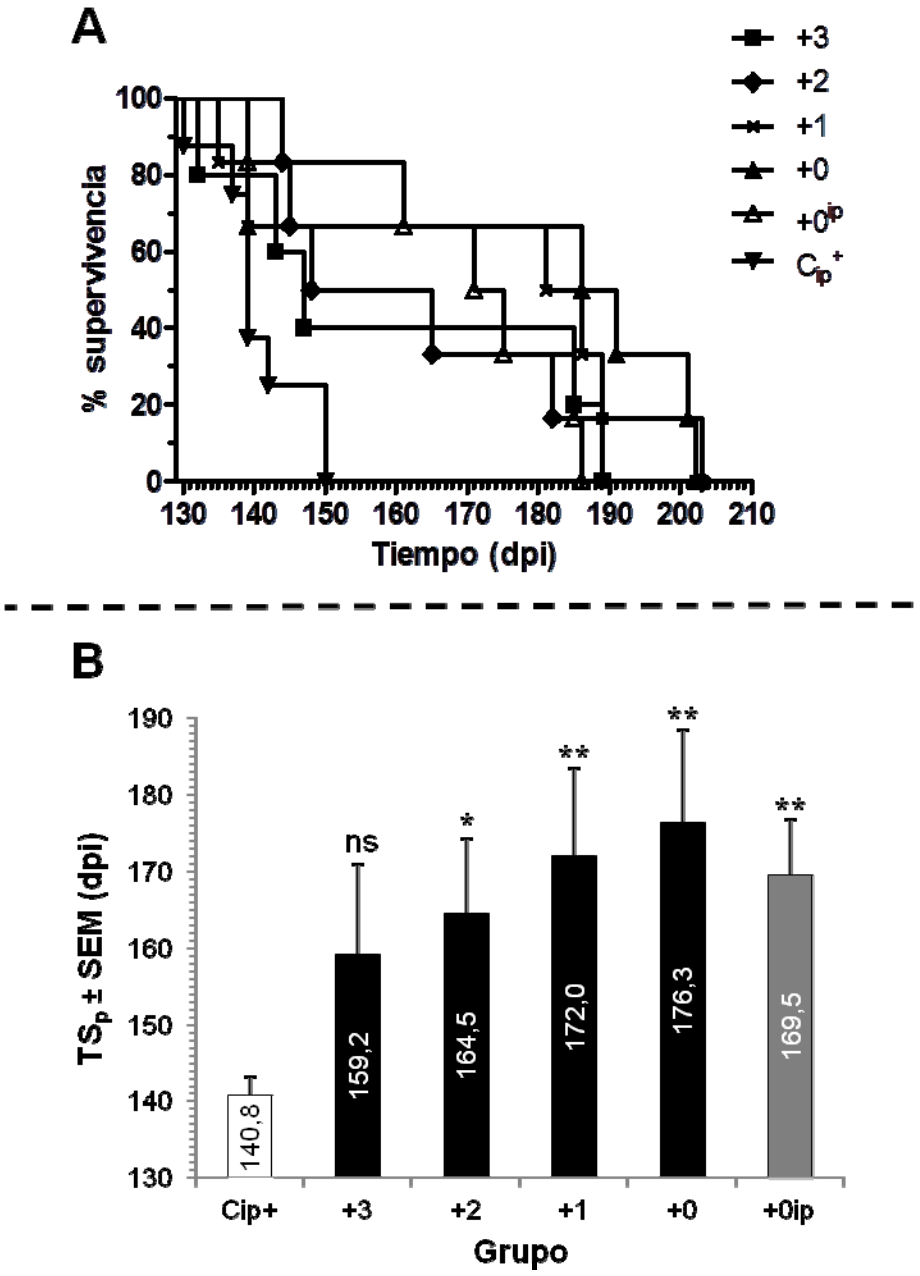

A
+3
+2
+1
+0
+0ip
Cip+
% supervivencia
100
80
60
40
20
0
130
140
150
160
170
180
190
200
210
Tiempo (dpi)
B
TSp ± SEM (dpi)
190
180
170
160
150
140
130
ns
*
**
**
**
140,8
159,2
164,5
172,0
176,3
169,5
Cip+
+3
+2
+1
+0
+0ip
Grupo

FIG. 3

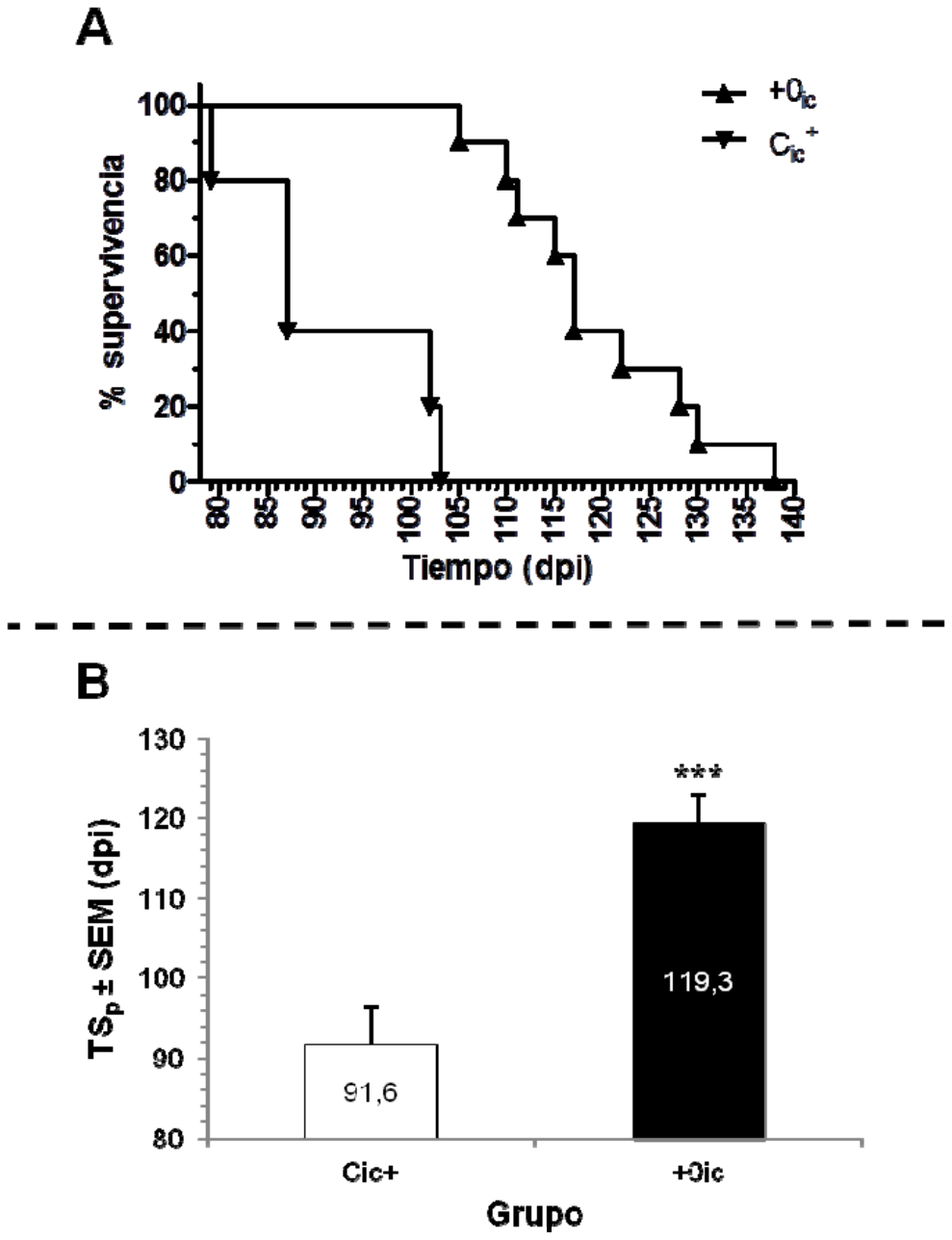

A
100
80
60
40
20
0
% supervivencia
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
Tiempo (dpi)
+0ic
Cic+
B
130
120
110
100
90
80
TSp ± SEM (dpi)
***
119,3
91,6
Cic+
+0ic
Grupo

FIG. 4

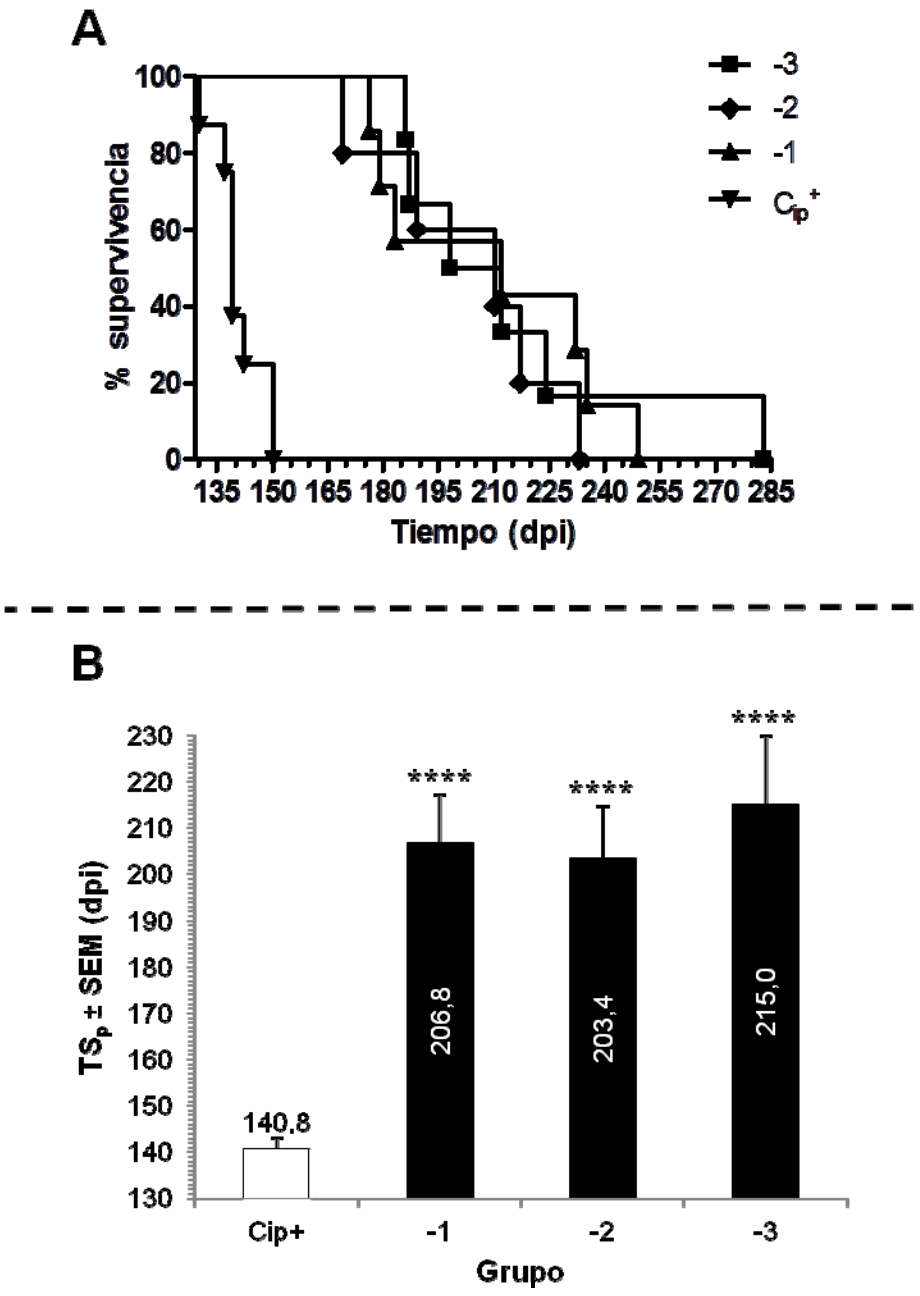
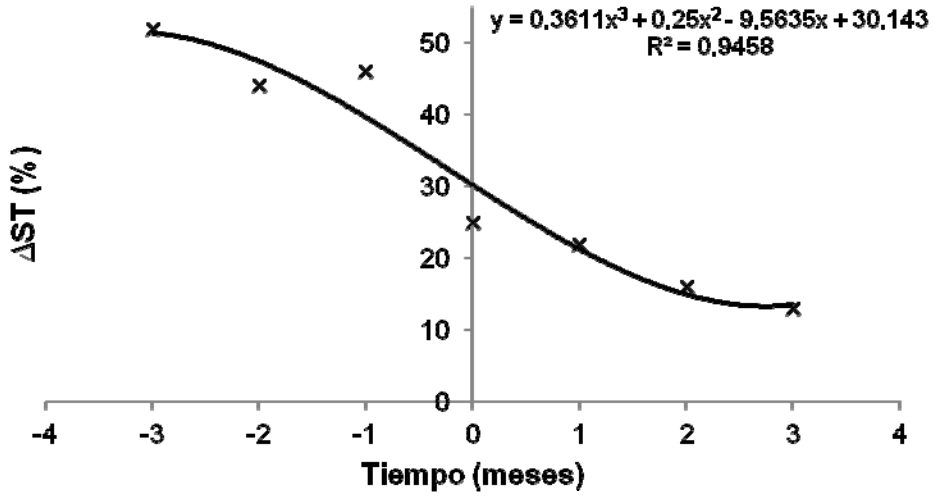

A
100
80
60
40
20
0
% supervivencia
135 150 165 180 195 210 225 240 255 270 285
Tiempo (dpi)
-3
-2
-1
Cip+
B
230
220
210
200
190
180
170
160
150
140
130
TSp ± SEM (dpi)
140,8
206,8
203,4
215,0
****
****
****
Cip+
-1
-2
-3
Grupo

FIG. 5


y = 0,3611x3 + 0,25x2 - 9,5635x + 30,143
R² = 0,9458
ΔST (%)
50
40
30
20
10
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
Tiempo (meses)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

<120> "USO DE PARTÍCULAS PROTEICAS POLIMERIZADAS GENERADAS A PARTIR DE PROTEÍNA PRIÓNICA PARA EL TRATAMIENTO DE PRIONOPATÍAS "

<130> ES1596.43

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 208
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly
35 40 45

Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly
50 55 60

Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro
65 70 75 80

Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met
100 105 110

Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr
115 120 125

Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Met
130 135 140

Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile
145 150 155 160

Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe
165 170 175

Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys
180 185 190

Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser
195 200 205

<210> 2
<211> 209
<212> PRT
<213> Mesocricetus auratus

<400> 2

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

Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly
20 25 30

Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly
35 40 45

Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly
50 55 60

Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro
65 70 75 80

Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala
85 90 95

Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met
100 105 110

Ser Arg Pro Met Met His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr
115 120 125

Arg Glu Asn Met Asn Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val
130 135 140

Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile
145 150 155 160

Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe
165 170 175

Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys
180 185 190

Thr Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg
195 200 205

Ser

<210> 3

<211> 208
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

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

Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly
20 25 30

Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly
35 40 45

Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly
50 55 60

Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser
65 70 75 80

Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly
85 90 95

Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser
100 105 110

Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg
115 120 125

Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp
130 135 140

Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr
145 150 155 160

Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr
165 170 175

Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Val
180 185 190

Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser
195 200 205

<210> 4
<211> 217
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 4

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly
65 70 75 80

Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
85 90 95

Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
100 105 110

Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe
115 120 125

Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr
130 135 140

Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn
145 150 155 160

Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Glu His Thr Val
165 170 175

Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met
180 185 190

Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu
195 200 205

Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala
210 215

<210> 5
<211> 209
<212> PRT
<213> Ovis spp.

<400> 5

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Ser His Ser Gln Trp Asn Lys
65 70 75 80

Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
85 90 95

Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
100 105 110

Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
115 120 125

Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
130 135 140

Val Asp Arg Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
145 150 155 160

Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
180 185 190

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
195 200 205

Ala

<210> 6
<211> 209
<212> PRT
<213> Capra hircus

<400> 6

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

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

50 55 60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Ser His Ser Gln Trp Asn Lys
65 70 75 80

Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
85 90 95

Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
100 105 110

Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
115 120 125

Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
130 135 140

Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
145 150 155 160

Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
180 185 190

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
195 200 205

Ala

<210> 7
<211> 209
<212> PRT
<213> Cervus nippon

<400> 7

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys
65 70 75 80

```
Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
                85                  90                  95

Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
            100                 105                 110

Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
        115                 120                 125

Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
    130                 135                 140

Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Thr Phe Val His Asp Cys Val Asn
145                 150                 155                 160

Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
                165                 170                 175

Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
            180                 185                 190

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
        195                 200                 205

Ala
```

<210> 8
<211> 209
<212> PRT
<213> Cervus elaphus

<400> 8

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
            20                  25                  30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
        35                  40                  45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
    50                  55                  60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys
65                  70                  75                  80

Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
                85                  90                  95
```

Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
100 105 110

Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
115 120 125

Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
130 135 140

Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Thr Phe Val His Asp Cys Val Asn
145 150 155 160

Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
180 185 190

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Glu Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
195 200 205

Ala

<210> 9
<211> 209
<212> PRT
<213> Rangifer tarandus

<400> 9

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys
65 70 75 80

Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
85 90 95

Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
100 105 110

Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
115 120 125

Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
130 135 140

Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Thr Phe Val His Asp Cys Val Asn
145 150 155 160

Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
180 185 190

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
195 200 205

Ala

<210> 10
<211> 209
<212> PRT
<213> Alces alces

<400> 10

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys
65 70 75 80

Pro Ser Lys Pro Gln Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
85 90 95

Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
100 105 110

Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
115 120 125

Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro

130 135 140

Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Thr Phe Val His Asp Cys Val Asn
145 150 155 160

Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
165 170 175

Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
180 185 190

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
195 200 205

Ala

<210> 11
<211> 203
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 11

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

Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Ser Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro
20 25 30

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro
35 40 45

His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Ser Gln Gly
50 55 60

Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn
65 70 75 80

Leu Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly
85 90 95

Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Met Leu His
100 105 110

Phe Gly Asn Asp Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg
115 120 125

Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln
130 135 140

Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr
145 150 155 160

Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys
165 170 175

Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys
180 185 190

Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser
195 200

<210> 12
<211> 210
<212> PRT
<213> Mustela vison

<400> 12

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

Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly
20 25 30

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
35 40 45

Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Ser His Gly Gln Trp Gly
65 70 75 80

Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser
100 105 110

Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg
115 120 125

Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Lys
130 135 140

Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val
145 150 155 160

Asn Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu
165 170 175

Asn Phe Thr Glu Thr Asp Met Lys Ile Met Glu Arg Val Val Glu Gln
180 185 190

Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Glu Ala Tyr Tyr Gln Arg
195 200 205

Gly Ala
210

<210> 13
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val
20 25 30

Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro
35 40 45

Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn
50 55 60

Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr
65 70 75 80

Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys
85 90 95

Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr
100 105 110

Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln
115 120 125

Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser Ser
130 135 140

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia Artificial

<220>
<223> Epítopo de PrP

<400> 14

Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala
1 5