(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 557 901**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09765609 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2300499**

(54) Título: **Fragmento de anticuerpo anti-proteína priónica**

(30) Prioridad:

17.06.2008 EP 08010971

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2016

(73) Titular/es:

KORTH, CARSTEN (25.0%)
Fürstenwall 57
40219 Düsseldorf, DE;
KORTH, CARSTEN (25.0%);
PETSCH, BENJAMIN (25.0%) y
MÜLLER-SCHIFFMANN, ANDREAS (25.0%)

(72) Inventor/es:

LELIVELD, SIRIK, RUTGER;
KORTH, CARSTEN;
STITZ, LOTHAR;
PETSCH, BENJAMIN y
MÜLLER-SCHIFFMANN, ANDREAS

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Fragmento de anticuerpo anti-proteína priónica

Campo de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce una proteína priónica. La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y a un método para generar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades priónicas son enfermedades únicas, transmisibles, neurodegenerativas, puesto que el agente infeccioso consiste solamente en una isoforma conformacional alternativa de la proteína priónica codificada por el hospedante, PrP^{Sc}, que se multiplica sin un ácido nucleico (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998; Safar et al., 2005). Se cree que la multiplicación se produce por inducción de la conformación infecciosa en la proteína priónica normal PrP^{c} (Prusiner, 1982). Las diferentes conformaciones estables o "confórmeros" de la PrP han promovido el concepto de enfermedades conformacionales de proteínas dentro de las enfermedades neurodegenerativas, afirmando que una proteína mal plegada o mal procesada es la causante de la patogénesis de la enfermedad (Prusiner, 2001; Taylor et al., 2002). Aunque debido a la insolubilidad de muchas de las proteínas mal plegadas, el análisis estructural ha sido difícil, la generación de ligandos específicos para las proteínas mal plegadas ha sido clave para analizar estas conformaciones de proteínas en su entorno celular (Leliveld y Korth, 2007). La noción de que los confórmeros plegados de forma alternativa u oligómeros solubles de las proteínas más que los depósitos de proteínas insolubles, son decisivos en los procesos patológicos, ha centrado los esfuerzos en el desarrollo de ligandos específicos de confórmero u oligómero. Se han generado anticuerpos monoclonales (AcM) específicos de conformación contra PrP^{Sc} (Korth et al., 1997; Paramithiotis et al., 2003) o contra oligómeros Aβ que son los confórmeros patógenos mayoritarios en la enfermedad de Alzheimer (Kayed et al., 2003), permitiendo la detección de confórmeros individuales de proteínas dentro de una población de proteínas. Estos reactivos se han convertido en reactivos clave en la detección de la presencia de estos confórmeros asociados con la enfermedad en tejidos o fluidos corporales, como método de identificación de individuos asintomáticos o en etapas tempranas con riesgo de desarrollar la enfermedad priónica (Kuhn et al., 2005; Nazor et al., 2005) o enfermedades relacionadas con el oligómero Aβ (Lesne et al., 2006; Luibl et al., 2006).

El documento WO93/11155 describe la generación de anticuerpos anti-priones, su uso en la profilaxis o tratamiento de enfermedades priónicas y la generación de anticuerpos anti-idiotípicos (página 26, líneas 33- página 36, línea 10 reivindicaciones 45-48). También describe péptidos que incluyen aminoácidos retro-invertidos (reivindicación 33, página 22, líneas 31-37).

Myamoto et al. (*Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol.335, no.1, 2005, 197-204) describe anticuerpos anti-PrP (3S9, 2H9) que inhiben la propagación de priones. 3S9 reconoce un epítopo que incluye Tyr154 en la hélice 1 del PrP. 3S9 excluía totalmente PrPsc de las líneas celulares e inhibía la conversión de PrPc en PrPsc (tabla 2, fig. 4, resultado nº 2).

Perrier et al. (*J. of Neurochemistry*, vol. 89, no. 2, 2004, 454-463) describe anticuerpos anti-prion que inhiben la enfermedad priónica en cultivo celular. El anticuerpo SAF61, que muestra un efecto inhibidor, CI50 de 5 nM (fig. 2, página 457, columna de la derecha) reconoce parcialmente el mismo epítopo que w226 (tablas 1,2).

El documento WO2004050120 describe anticuerpos anti-PrP que inhiben priones in vivo. ICSM35 se une a la PrPc beta y PrPsc entre los aminoácidos 91-110. ICSM18 reconoce los restos 146-159 de PrP (ejemplos 1,2). Ambos anticuerpos reducen los niveles esplénicos de PrPsc.

Hasta ahora, no hay farmacoterapia de enfermedades neurodegenerativas dirigida a intervenir con las causas biológicas fundamentales de estas enfermedades. Se han llevado a cabo procedimientos de inmunización activos o pasivos dirigidos a confórmeros Aß asociados con la enfermedad en el caso de la enfermedad de Alzheimer (Schenk et al., 1999) o que protegen el confórmero del sustrato "normal" PrP^{c} en el caso de enfermedades priónicas (White et al., 2003) en modelos de ratones de estas enfermedades. Específicamente, la administración de AcM en la prevención de síntomas asociados con la enfermedad en modelos de ratones tanto de enfermedad priónica como en la enfermedad de Alzheimer (Bard et al., 2000; White et al., 2003). Aunque en el caso de los AcM anti-Aβ, parece que estos pasan la barrera hematoencefálica (BHE) para prevenir la agregación Aβ (Bard et al., 2000), los anticuerpos anti-PrP para prevenir la enfermedad priónica solo han tenido éxito después de inoculación periférica (intraperitoneal) cuando podían actuar en sitios periféricos de multiplicación (Heppner et al., 2001; White et al., 2003). Por lo tanto, aunque parece que los AcM anti-Aβ pasan fácilmente la BHE, los AcM anti-PrP no lo hacen.

Resumen de la invención

Por lo tanto, un objetivo de la invención es proporcionar una molécula de tipo anticuerpo que tenga permeabilidad mejorada de la BHE y opciones terapéuticas con anticuerpos para enfermedades priónicas.

Según la invención, se proporciona un péptido que reconoce específicamente una proteína priónica, es decir, PrP^c y/o PrP^{Sc}, y que consiste en una secuencia de aminoácidos que consiste en una región determinante de la complementariedad (CDR) de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y/o SEQ ID NO: 13, un péptido D retro-invertido de dicha CDR, de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. Un péptido según la invención que comprende la región determinante de la complementariedad 3 de la cadena pesada (CDR3H) solo se une a PrP^{Sc} de una forma específica de la conformación. Un péptido según la invención que comprende un mutante M13A o D11R de CDR3H solo se une a PrP^{Sc} de una forma específica de la conformación. Un péptido según la invención que comprende un mutante R10A de CDR3H solo se une a PrP^c de una forma específica de la conformación. Un péptido según la invención que comprende un péptido D retro-invertido de CDR3H ((D-)CDR3H) se une específicamente a PrP^{Sc} y presenta actividad antipriónica, demostrando que estos péptidos que contienen 16 aminoácidos tienen potencial como agentes de diagnóstico y terapéuticos en enfermedades priónicas.

Todos los péptidos según la invención se unen a PrP^c y/o PrP^{Sc}, tienen permeabilidad mejorada en la BHE y ofrecen nuevas opciones analíticas y terapéuticas para enfermedades priónicas.

También se describe que la región determinante de la complementariedad (CDR) puede estar contenida en al menos una región variable de la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender además al menos una región variable de la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 5. En este caso, es ventajoso que al menos una región variable de la cadena pesada y al menos una región variable de la cadena ligera estén unidas por un péptido conector, preferiblemente $(Gly_4Ser)_3$. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de la invención, el fragmento de anticuerpo es un fragmento scFv que comprende al menos una región variable de la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y al menos una región variable de la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 5. El fragmento scFv según la invención, se une específicamente aPrP^c y PrP^{Sc} y presenta actividad antipriónica, de modo que se puede usar en el análisis y tratamiento de enfermedades relacionadas con priones.

Con el fin de potenciar la excreción de un péptido recombinante según la invención, el péptido puede comprender además al menos una secuencia señal, preferiblemente pelB de *E. coli* o un péptido líder similar. Las secuencias directoras adecuadas son también, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos específicos de tejido o específicos de célula, que son capaces de dirigir el péptido según la invención a las células diana deseadas, en particular en el cerebro. Además, se pueden fusionar péptidos señal tales como secuencias de localización nuclear (SLN) con el péptido según la invención, con el fin de guiarlo dentro de una célula diana, por ejemplo al núcleo. Si un péptido según la invención comprende además al menos una secuencia marcadora, se puede facilitar la detección y/o purificación del péptido. La secuencia marcadora puede ser un marcador c-Myc y/o un marcador de polihistidina, preferiblemente hexahistidina. Otras secuencias marcadoras pueden ser, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa o proteína verde fluorescente potenciada. Es decir, el péptido según la invención se puede clonar y expresar como un péptido o proteína de fusión.

En una realización preferida de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la invención comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, que es un fragmento scFv que comprende al menos una región variable de la cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 y al menos una región variable de la cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 5.

Son posibles péptidos que, a nivel de aminoácidos, son al menos 85%, preferiblemente 90%, más preferido 95%, idénticos al péptido descrito antes. Básicamente, la invención comprende todos los derivados de péptido L o D que pueden competir con CDR3H o riCDR3H a parte de su interacción con PrPSc, y todos los péptidos L o D donde se sustituyen entre sí aminoácidos con carga, hidrofobicidad, aromaticidad o hidroxilo equivalentes (aminoácidos equivalentes con carga positiva: lisina y arginina, aminoácidos equivalentes con carga negativa: aspartato, glutamato; aminoácidos equivalentes hidrófobos: alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina; aminoácidos equivalentes alcohólicos: serina y treonina; aminoácidos equivalentes neutros: glicina y prolina).

La invención incluye además una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1;

b) moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2;

c) moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 11;

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 12;

e) moléculas de ácido nucleico que codifican un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 13;

Se describe además, un método para generar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reconoce específicamente una proteína priónica. El método comprende:

a) generar un anticuerpo que reconoce un dominio específico de la proteína priónica;

b) aislar una secuencia de aminoácidos específica de antígeno de dicho anticuerpo; y

c) generar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-idiotípico, que reconoce dicha secuencia de aminoácidos específica de antígeno.

El método descrito de generación de AcM anti-PrP supera el estado de la técnica anterior y el concepto previo de que era imposible una respuesta inmunitaria eficaz contra PrP en animales no modificados genéticamente debido a la autotolerancia. Por lo tanto, el presente método comprende la inmunización con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un dominio de interacción de la PrP, que permite que una proteína priónica interaccione con otra proteína priónica, y usarlo como un inmunógeno para superar la autotolerancia a este antígeno. Sorprendentemente, si el dominio específico es un dominio de interacción de la proteína priónica, el anticuerpo anti-idiotípico reconoce PrP^{c} y/o PrP^{Sc} y tiene actividad antipriónica. En el método, la secuencia de aminoácidos específica de antígeno puede ser una región determinante de la complementariedad (CDR), preferiblemente CDR3H de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o una secuencia retro-invertida de péptido D de CDR3H, denominada riCDR3H, de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

La invención se refiere además a un kit que comprende el péptido según la invención y/o la molécula de ácido nucleico según la invención.

La invención también se refiere a una preparación farmacéutica que comprende el péptido según la invención y/o la molécula de ácido nucleico según la invención.

El péptido según la invención o el kit según la invención o la preparación farmacéutica según la invención, se pueden usar ventajosamente en el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con priones u otras enfermedades, donde se ha demostrado que la manipulación de la proteína priónica mediante la unión de anticuerpo/ligando, influye en la evolución de la enfermedad. El péptido según la invención o el kit según la invención o la preparación farmacéutica según la invención, se pueden usar además ventajosamente con el fin de producir un efecto inmunoestimulador.

Descripción detallada de realizaciones varias y preferidas de la invención.

Según la invención, se proporciona un scFv activo antipriónico, de alta afinidad, que se podría expresar con altos rendimientos como una proteína soluble dirigida al espacio periplasmático en E. coli. Debido a su actividad antipriónica fiable, el fragmento de anticuerpo se puede usar para tratar infecciones priónicas in vivo. La proteína de aproximadamente 30 kDa es el fragmento de polipéptido más pequeño cuya actividad antipriónica se haya nunca confirmado por bioensayos, después de los fragmentos Fab activos antipriónicos que son aproximadamente el doble de grandes (Peretz et al., 2001). Los fragmentos de anticuerpo según la invención se pueden modificar fácilmente por recombinación, si es necesario, para transportar el fragmento de unión a PrP a través de la BHE, y dirigirlo a los sitios subcelulares de acción en el SNC y sitios periféricos de multiplicación.

Se describen a continuación varias realizaciones de ejemplo y preferidas de la invención con detalle, con referencia a los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra un dibujo esquemático de una realización de los fragmentos de anticuerpos según la invención. Los dominios variables de la cadena pesada y ligera de W226, conectados por un dominio conector $(Gly_4Ser)_3$ flexible, (scFv) y W226-Hc se clonaron en el vector de expresión procariota pET22b, permitiendo la secreción de los fragmentos de anticuerpo en el periplasma por una secuencia líder pEL-B N-terminal. Además, se incluyeron marcadores myc e his_6 C-terminales. La secuencia de CDR3 de la cadena pesada en L-(CDR3H) o forma retro-invertida (riCDR3H) se muestra debajo.

La **figura 2** muestra

a) Un gel teñido con Coomassie del procedimiento de purificación que implica cromatografía de afinidad de metal (IMAC) y posteriormente cromatografía de afinidad de PrP (muestras después de etapas de purificación individuales como se indica). La fracción final después de la elución de la columna de afinidad de PrP es pura (flecha).

b) Un análisis con campo de flujo de flujo asimétrico de scFvW226. El scFvW226 consistía en aproximadamente 82% (p/p) de monómeros y 16% de dímeros. Las partículas mayores que se han detectado posiblemente eran tetrámeros (~120 kDa, ≤2%).

c. Cuantificación de la unión de scFvW226-PrP por espectroscopía de resonancia de plasmón de superficie (SPR). PrP recombinante de ratón se inmovilizó en un chip CM5. Se inyectó scFvW226 en concentraciones en el intervalo

de x a y con un caudal de 30 µl/min. Se registraron curvas de asociación y disociación durante 180 s. Después de cada análisis la superficie se regeneró con NaOH 10 mM. Los cálculos de ajuste de la curva dieron una K_D de 2 nM.

d. Una transferencia western de una inmunoprecipitación de homogeneizados de cerebro de ratón normales (N) e infectados con tembladera (Sc) con scFvW226 inmovilizado. El material de partida está transferido al panel izquierdo. El homogeneizado normal precipita por *pull-down* y el material precipitado por *pull-down* de los cerebros de tembladera es resistente a proteasa, indicando que scFvW226 reconoce tanto PrP^c como PrP^{Sc}.

La **figura 3** muestra

a) Una transferencia Western de lisados de células ScN2a tratadas por transfección con IgG_κ-scFvW226 recombinante o por transferencia con líquido sobrenadante de medio condicionado de células N2a transfectadas con IgG_κ-scFvW226, no infectadas. Las células ScN2a eran (de izquierda a derecha) no tratadas, transfectadas con vector vacío (pCDNA 3.1.), transfectadas con IgGκ-scFv19B10 de control o IgGκ-scFvW226 durante 4 días o 7 días. Además, se usó el medio condicionado de células N2a transfectadas con IgGκ-scFv19B10 de control, o IgGκ-scFvW226 en las células ScN2a durante 4 días. Además, se usó scFv19B10 de control recombinante o scFvW226 generado en E. coli en una concentración 10 nM durante 7 días. La transferencia demuestra claramente que todas las construcciones que contienen scFvW226 son activas antipriónicas.

b) Una transferencia Western de lisados de células ScN2a tratadas con scFvW226 recombinante de E. coli. Las células ScN2a se trataron con diferentes concentraciones de scFvW226 como se indica, durante 1 semana. Posteriormente, el tratamiento se interrumpió durante 1 semana (panel superior) o 3 semanas ("experimento de desactivación", panel inferior). Como controles se usaron quinacrina (1000 nM) y AcM W226 de longitud entera (16 nM). La transferencia demuestra un efecto permanente, dependiente de la dosis, de eliminación priónica de scFvW226 recombinante de E. coli.

c) Una transferencia Western de lisados de células ScN2a tratados con scFvW226 recombinante de E. coli, para determinar la concentración mínima eliminadora de priones. Las células ScN2a se trataron con diferentes concentraciones de scFvW226 como se indica, durante una semana. Con una concentración mínima 4 nM, scFvW226 eliminaba los priones.

La **figura 4** muestra la especificidad de conformación diferencial y actividad antipriónica de la región determinante de la complementariedad 3 del dominio de la cadena pesada (CDR3H) sola, como un péptido L y como un péptido D retro-invertido ((D-)riCDR3H).

a) Una transferencia western de lisados de células ScN2a digeridas con PK no tratadas (n. t.), tratadas con quinacrina 1 µM (Q), con dominio de la cadena pesada recombinante (W226-Hc) de E. coli, (D-)riCDR3H sintética, o L-CDR3H en la concentración indicada. Solo (D-)riCDR3H tenía actividad antirpiónica con concentración 4 µM.

b) Un modelo de la representación de la superficie de péptidos CDR3H linearizados con el péptido L en la parte superior y el péptido D debajo. Los restos mostrados en azul y rojo son básicos y ácidos, respectivamente. Se puede ver claramente que las posiciones de los grupos funcionales de las cadenas laterales se conservan a pesar de la inversión de la secuencia de aminoácido. Los colores para las posiciones de átomos son rojo claro = O, azul claro = N, gris = C, blanco = H, amarillo = S.

c) Una transferencia Western de experimentos de precipitación *pull-down* de homogeneizados de cerebro de ratón normales (N) o infectados con la tembladera (Sc) con L-CDR3H o (D)-riCDR3H inmovilizada. La digestión con proteasa (PK) con 200 µg/ml indicaba la presencia de PrP^{Sc}. Mientras que scFvW226 podía precipitar tanto PrP^C como PrP^{Sc} (figura 2c), la región CDR3H precipitaba por *pull-down* solo PrP^{Sc} de una forma específica de la conformación, como lo hacía también el péptido (D-)riCDR3H.

La **figura 5** muestra la tinción de células ScN2a con L-CDR3H y (D-)riCDR3H marcado con tetrametilrodamina (TAMRA). Las células ScN2a se incubaron con (D-)riCDR3H-TAMRA (**a**) o L-CDR3H-TAMRA (**d**) 1 µM durante 3 horas y después de lavar con PBS, se detectaron los péptidos unidos por microscopía de fluorescencia. Para demostrar la especificidad de la unión, las células ScN2a se preincubaron con scFvW226 100 µM 30 min antes de la adición de péptidos (**b** y **e**). La digestión con tripsina demostró resistencia a la proteasa de (D-)riCDR3H (**c**) frente a L-CDR3H (**f**).

La **figura 6** muestra esplenocitos irradiados de ratones B10PL que servían como células presentadoras de antígeno (APC) y/o linfocitos T $CD4^+$ transgénicos (Tg) con receptor de linfocitos T (TCR) de MBP_{Ac1-11} se trataron con scFvW226 o AcM W226 y antígeno (Ag). La proliferación de linfocitos T se midió por incorporación de ^{3}[H]-timidina. Las APC y/o linfocitos T específicos de Ag se trataron con (A) un fragmento Fv monocatenario de W226 (scFv), o AcM W226 de longitud completa (B), o controles de isotipo (ISO). La localización de PrP^c con cualquiera de estas moléculas produjo la proliferación aumentada de los linfocitos T específicos de Ag.

La **figura 7** muestra una transferencia Western de un experimento de inmunoprecipitación donde puede verse la especificidad relativa de W226 contra priones de oveja, pero no priones de ratón. Las dos bandas más a la izquierda representan el material homogeneizado de oveja de entrada (N = normal; Sc = tembladera) usado para la

inmunoprecipitación, después (de izquierda a derecha) un control sin anticuerpo, y concentraciones crecientes de anticuerpo (Ac) como se representa. Las dos bandas de más a la derecha son de ratón como comparación. Se puede ver que solo concentraciones altas de W226 durante la inmunoprecipitación producen la unión débil de PrP^C de homogeneizado de ovejas normales, mientras que precipita por *pull-down* fácilmente PrP^C de homogeneizados de cerebro de ratón.

Ejemplos

Construcción, expresión y caracterización de scFvW226

El AcM W226 original se obtuvo de una línea celular de hibridoma generada después de inmunización con PrP^{Sc} de ratón purificada. Para el AcM de subtipo IgG1, se determinó que una constante de disociación monovalente (K_D) con PrP recombinante era 0,5 nM (por resonancia de plasmón de superficie [SPR]) y por inmunoprecipitación se detectó la unión tanto a PrP^C como a PrP^{Sc}.

Las cadenas ligera y pesada variables se clonaron como un scFv en el vector pET22b que contenía peIB, incluyendo un espaciador $(Gly_4Ser)_3$ (Huston et al., 1988) entre la cadena H y L, y un marcador C-terminal cmyc e His6 (véase la figura 1). La secuencia líder de peIB dirigiría la proteína al espacio periplasmático de la bacteria y generaría una proteína correctamente plegada y soluble.

En condiciones optimizadas (véase Materiales y métodos), el rendimiento de la expresión era 10 mg de proteína soluble por litro de cultivo bacteriano que posteriormente se purificaron por IMAC (NiNTA, Qiagen, Alemania) y purificación por afinidad (columna de Sepharose entrecruzada con PrP recombinante de ratón; figura 2a). El espectro de dicroísmo circular de UV lejano de scFvW22 contenía, como muchos scFv (Pledger et al., 1999), principalmente estructura β: un cálculo de la estructura secundaria dio 6% de hélice α, 45% de lámina β, 11% de giros β y 39% de estructura desplegada (Lobley et al., 2002). El scFvW226 purificado era principalmente monomérico (85%, figura 2b) y se determinó que la K_D medida por SPR con PrP recombinante de ratón era 2 nM, es decir, solo 4 veces menor que para el AcM de longitud completa (figura 2c). scFvW226 retenía la actividad de unión a la PrP recombinante de ratón después de incubación a 60ºC o en 90% de suero a 37ºC durante 72 h, indicando una alta estabilidad en condiciones fisiológicas. scFvW226 retenía las características de unión de su predecesor de longitud completa en cuanto que inmunoprecipitaba tanto la PrP^C como PrP^{Sc} de homogeneizados de cerebro (figura 2d).

Se cartografió el epítopo de scFvW226 y comprendía la secuencia de polipéptido lineal WEDRYYREN (restos 145-153) en la hélice 1 de PrP usando una biblioteca PepSpot library (Jerini Peptide Technology, Alemania).

Actividad antipriónica de scFvW226

Después, se detectó la actividad antipriónica de scFvW226. Cuando scFvW226 clonado detrás de la secuencia señal de IgGκ se transfectó para la secreción en células ScN2a, se observó un claro efecto antipriónico dependiente del tiempo (figura 3a; compárese 4 días después de transfección con 7 días después de transfección). Igualmente, cuando scFvW226 se expresó en células N2a no infectadas y el líquido sobrenadante del medio condicionado se transfirió a células ScN2a no transfectadas después de 4 días, los priones eran eliminados (figura 3a). Un scFv de control obtenido de un anticuerpo que reconocía solo una subpoblación de PrP era activo antipriónico.

Cuando las células ScN2a se trataron con scFvW226 purificado generado en E. coli, se observaron efectos de eliminación de priones con concentraciones >3,2 nM (figura 3b). Estos efectos antipriónicos eran permanentes puesto que tres semanas después de interrumpir la administración de scFvW226 no reaparecía inmunorreactividad resistente a PK correspondientes a la PrP^{Sc} (figura 3b, panel inferior). La concentración eficaz más pequeña que eliminaba priones de células ScN2a como se ve en las transferencias Western se redujo a 4 nM (figura 3c).

Cuando los lisados de células ScN2a tratadas con scFv durante 10 días o 3 semanas, se inocularon en ratones indicadores tg20, concentraciones de scFvW226 tan bajas como 10 nM demostraron que anulaban los priones de células ScN2a (tabla 1), confirmando así los resultados de las células ScN2a.

Miniaturización de scFvW226

Fragmentos más pequeños que las regiones CDR combinadas de los dominios de cadena pesada o ligera a veces muestran actividad biológica completa (Bourgeois et al., 1998; Colby et al., 2004; Jackson et al., 1999; Kim et al., 2006). Para los anticuerpos contra α-PrP, se ha mostrado que la cadena pesada del AcM 6H4 es suficiente para la actividad antipriónica in vivo (Heppner et al., 2001). La clonación y expresión de solo el dominio variable de la cadena pesada de scFvW226 que contenía las tres CDR en E. coli, y la administración a células ScN2a no consiguió eliminar los priones en concentraciones donde el scFvW226 entero lo haría (figura 4a). Cuando cada una de las CDR se expresó como proteínas marcadas con cmyc e His, recombinantes, en E. coli, la tercera CDR del dominio de la cadena pesada (CDR3H), así como la cadena ligera, presentaron unión débil a PrP recombinante de ratón por un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas.

Tabla 1

Bioensayos de células ScN2a tratadas en ratones tg20

Construcción	número de células ScN2a (x10^5)	dosis del fragmento [nM]	tiempo de tratamiento [días]	número de enfermos n/n_0	tiempo de incubación [días]
PBS	0,8	-	10	5/5	130 ± 20
scW226	0,8	10	10	0/5	
scW226	0,8	30	10	0/5	
scFvW226	0,8	100	10	0/5	
scFvW226	0,8	300	10	0/5	
PBS	2,8	-	21 d	5/5	75 ± 2
scFvW226	2,8	300	21 d	0/5	
W226-Hc	2,8	300	21 d	5/5	78 ± 3

Células ScN2a se trataron con scFv en diferentes concentraciones y durante diferentes tiempos; incluso en la concentración más baja (10 nM) scFvW226 eliminó los priones completamente. El tratamiento con PBS (control) o el tratamiento con W226-Hc 320 nM no eliminaron los priones.

La CDR3H es la región más variable entre todas las CDR (Shirai et al., 1996). En muchos anticuerpos, se ha mostrado que esta región sola presenta unión débil al epítopo (Feng et al., 1998; Heap et al., 2005; Monnet et al., 1999). Cuando la cadena pesada de la CDR3 (CDR3H) se expresó en E. coli con un marcador cmyc e His_6 o se sintetizó sin los marcadores, y se administró a células ScN2a, no presentó actividad antipriónica (figura 4a).

Un péptido (D-) retro-invertido de CDR3H es antipriónico activo

Los péptidos D retro-invertidos análogos de los correspondientes péptidos L son péptidos D ("invertido") en el orden de secuencia al revés ("retro"), que intentan imitar la topología de las cadenas laterales del péptido L a la vez que tiene una cadena principal diferente con resistencia a la proteolisis por L-proteasas in vivo. La unión de estos péptidos al antígeno se predice que ocurre solo cuando la mayoría de las interacciones de unión derivan de interacciones de las cadenas laterales en lugar de implicar interacciones de la cadena principal del polipéptido. Los péptidos D ofrecen ventajas frente a los péptidos L en cuanto que tienen una semivida notablemente aumentada in vivo (Briand et al., 1995; Guichard et al., 1994; Levi et al., 2000). Sorprendentemente, la (D-)riCDR3H presentaba actividad antipriónica en concentraciones 4 µM donde CDR3H no tenía actividad (figura 4a). Los intentos de medir diferentes afinidades de los péptidos por la PrP por SPR estaban limitados debido al pequeño tamaño molecular de los péptidos; se ha calculado que las K_D de ambos péptidos está en el intervalo de 1 - 10 µM, y no se podían observar grandes diferencias en la unión del péptido L y D.

Para caracterizar mejor las diferencias que se asociarían con la actividad antipriónica diferencial de (D-)riCDR3H en oposición a CDR3H, se han llevado a cabo tinciones de inmunofluorescencia de células vivas ScN2a con riCDR3H y CDR3H marcadas con TAMRA (figura 5). Mientras que riCDR3H presentaba tinción en toda la célula, CDR3H solo teñía compartimentos intracelulares, probablemente después de su endocitosis. scFvW226 podían competir con ambas tinciones indicando que tanto riCDR3H como CDR3H se unían a los mismos antígenos, es decir, PrP. Como se esperaba, solo la CDR3H podía ser digerida por tripsina (figura 5). Estos descubrimientos indicaban que la actividad antipriónica diferencial de riCDR3H probablemente se debía a diferentes características in vivo que incluían el tiempo de semivida y la localización subcelular.

CDR3H y (D-)riCDR3H son ligandos específicos de conformación para PrP^{Sc}

Para investigar si los péptidos de la CDR habían mantenido las características de unión a PrP, se llevaron a cabo experimentos de precipitación *pull-down* con péptidos inmovilizados en Sepharose, de homogeneizados de cerebro de ratones normales e infectados con RML. Sorprendentemente, la CDR3H y (D-)riCDR3H precipitaron por *pull-down* solo PrP de homogeneizados infectados de tembladera que después de digestión con PK pusieron de manifiesto resistencia parcial a proteasa, indicando que este confórmero era PrP^{Sc} (figura 4c). Por lo tanto, comparado con scFvW226, los péptidos CDR3H cambiaban la especificidad de unión y la unión específica de conformación adquirida a PrP^{Sc}, y esta unión parecía mediada por cadena lateral puesto que tanto CDR3H como (D-)riCDR3H se unían a PrP^{Sc}, aunque el péptido L un poco más fuerte (figura 4c). La especificidad de conformación de CDR3H y (D-)riCDR3H por PrP^{Sc} podía explicar las dificultados de determinación de las K_D con PrP recombinante de ratón que se cree que se parece a PrP^{C} más que a PrP^{Sc}.

Uso de scFvW226 o sus derivados para la detección específica de cepa de priones

En la figura 7 se muestra que no todos los priones (PrP^{Sc}) son reconocidos igualmente bien por el ligando W226. Esta característica ahora se puede usar para distinguir cepas. Por ejemplo, usando W226, la tembladera de las ovejas clásica tradicional se puede distinguir de la tembladera EEB, es decir, priones que provienen de ganado infectado con priones y transmitidos a las ovejas. Estos priones son particularmente peligrosos para los seres humanos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden mutar en restos de aminoácidos individuales para aumentar el reconocimiento específico de cepa.

Uso de scFvW226 o sus derivados para el diseño y construcción de proteínas de fusión con diagnósticos y actividad terapéutica mejorados

Usando la PrP^{Sc} y scFvW226 que reconoce PrP^{Sc} o la CDR3H específica de PrP^{Sc}, se pueden hacer proteínas de fusión que facilitan el diagnóstico: se puede fusionar de forma recombinante peroxidasa de rábano picante con el gen de estos fragmentos de anticuerpo, y usarlos para detectar priones enzimáticamente en una reacción de una etapa. Igualmente, estos fragmentos de anticuerpo se pueden fusionar con la proteína fluorescente potenciada (EFP) o luciferasa para unir directamente un marcador. También puede ser ventajoso añadir secuencias señal adicionales a estos fragmentos de anticuerpo, que permiten el paso mejorado a través de la barrera hematoencefálica y/o la llegada a estructuras particulares del SNC. También es posible añadir secuencias señal o secuencias de transducción de células que permiten que el fragmento de anticuerpo recombinante llegue a compartimentos celulares definidos. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden combinar de forma recombinante entre sí para dar fragmentos de anticuerpo de tamaño variable capaces de unirse a PrP en múltiples sitios. Esto puede conducir a una disociación reducida del fragmento de anticuerpo de la PrP debido a la avidez aumentada. Estas construcciones pueden ser particularmente útiles para experimentos de inmunización. También se pueden combinar fragmentos de anticuerpo derivados de scFvW226 con otros anticuerpos recombinantes o ligandos proteínas por construcción de las respectivas proteínas de fusión; esto puede ser ventajoso puesto que combinan características de biodisponibilidad de ambos fragmentos.

Anticuerpos anti-idotípicos contra PrP que se une a scFvW226 (CDR3H)

Se cartografiaron los epítopos del AcM W226 de longitud completa y scFvW226 contra la hélice 1 de la proteína priónica (restos WEDRYYREN). Puesto que se sabe que la hélice 1 es un sitio de interacción en el complejo de PrP^{C} / PrP^{Sc} (Solforosi et al., 2007), se usó el dominio de unión a PrP mínimo dentro de scFvW226, la región determinante de la complementariedad (CDR) 3 de la cadena pesada (CDR3H) en un experimento de inmunización con el fin de generar anticuerpos anti-idiotípicos contra PrP. Estos anticuerpos anti-CDR3H finalmente deberían parecerse al dominio de hélice 1 de PrP y por lo tanto poder unirse a PrP.

Se inmunizaron ratones 129 SvEv no modificados genéticamente con CDR3H expresada o riCDR3H sintetizada entrecruzada con KLH con adyuvante Linaris (en ambos casos un total de 3 dosis de recuerdo a lo largo de 10 semanas) y se generó el hibridoma en sus bazos por métodos convencionales. Para el ratón inmunizado con CDR3H, se generaron 28 hibridomas que segregaban anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocían tanto el inmunógeno como la PrP de ratón; se generaron 8 clones que sólo reconocían el inmunógeno. Los AcM anti-PrP tenían diferentes características en cuanto que por inmunoprecipitación reconocían PrP^{C} y PrP^{Sc}, solo PrP^{C} o solo PrP^{Sc}. Un clon de esta fusión es el AcM 7A7. Este anticuerpo podía inmunoprecipitar específicamente PrP^{Sc}.

Este nuevo método de generación de AcM anti-PrP supera el estado de la técnica anterior y el concepto previo de que era imposible una respuesta inmunitaria eficaz contra la PrP en animales no modificados genéticamente debido a la autotolerancia. Por lo tanto, la presente invención comprende la inmunización con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un dominio de interacción de la PrP y el uso del mismo como un inmunógeno para superar la autotolerancia a este antígeno.

La inmunización de un ratón con riCDR3H entrecruzado con hemocianina de lapa californiana (KLH) por un protocolo similar al descrito antes y la fusión en el bazo para generar hibridoma por métodos convencionales, dio como resultado igualmente anticuerpos anti-PrP de especificidades de conformación diferenciales. Por lo tanto, riCDR3H puede superar la autotolerancia de la respuesta inmunitaria humoral contra PrP.

Con el fin de demostrar que esta estrategia de inmunización podría usarse para proteger frente a la infección priónica, 5 ratones CD1 se inmunizaron 4 veces en intervalos de 2 semanas con péptido CDR3H producido y purificado de E. coli, con las dos primeras inmunizaciones usando adyuvante ABM-ZK (Linaris, Alemania) y las dos últimas de recuerdo con ABM-N (Linaris, Alemania) como adyuvante. Después se inoculó a estos 5 ratones así como a 5 controles no inmunizados por vía intraperitoneal, una dilución 10-4 de homogeneizado al 10% verificado de cerebro de ratón terminalmente enfermo infectado con tembladera (RML) en PBS (20 µl/ratón). Los ratones de control murieron con un tiempo de incubación medio de 195 días. De los ratones inmunizados, un ratón sobrevivió (> 10 meses), mientras que los otros cuatro murieron con un tiempo de incubación medio de 205 días. Por lo tanto, la CDR3H pude proteger de la enfermedad priónica. Estos procedimientos de inmunización se pueden mejorar más proporcionando inmunógenos donde se clonan varios fragmentos de CDR3H uno detrás de otro produciendo sitios idénticos dobles, triples o múltiples del inmunógeno en una proteína. Estas estructuras repetitivas pueden ser particularmente bien reconocidas por la maquinaria de procesamiento inmunitario y conducir a respuesta inmunitaria anti-PrP aumentada. Igualmente, la riCDR3H se puede entrecruzar químicamente con una estructura de armazón de péptido D para producir un péptido antigénico múltiple (MAP). Este MAP representa igualmente una estructura repetitiva que favorece una fuerte respuesta inmunitaria anti-PrP.

Actividad antipriónica de scFvW226 en ratones infectados con priones

Con el fin de demostrar los efectos terapéuticos de una estrategia de inmunización pasiva con scFvW226 contra la enfermedad priónica en curso, se creó un experimento donde se inoculó en ratones C57/B6 por vía intraperitoneal

una dilución 10-3 de un homogeneizado al 10% verificado de cerebro de ratón terminalmente enfermo infectado con tembladera (RML) en PBS (20 µl/ratón). 30 días después de la inoculación, se inició el tratamiento intraperitoneal con AcM W226 purificado de longitud entera o scFvW226. Nueve controles no se trataron y 5 ratones se trataron con 2 mg de AcM W226/ratón o 1 mg de scFvW226/ratón dos veces por semana durante un tiempo ilimitado. Hubo una pérdida de peso constante en los ratones de control antes de la enfermedad de la tembladera, mientras que ninguno de los ratones tratados experimentó ninguna pérdida de peso. Hubo un efecto significativo de aumento de tiempo de supervivencia por administración de scFvW226 o el anticuerpo de longitud entera. El experimento demostraba que scFvW226 (o AcM W226) podían prevenir la enfermedad priónica cuando se administraba después de inoculación.

Efecto inmunoestimulador de AcM W226 y scFvW226

Para investigar si scFvW226 o el AcM W226 de longitud entera tenían efectos en la respuesta inmunitaria de linfocitos T, se aislaron linfocitos T de un ratón transgénico que expresaba el receptor de linfocitos T específico para la proteína básica de mielina (MBP). Estos linfocitos T proliferarían específicamente tras encontrar el antígeno MBP 1-11, un péptido que comprende los primeros 11 restos N-terminales de la MBP. Se podía demostrar que la adición de scFvW226 (A.) o AcM W226 (B.) aumentaba la proliferación de linfocitos T en presencia de MBP 1-11, indicando que scFvW226 o AcM W226 tienen efectos inmunoestimuladores.

Por lo tanto, la potencial aplicación de scFvW226 o sus derivados también es contrarrestar las afecciones inmunosuprimidas como la anemia aplásica, leucemias, o VIH/SIDA, u otras, o como inmunoadyuvante cuando la respuesta inmunitaria en los individuos está debilitada, por ejemplo en pacientes mayores que reciben inmunizaciones activas.

Tabla 2

Mutagénesis de CDR3H

Nº	Péptido	Secuencia	Especificidad	Afinidad
1.	LH3	YFCARWNWERDAMDYWG	PrP^{Sc}	0
2.	LH3A3	YFAARWNWERDAMDYWG	PrP^{Sc}	
3.	LH3A5	YFCAAWNWERDAMDYWG	PrP^{Sc}	
4.	LH3A6	YFCARANWERDAMDYWG	PrP^{Sc}	
5.	LH3A7	YFCARWAWERDAMDYWG	PrP^{Sc}	(+)
6.	LH3A8	YFCARWNAERDAMDYWG	PrP^{Sc}	
7.	LH3A9	YFCARWNWARDAMDYWG	PrP^{Sc}	
8.	LH3A10	YFCARWNWEADAMDYWG	PrP^{C}	
9.	LH3A11	YFCARWNWERAAMDYWG	PrP^{Sc}	
10.	LH3A13	YFCARWNWERDAADYWG	PrP^{Sc}	+
11.	LH3A14	YFCARWNWERDAMAYWG	PrP^{Sc}	(+)
12.	LH3A15	YFCARWNWERDAMDAWG	PrP^{Sc}	
13.	LH3D5	YFCADWNWERDAMDYWG	PrP^{Sc}	(-)
14.	LH3R9	YFCARWNWRRDAMDYWG	PrP^{Sc}	(+)
15.	LH3D10	YFCARWNWEDDAMDYWG	PrP^{Sc}	(+)
16.	LH3R11	YFCARWNWERRAMDYWG	PrP^{Sc}	+
17.	LH3R14	YFCARWNWERDAMRYWG	PrP^{Sc}	

En los péptidos, para cada resto posterior, el aminoácido se sustituyó por una alanina, que se cree que anula las interacciones de cadenas laterales pero mantiene las estructuras secundarias (nº 1-12). La evaluación se hizo comparando la especificidad y afinidad para la precipitación *pull-down* de PrPSc con la del péptido LH3 (CDR3H).

Mutagénesis de CDR3H

La tabla 2 muestra un experimento de mutagénesis de péptidos derivados de la SEQ ID NO: 1 (CDR3H, denominada aquí LH3). En los péptidos derivados, para cada resto posterior, el aminoácido se sustituyó por alanina (nº 1-12), que se cree que anula las interacciones de cadenas laterales pero mantiene las estructuras secundarias. También se llevaron a cabo sustituciones adicionales como se muestra en la tabla 2 (nº 13-17). La evaluación se hizo comparando la especificidad y afinidad para la precipitación *pull-down* de PrP^{Sc} con la del péptido LH3 (CDR3H, SEQ ID NO: 1). Hay tres resultados notables que sirven para estrechar más la función de las cadenas laterales del péptido LH3 en la especificidad de PrP^{Sc} (prion-):

1. Mutagénesis de R10 a A10 (nº 8: LH3A10, SEQ ID NO: 13) anula la especificidad de PrP^{Sc}: este péptido se une a PrP^{c}.

2. Los dos cambios M13A (nº 10: LH3A13, SEQ ID NO: 11) y D11R (nº 16: LH3R11, SEQ ID NO: 12) aumentan la afinidad por PrP^{Sc}.

3. Los cambios en los restos N7A (nº 5: LH3A7), D14A (nº 11: LH3A14), E9R (nº 14: LH3R9), R10D (nº 15: LH3D10) aumentan ligeramente la afinidad por PrP^{Sc} mientras que el cambio R5D (nº 13: LH3D5) disminuye ligeramente la

afinidad por PrP^{Sc}.

Materiales y métodos de ejemplo

Construcciones

El hibridoma W226 que segrega el AcM IgG1 y reconoce tanto PrP^{C} como PrP^{Sc} se ha generado por procedimiento de fusión convencional de células de mieloma con esplenocitos de un ratón con inactivación génica de PrP (Büeler et al., 1992) inmunizado con PrP^{Sc} de ratón purificada. Para preparar una construcción de Fv monocatenario (scFv), se usó ARNm purificado de hibridoma W226 para la amplificación por PCR con el siguiente conjunto de cebadores: 5'-AAAACCATGGCGGAGGTCCAGCTGCAGCAGTC-3' (directo de V_H) y 5'-TGCCGGCCAGTGGATAGTCAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC-3' (inverso de V_H) o 5'-AAAGGATCCGACATTGTGATGACCCAGTCT-3' (directo de V_L) y 5'-AAAAGCGGCCGCGGATACAGTTGGTGCAGCATC-3' (inverso de V_L). Los productos de la PCR se digirieron con NgoMIV (V_H) o BamHI (V_L) y se ligaron al sitio NgoMIV y BamHI de un oligonucleótido conector que codifica un dominio conector $(Gly_4Ser)_3$ (Huston et al., 1988). Se eluyó un fragmento de 800 pb que correspondía al producto de ligado correcto, de un gel de agarosa y se amplificó usando el cebador directo de V_H o inverso de V_L. El producto se cortó con NcoI y EagI y se ligó en el vector de expresión procariota pET22b (Novagen), permitiendo la expresión con una secuencia líder pelB N-terminal y un marcador His_6 C-terminal (véase la figura 1). Además se clonó un marcador c-myc en los sitios EagI/XhoI entre el scFv y el marcador His_6. Para la construcción de solo el dominio de la cadena pesada (W226-Hc), se amplificó V_H con los cebadores adecuados permitiendo la clonación por NcoI y EagI en pET22b-Myc/His_6. Para la expresión eucariota de scFvW226, el ADNc de scFvW226 combinado se amplificó con un cebador 5' que incluía una secuencia líder IgG_κ (Donofrio et al., 2005) y se ligó por HindIII/EcoRI (W226) en pCDNA3.1 (Invitrogen).

Péptidos

La CDR3H que corresponde a la secuencia NH2-YFCARWNWERDAMDYWG-COOH (código de aminoácidos de una letra, SEQ ID NO: 1) y el péptido D retro-invertido [(D-)riCDR3H] que corresponde a la secuencia NH2-gwydmadrewnwracfy-COOH (código de aminoácidos de una letra, convenio de minúsculas para péptidos D, SEQ ID NO: 2) se sintetizaron sin marcar o unidos por el N terminal a 6-carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA) por JPT Peptide Technology (Berlin, Alemania).

Expresión y purificación de proteínas

La expresión de scFvW226 o W226-Hc se indujo en bacterias Rosetta BL21 (λDE3) (EMD, Novagen Brand, Madison, WI): las bacterias se desarrollaron a 37ºC hasta alta densidad (DO_{600} >2,0) en un fermentador de 2 litros (MoBiTec, Gottingen, Alemania) y se enfriaron sobre hielo antes de la inducción con IPTG 0,5 mM a 15ºC durante la noche. Los sedimentos celulares se lisaron en Tris 20 mM a pH 8,0, T-X100 al 1%, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, $MgCl_2$ 20 mM, PMSF 1 mM, lisozima 1 mg/ml y DNasa 500 U. Los lisados se clarificaron por centrifugación y la proteína soluble en el líquido sobrenadante se purificó mediante columnas Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania). Después de la carga, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) de Tris 20 mM a pH 8,0, NaCl 500 mM, T-X100 al 1%, imidazol 5 mM, 10 VC de Tris 20 mM a pH 8,0, NaCl 500 mM, TX-100 al 1%, imidazol 20 mM y 10 VC de Tris 20 mM a pH 8,0, NaCl 1000 mM, imidazol 5 mM. Las proteínas unidas se eluyeron con Tris 20 mM a pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, dando una pureza de aproximadamente 60% para scFvW226 y 90% para W226-Hc. El scFvW226 eluído se purificó más hasta >95% de pureza por cromatografía de afinidad usando PrP recombinante de ratón (Korth et al., 1999) acoplada a NHS-Sepharose (Amersham) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. De la columna de afinidad, scFvW226 se eluyó con glicina 100 mM a pH 2,5 y se neutralizó inmediatamente con Tris 100 mM a pH 8,8. Finalmente, los fragmentos de anticuerpo purificados se dializaron dos veces contra PBS. Se midió la masa de scFvW226 por espectrometría de masas y se encontró que era idéntica a la calculada.

Experimentos de precipitación *pull-down*

scFvW226, W226-Hc, riCDR3H y CDR3H se acoplaron a NHS-Sepharose. Homogeneizados de cerebro de ratón al 10% preparados a partir de ratones C57BL/6 o C57BL/6 infectados con RML (Chandler, 1961) se diluyeron 1:10 en Tris HCl 20 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, sarcosilo al 0,3% y se preclarificaron por centrifugación durante 15 min a 22.000 x g. Se incubó 1 ml de los mismos con 20 µl de perlas cargadas a 4ºC durante la noche. En un experimento de control positivo, se usaron 5 µg de PrP recombinante de ratón en el mismo tampón. Después de incubación, las perlas se lavaron dos veces en tampón IP1 (Tris 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, DOC 0,5%), tampón IP2 (Tris 50 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM, NP40 al 0,1%, DOC al 0,05%) y tampón IP3 (Tris 50 mM a pH 7,5, NP40 al 0,1%, DOC al 0,05%). Cuando era necesario, las perlas también se incubaron con 4 µg de Proteinasa K (Merck, Darmstadt, Alemania) en 20 µl de tampón IP3 antes de elución de la PrP unida con 2 x tampón de carga a 95ºC. Los eluatos se separaron en gel de Tris HCl al 4%-20% (Biorad, EE.UU.) y la PrP se detectó por transferencia Western usando el AcM W226.

Análisis de dicroísmo circular (CD)

Se registraron los espectros de CD de UV lejano (195-250 nm) usando un espectrómetro Jasco J-810. Condiciones de la muestra: proteína 3 µM en $NaPO_4$ 20 mM a pH 7,5, EDTA 0,2 mM a temperatura ambiente (cubeta de 2 mm). Condiciones de barrido: velocidad de barrido 20 nm/min, sensibilidad100 mdeg, paso 0,2 nm, ancho de banda 1 nm, tiempo de respuesta 2 s, 40 acumulaciones.

Fraccionamiento con campo de flujo asimétrico (aFFF)

Sistema: Eclipse 2 equipado con HELEOS, Optilab Rex (Wyatt Technologies, EE.UU.) y un detector de longitud de onda múltiple (Agilent, EE.UU.). Programas de ordenador: Eclipse 2.5 y Astra 5.3.1.4. Condiciones: el scFvW226 se separó en Tris-HCl 10 mM a pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM con un flujo de canal de 1 ml/min; usando un espaciador de 490 µm y una membrana de celulosa con corte de exclusión de peso molecular de 5 kDa. Esquema de flujo: inyección de muestra (50 µl/75 µg) → enfoque (2 min, flujo transversal 3 ml/min (V_x)) → 1ª fase de elución (20 min, V_x lineal 2 ml/min) → 2ª fase (5 min gradiente de V_x 2,0-0,15 ml/min) → 3ª fase (5 min V_x desconectado).

Análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR)

Las cinéticas de unión se determinaron en un Biacore 1000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se diluyó PrP recombinante de ratón (1 µM) en NaOAc 10 mM pH 4,5 y se inmovilizó en chip CM5 activado con EDC/NHS Biacore) con 5 µl/min. Después de inmovilización y bloqueo con etanolamina, el chip se lavó con NaOH 50 mM hasta obtenerse una señal estable. La densidad de superficie final eran aproximadamente 2000 UR. Todos los análisis de SPR cinéticos se llevaron a cabo con un flujo de PBS de 5 µl/min y se inyectaron fragmentos de anticuerpo en diferentes concentraciones en el intervalo de x a y nM. La asociación y disociación se registraron durante 180 s respectivamente. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró con a x s pulsos de NaOH 50 mM. Los datos cinéticos se calcularon usando el programa de ordenador BIAevaluation 4.1 según un modelo de unión 1:1 (Langmuir).

Ensayo de inhibición de PrP^{Sc}

Inhibición por fragmentos de anticuerpo purificados

Células ScN2a (Bosque y Prusiner, 2000; Butler et al., 1988) se desarrollaron en MEM, complementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y FCS al 10%. Para el tratamiento, las células ScN2a se sembraron en placas de 60 mm y se incubaron con fragmentos de anticuerpo durante 7 días. Después de 3 días, se cambió el medio/fragmentos de anticuerpo. Las células se lisaron en 500 µl de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, T-X100 al 0,5%, DOC al 0,5%) y se trataron cantidades iguales de lisatos con proteinasa K (20 µg/ml) durante 30 min a 37ºC. Después de detener la digestión con proteasa con PMSF 100 µM, la PrP^{Sc} en 400 µl de tampón de lisis se sedimentó a 100.000 x g en un rotor TLA-55 una ultracentrífuga Optima (BeckmanCoulter, EE.UU.). La PrP^{Sc} se detectó después de separación en un gel de Tri-HCl al 4% - 20% (Biorad, EE.UU.) por transferencia Western usando AcM W226.

Inhibición de fragmentos de anticuerpos expresados en células

Células ScN2a se dividieron en placas de 60 mm el día antes de la transfección para obtener una confluencia de 50% y se transfectaron 1,3 µg de plásmido pcDNA que codificaba scFvW226 o scFv de control con HiPerfect (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 4 días, las células se lisaron y se analizó la PrP^{Sc} como se ha descrito antes, o se transfirieron a una placa de 100 mm y se incubaron durante 3 días adicionales antes de la lisis. Además, células N2a no infectadas se transfectaron de la forma descrita, y después de 4 días, se transfirió medio condicionado a las células ScN2a recién sembradas, que posteriormente se incubaron durante otros 4 días.

Bioensayo

Se llevaron a cabo dos experimentos de tratamiento separados para determinar la presencia de priones después del tratamiento con scFvW226 o AcM W226 de longitud entera por inoculación en ratones tg20 (Fischer et al., 1996): las células ScN2a se desarrollaron en placas de 60 mm y se trataron con 10 nM, 30 nM, 100 nM o 300 nM durante 10 días con dos divisiones y renovaciones de scFvW226. En un segundo experimento, las células ScN2a se desarrollaron en placas de 60 mm y se trataron con W226-scFv o W226-Hc 320 nM. Después de 3 semanas de tratamiento, incluyendo dos pasos, las células se recogieron mediante raspado, se lavaron en PBS, se contaron y se volvieron a suspender en 100 µl de PBS, seguido de 5 ciclos de congelación/descongelación. Para ambos experimentos, se inyectaron 20 µl de lisatos correspondientes a 0,8 o 2,8x10e5 células, vía i.c. en 5 ratones tg20 para cada condición de tratamiento.

Tinción inmunofluorescente de células ScN2a

Células ScN2a vivas se lavaron con PBS y, en una de las condiciones, se preincubaron con medio que contenía scFvW226 100 µM durante 30 min a t.a. Posteriormente, se añadió riCDR3H o CDR3H marcada con TAMRA 1 µM

digerida con tripsina o no digerida. La digestión con tripsina se llevó a cabo con 100 µg de tripsina durante 3 h a 37ºC. Después de incubación con péptidos marcados durante 3 h, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se lavaron tres veces con PBS antes de inspección.

La proteína priónica, PrP, existe en varias conformaciones estables, con preferencia de una conformación, PrP^{Sc}, asociada a enfermedades neurodegenerativas transmisibles. La localización de PrP por ligandos de alta afinidad ha probados ser una forma eficaz de prevenir infecciones priónicas periféricas. Aquí, se han generado fragmentos monocatenarios recombinantes de los dominios variables (scFv) de un anticuerpo monoclinal en E. coli, originalmente generados contra PrP^{Sc} purificada y que reconocen tanto PrP^{C} como PrP^{Sc}. Este fragmento scFv tenía una constante de disociación (K_D) con la PrP recombinante de 2 nM y eliminaba priones en células ScN2a en concentración 4 nM, como se demostró por bioensayo. La expresión recombinante de solo su región determinante de la complementariedad 3 de la cadena pesada (CDR3H) conducía al reconocimiento específico de conformación de solo PrP^{Sc} en solución, sin embargo, se perdía la actividad antipriónica. La síntesis del péptido D retro-invertido de CDR3H reintegraba la actividad antipriónica. Por lo tanto, 1. scFvW226 es hasta ahora el polipéptido más pequeño con actividad antipriónica probada por bioensayo, y 2. la especificidad de conformación diferencial se puede regular orquestando la participación de diferentes CDR.

Experimentos de mutagénesis

Se sintetizaron péptidos en JPT Peptides (Berlin, Alemania) con >70% de pureza y se purificaron por HPLC. Los péptidos se acoplaron a NHS-Sepharose por su amina libre N-terminal y se usaron en un experimento de precipitación *pull-down* como se ha descrito antes. Después se llevó a cabo la evaluación comparando la especificidad y afinidad por la precipitación *pull-down* de PrPSc con el péptido CDR3H (denominado también LH3). Los resultados de esta investigación se citan en la tabla 2.

Referencias

Bard F., Cannon C., Barbour R., Burke R. L., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D. y Yednock T. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. Nat. Med. 6, 916-9.

Bosque P. J. y Prusiner S. B. (2000) Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. J. Virol. 74, 4377-4386.

Bourgeois C., Bour J. B., Aho L. S. y Pothier P. (1998) Prophylactic administration of a complementarity-determining region derived from a neutralizing monoclonal antibody is effective against respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice. J. Virol. 72, 807-10.

Briand J. P., Guichard G., Dumortier H. y Muller S. (1995) Retro-inverso peptidomimetics as new immunological probes. Validation and application to the detection of antibodies in rheumatic diseases. J. Biol. Chem. 270, 20686-91.

Bueler H., Fisher M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.-P., DeArmond S. J., Prusiner S. B., Aguet M. y Weissmann C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature 356, 577-582.

Butler D. A., Scott M. R. D., Bockman J. M., Borchelt D. R., Taraboulos A, Hsiao K. K., Kingsbury D. T. y Prusiner S. B. (1988) Scapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. J. Virol. 62, 1558-1564.

Chandler R. L. (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. Lancet 1, 1378-9.

Colby D. W., Garg P., Holden T., Chao G., Webster J. M., Messer A., Ingram V. M. y Wittrup K. D. (2004) Development of a human light chain variable domain (V(L)) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. J. Mol. Biol. 342, 901-12.

Donofrio G., Heppner F. L., Polymenidou M., Musahl C. y Aguzzi A, (2005) Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. J. Virol. 79, 8330-8.

Feng Y., Chung D., Garrard L., McEnroe G., Lim D., Scardina J., McFadden K., Guzzetta A., Lam A., Abraham J., Liu D. y Endemann G. (1998) Peptides derived from the complementarity-determining regions of anti-Mac-1 antibodies block intercellular adhesion molecule-1 interaction with Mac-1. J. Biol. Chem. 273, 5625-30.

Fischer M., Rülicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S., Aguzzi A. y Weissmann C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. EMBO J. 15, 1255-1264.

Goodrich J. A. y Kugel J. F. (2006) Binding and Kinetics for Molecular Biologists. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Guichard G., Benkirane N., Zeder-Lutz G., van Regenmbrtel M: H., Briand J. P. y Muller S. (1994) Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso-peptidomimetics. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 91, 9765-9.

Heap C. J., Wang Y., Pinheiro T. J., Reading S. A., Jennings K. R. y Dimmock N. J. (2005) Analysis of a 17-amino acid residue, virus-neutralizing microantibody. J. Gen. Virol. 86, 1791-800.

Heppner F. L., Musahl C., Arrighi I., Klein M. A., Rulicke T., Oesch B., Zinkernagel R. M., Kalinke U. y Aguzzi A. (2001) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. Science 294, 178-82.

Huston J. S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M. S., Novotny J., Margolies M. N., Ridge R. J., Bruccoleri R. E., Haber E., Crea R. y et al. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-83.

Jackson N. A., Levi M., Wahren B. y Dimmock N. J. (1999) Properties and mechanism of action of a 17 amino acid, V3 loop-specific microantibody that binds to and neutralizes human immunodeficiency virus type 1 virions. J. Gen. Virol. 80 (Pt 1), 225-36.

Kayed R., Head E., Thompson J. L., McIntire T. M., Milton S. C., Cotman C. W. y Glabe C. G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science 300, 486-9.

Kim Y. R., Kim J. S., Lee S. H., Lee W. R., Sohn J. N., Chung Y. C., Shim H. K., Lee S. C., Kwon M. H. y Kim Y. S. (2006) Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. J. Biol. Chem. 281, 15287-95.

Korth C., Stierli B., Streit P., Moser M., Schaller O., Fischer R., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H., Raeber A., Braun U., Ehrensperger F., Hornemann S., Glockshuber R., Riek R., Billeter M., Wuthrick K. y Oesch B. (1997) Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature 389, 74-77.

Korth C., Streit P. y Oesch B. (1999) Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein. Methods Enzymol. 309, 102-112.

Kuhn F., Purro M., Schmid J., Roller M., Lohmann C., Oesch B. y Raeber A. (2005) Detection of PrPSc by FACS using the prion specific antibody 15B3. In Prion 2005. Between fundamentals and society's needs., p. 193, Duesseldorf.

Lau A. L., Yam A. Y., Michelitsch M. M., Wang X., Gao C., Goodson R. J., Shimizu R., Timoteo G., Hall J., Medina-Selby A., Coit D., McCoin C., Phelps B., Wu P., Hu C., Chien D. y Peretz D. (2007) Characterization of prion protein (PrP)-derived peptides that discriminate full-length PrPSc from PrPC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 11551-6.

Leliveld S. R. y Korth C. (2007) The use of conformation-specific ligands and assays to dissect the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases. J. Neurosci. Res. 85, 2285-97.

Lesne S., Koh M. T., Kotilinek L., Kayed R., Glabe C. G., Yang A., Gallagher M. y Ashe K. H. (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. Nature 440, 352-7.

Levi M., Hinkula J. y Wahren B. (2000) A retro-inverso miniantibody with anti-HIV activity. AIDS Res. Hum. Retroviruses 16, 59-65.

Lobley A., Whitmore L. y Wallace B. A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. Bioinformatics 18, 211-2.

Luibl V., Isas J. M., Kayed R., Glabe C. G., Langen R. y Chen J. (2006) Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. J. Clin. Invest. 116, 378-85.

Monnet C., Laune D., Laroche-Traineau J., Biard-Piechaczyk M., Briant L., Bes C., Pugniere M., Mani J. C., Pau B., Cerutti M., Devauchelle G., Devaux C., Granier C. y Chardes T. (1999) Synthetic peptides derived from the variable regions of an anti-CD4 monoclonal antibody bind to CD4 and inhibit HIV-1 promoter activation in virus-infected cells. J. Biol. Chem. 274, 3789-96.

Moroncini G., Kanu N., Solforosi L., Abalos G., Telling G. C., Head M., Ironside J., Brockes J. P., Burton D. R. y Williamson R. A. (2004) Motif-grafted antibodies containing the replicative interface of cellular PrP are specific for PrPSc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 10404-9.

Nazor K. E., Kuhn F., Seward T., Green M., Zwald D., Purro M., Schmid J., Biffiger K., Power A. M., Oesch B., Raeber A. J. y Telling G. C. (2005) Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. EMBO J. 24, 2472-80.

Norstrom E. M. y Mastrianni J. A. (2006) The charge structure of helix 1 in the prion protein regulates conversion to

pathogenic PrPSc. J. Virol. 80, 8521-9.

Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. y Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci. 4, 2411-23.

Paramithiotis E., Pinard M., Lawton T., LaBoissiere S., Leathers V. L., Zou W. Q., Estey L. A., Lamontagne J., Lehto M. T., Kondejewski L. H., Francoeur G. P., Papadopoulos M., Haghighat A., Spatz S. J., Head M., Will R., Ironside J., O'Rourke K., Tonelli Q., Ledebur H. C., Chakrabartty A. y Cashman N. R. (2003) A prion protein epitope selective for the pathologically misfotded conformation. Nat. Med. 9, 893-9.

Peretz D., Williamson R. A., Kaneko K., Vergara J., Leclerc. E., Schmitt-Ulms G., Mehlhorn I. R., Legname G., Wormald M. R., Rudd P. M., Dwek R. A., Burton D. R. y Prusiner S. B. (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature 412, 739-743.

Pledger D. W., Brodnicki T. C., Graham B. L., Tetin S., Kranz D. M. y Linthicum D. S. (1999) Construction and characterization of two anti-sweetener single chain antibodies using radioligand binding, fluorescence and circular dichroism spectroscope. J. Mol. Recognit. 12, 258-66.

Prusiner S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216, 136-144.

Prusiner S. B. (1998) Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13363-13383.

Prusiner S. B. (2001) Shattuck Lecture -- Neurodegenerative diseases and prions. N. Engl. J. Med. 344, 1516-1526.

Safar J., Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen F. E. y Prusiner S. B. (1998) Eight prion strains have PrPSc molecules with different conformations. Nat. Med. 4, 1157-1165.

Safar J. G., Kellings K., Serban A., Groth D., Cleaver J. E., Prusiner S. B. y Riesner D. (2005) Search for a prion-specific nucleic acid. Journal of virology 79, 10796-806.

Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandevert C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D. y Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature 400, 173-177.

Shirai H., Kidera A. and Nakamura H. (1996) Structural classification of CDR-H3 in antibodies. FEBS Lett 399, 1-8.

Solforosi et al. (2007) Journal of Biological Chemistry 282, 7465-71

Taylor J. P., Hardy J. y Fischbeck, K. H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. Science 296, 1991-5.

White A. R., Enever P., Tayebi M., Mushens R., Linehan J., Brandner S., Anstee D., Collinge J. y Hawke S. (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. Nature 422, 80-3.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Korth, Carsten
Stitz, Lothar
Petsch, Benjamin
Müller-Schiffmann, Andreas

<120> Fragmento de anticuerpo anti-proteína priónica

<130> H04 194 PCT

<150> EP 08010971.3
<151> 17-06-2008

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Asn Trp Glu Arg Asp Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15

Gly

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido D retro-invertido de CDR3H [(D-)riCDR3H]

<400> 2

Gly Trp Tyr Asp Met Ala Asp Arg Glu Trp Asn Trp Arg Ala Cys Phe
1 5 10 15

Tyr

<210> 3
<211> 268
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

Met Ala Asp Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45

```
Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu
 50                  55                  60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
65                  70                  75                  80

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
                85                  90                  95

Tyr Cys Thr Arg Asp Tyr Arg Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
145                 150                 155                 160

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
                165                 170                 175

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
            180                 185                 190

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
        195                 200                 205

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
    210                 215                 220

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
225                 230                 235                 240

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
                245                 250                 255

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
            260                 265
```

<210> 4
<211> 179
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

```
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1               5                   10                  15
```

```
Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
            20                  25                  30

Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Thr
        35                  40                  45

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Gly Val Ser Trp Val Lys Gln Arg
    50                  55                  60

Ile Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly
65                  70                  75                  80

Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
                85                  90                  95

Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser
            100                 105                 110

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Asn Trp Glu Arg Asp
        115                 120                 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
    130                 135                 140

Lys Thr Thr Pro Pro Ser Asp Tyr Pro Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser
145                 150                 155                 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
                165                 170                 175

Thr Pro Leu
```

<210> 5
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Tyr Pro His Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
    50                  55                  60
```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Gln Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Ile
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ala Ala
115 120

<210> 6
<211> 311
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> scFv

<400> 6

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly
20 25 30

Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr Ser Val Asn Leu Ser Cys Lys Thr
35 40 45

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Gly Val Ser Trp Val Lys Gln Arg
50 55 60

Ile Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly
65 70 75 80

Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
85 90 95

Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser
100 105 110

Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Asn Trp Glu Arg Asp
115 120 125

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Lys Thr Thr Pro Pro Ser Asp Tyr Pro Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
165 170 175

```
Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
            180                 185                 190

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Ser Ser Ser Gly Tyr Pro His Leu
        195                 200                 205

Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
    210                 215                 220

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu Asp Arg Phe Ser Gly Ser
225                 230                 235                 240

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Gln Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
                245                 250                 255

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Ile Thr His Val Pro Trp Thr
            260                 265                 270

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
        275                 280                 285

Thr Val Ser Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
    290                 295                 300

Glu His His His His His His
305                 310
```

<210> 7
<211> 821
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 7

```
aaaaccatgg cggatgtgaa gcttcaggag tctggggctg aactggtgaa gcctggggct     60
tcagtgaagt tgtcctgcaa ggcttctggc tacaccttca ccagctacta tatgtactgg    120
gtgaagcaga ggcctggaca aggccttgag tggattggag agattaatcc tagcaatggt    180
ggtactaact tcaatgagaa gttcaagagc aaggccacac tgactgtaga caaatcctcc    240
agcacagcat acatgcaact cagcagcctg acatctgagg actctgcggt ctattactgt    300
acaagagact ataggtacgc ctggtttgct tactggggcc aagggactct ggtcactgtc    360
tctgcagaga gtcagtcctt cccaaatgtc ttccccctcg ccggcggagg cggttcaggc    420
ggaggtggct ctggcggtgg cggatccgat gttttgatga cccaaactcc actctccctg    480
cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc tcttgcagat ctagtcagag cattgtacat    540
agtaatggaa acacctattt agaatggtac ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc    600
ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga    660
tcagggacag atttcacact caagatcagc agagtggagg ctgaggatct gggagtttat    720
tactgctttc aaggttcaca tgttccgtac acgttcggag gggggaccaa gctggaaata    780
aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc cggccgcttt t                        821
```

<210> 8
<211> 480
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 8

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60

atggccatgg cggaggtcca gctgcagcag tctggagctg agctggcgag gcctgggact 120

tcagtgaacc tgtcttgtaa gacttctggc tacagcttca caggctatgg tgtaagttgg 180

gtgaagcagc gaattggaca gggccttgag tggattggag agatttatcc tagaagtggt 240

aatacttact acaatgagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgcaga caaatcctcc 300

aacacggcgt acatggagct ccgcagcctg acatctgagg actctgcggt ctatttctgt 360

gcaagatgga actgggaaag ggatgcaatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 420

gtctcctcag ccaaaacgac acccccatct gactatccac tagccggcgg aggcggttca 480

<210> 9
<211> 369
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 9

gacattgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa agcagtagtg gatatcccca tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa ctcctgatct acagggtttc caaccgattt 180

tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgcaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgcc tccaaattac acatgtcccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360

tccgcggcc 369

<210> 10
<211> 936
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> scFv Myc-His (H6/L5)

<400> 10

atgaaatacc tgctgccgac cgctgctgct ggtctgctgc tcctcgctgc ccagccggcg 60

atggccatgg cggaggtcca gctgcagcag tctggagctg agctggcgag gcctgggact 120

tcagtgaacc tgtcttgtaa gacttctggc tacagcttca caggctatgg tgtaagttgg 180

gtgaagcagc gaattggaca gggccttgag tggattggag agatttatcc tagaagtggt 240

aatacttact acaatgagaa gttcaagggc aaggccacac tgactgcaga caaatcctcc 300

aacacggcgt acatggagct ccgcagcctg acatctgagg actctgcggt ctatttctgt 360
gcaagatgga actgggaaag ggatgcaatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 420
gtctcctcag ccaaaacgac acccccatct gactatccac tagccggcgg aggcggttca 480
ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc gacattgtga tgacccaaac tccactctcc 540
ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa 600
agcagtagtg gatatcccca tttgaactgg tacctccaga aaccaggcca gtctccacaa 660
ctcctgatct acagggtttc caaccgattt tctggggtcc tagacaggtt cagtggtagt 720
ggatcaggga cagatttcac actgcaaatc agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt 780
tatttctgcc tccaaattac acatgtcccg tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa 840
atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta tccgcggccg aagaacagaa actgatcagc 900
gaagaagatc tcgagcacca ccaccaccac cactga 936

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante M13A de CDR3H

<400> 11

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Asn Trp Glu Arg Asp Ala Ala Asp Tyr Trp
1 5 10 15

Gly

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mutante D11R de CDR3H

<400> 12

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Asn Trp Glu Arg Arg Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223>mutante R10A de CDR3H

<400> 13

Tyr Phe Cys Ala Arg Trp Asn Trp Glu Ala Asp Ala Met Asp Tyr Trp
1 5 10 15

Gly

REIVINDICACIONES

1.- Péptido que reconoce específicamente una proteína priónica, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en:

una región determinante de la complementariedad (CDR) según la SEQ ID NO: 1,
una región determinante de la complementariedad (CDR) según la SEQ ID NO: 11,
una región determinante de la complementariedad (CDR) según la SEQ ID NO: 12,
una región determinante de la complementariedad (CDR) según la SEQ ID NO: 13, y
un péptido D retro-invertido de dicha CDR según la SEQ ID NO: 2.

2.- Péptido según la reivindicación 1, que además comprende al menos una secuencia señal y/o marcadora.

3.- Una molécula de ácido nucleico seleccionada de un grupo que consiste en

a. moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1;

b. moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2;

c. moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 11;

d. moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 12; y

e. moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de anticuerpo que consiste en la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 13.

4.- Kit que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, y/o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3.

5.- Preparación farmacéutica que comprende el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, y/o la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 3.

6.- Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o el kit según la reivindicación 4, o la preparación farmacéutica según la reivindicación 5, para usar en el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con priones.

7.- Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o el kit según la reivindicación 4, o la preparación farmacéutica según la reivindicación 5, para usar para producir un efecto inmunoestimulador.

Fig. 1

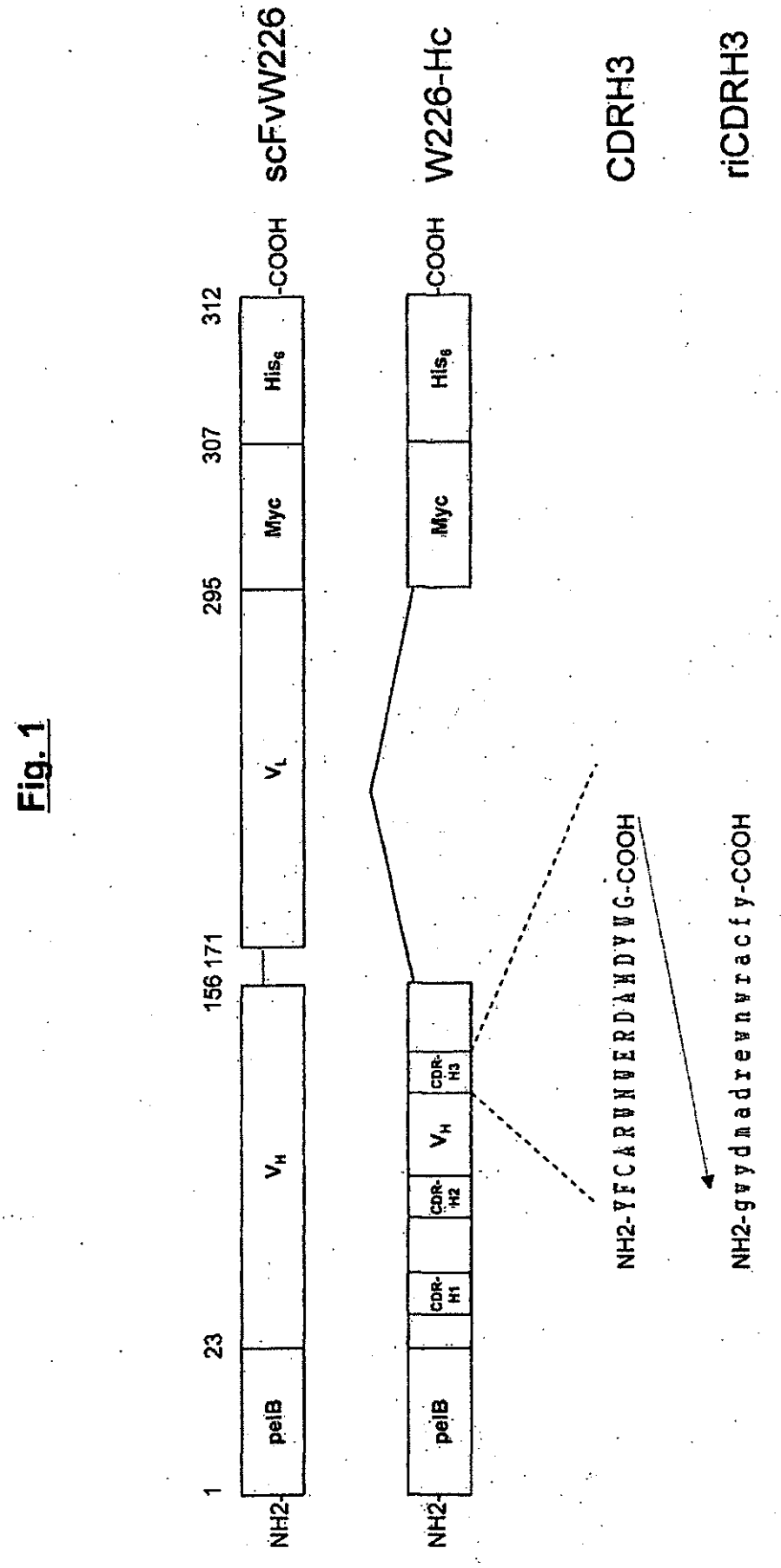
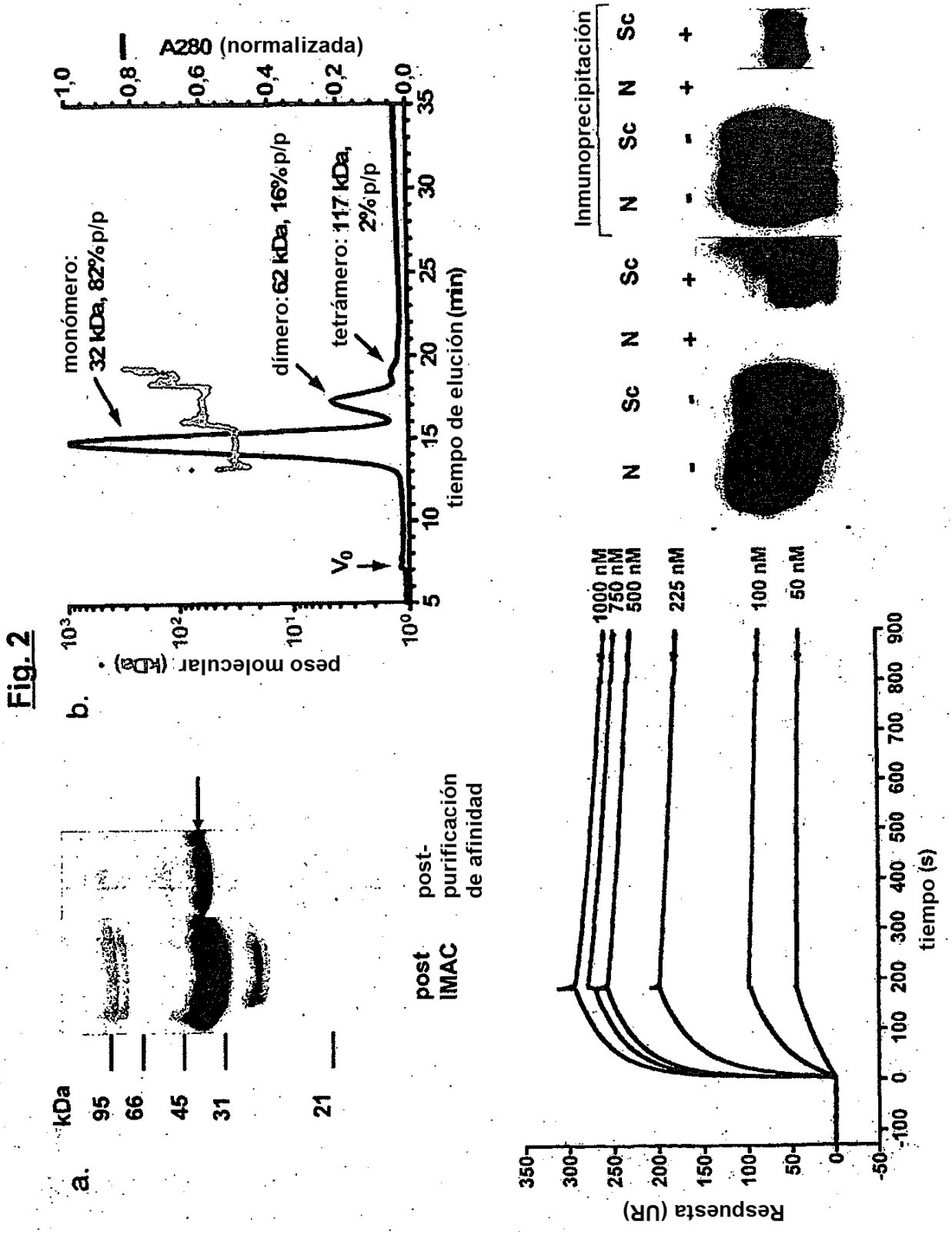

scFvW226
W226-Hc
CDRH3
riCDRH3
NH2
COOH
pelB
V_H
V_L
Myc
His_6
CDR-H1
CDR-H2
CDR-H3
1
23
156 171
295
307
312
NH2-YFCARWNWERDAMDYWG-COOH
NH2-gvydmadrevnwvracfy-COOH

Fig. 2


a.
kDa
95
66
45
31
21
post IMAC
post-purificación de afinidad
b.
peso molecular (kDa)
A280 (normalizada)
monómero: 32 kDa, 82% p/p
dímero: 62 kDa, 16% p/p
tetrámero: 117 kDa, 2% p/p
V_0
tiempo de elución (min)
Inmunoprecipitación
N
Sc
Respuesta (UR)
1000 nM
750 nM
500 nM
225 nM
100 nM
50 nM
tiempo (s)

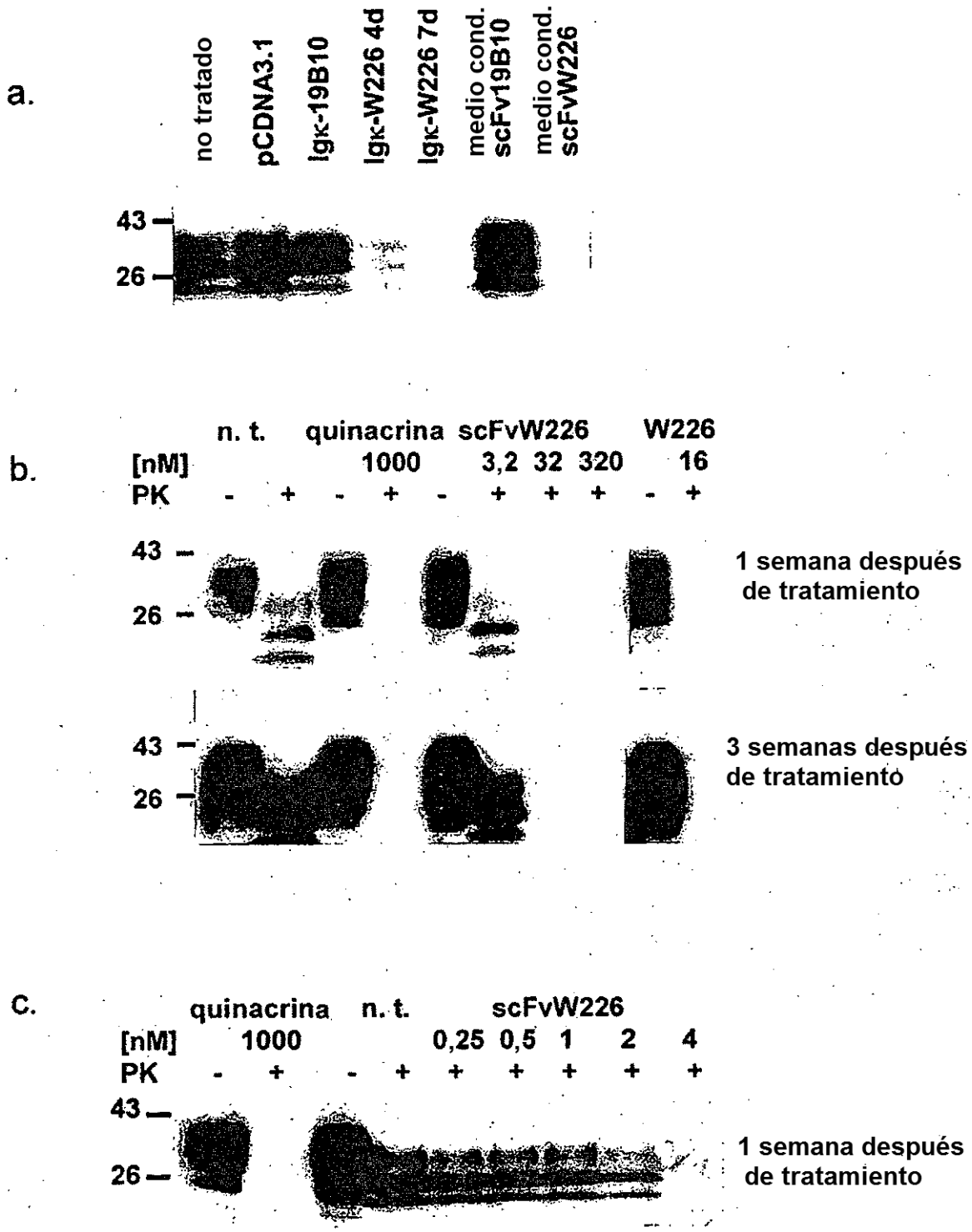

a.
no tratado
pCDNA3.1
Igκ-19B10
Igκ-W226 4d
Igκ-W226 7d
medio cond. scFv19B10
medio cond. scFvW226
43
26
b.
n. t.
quinacrina
scFvW226
W226
[nM]
1000
3,2
32
320
16
PK
1 semana después de tratamiento
3 semanas después de tratamiento
c.
quinacrina
n. t.
scFvW226
[nM]
1000
0,25
0,5
1
2
4
PK
1 semana después de tratamiento

Fig. 3

Fig. 4

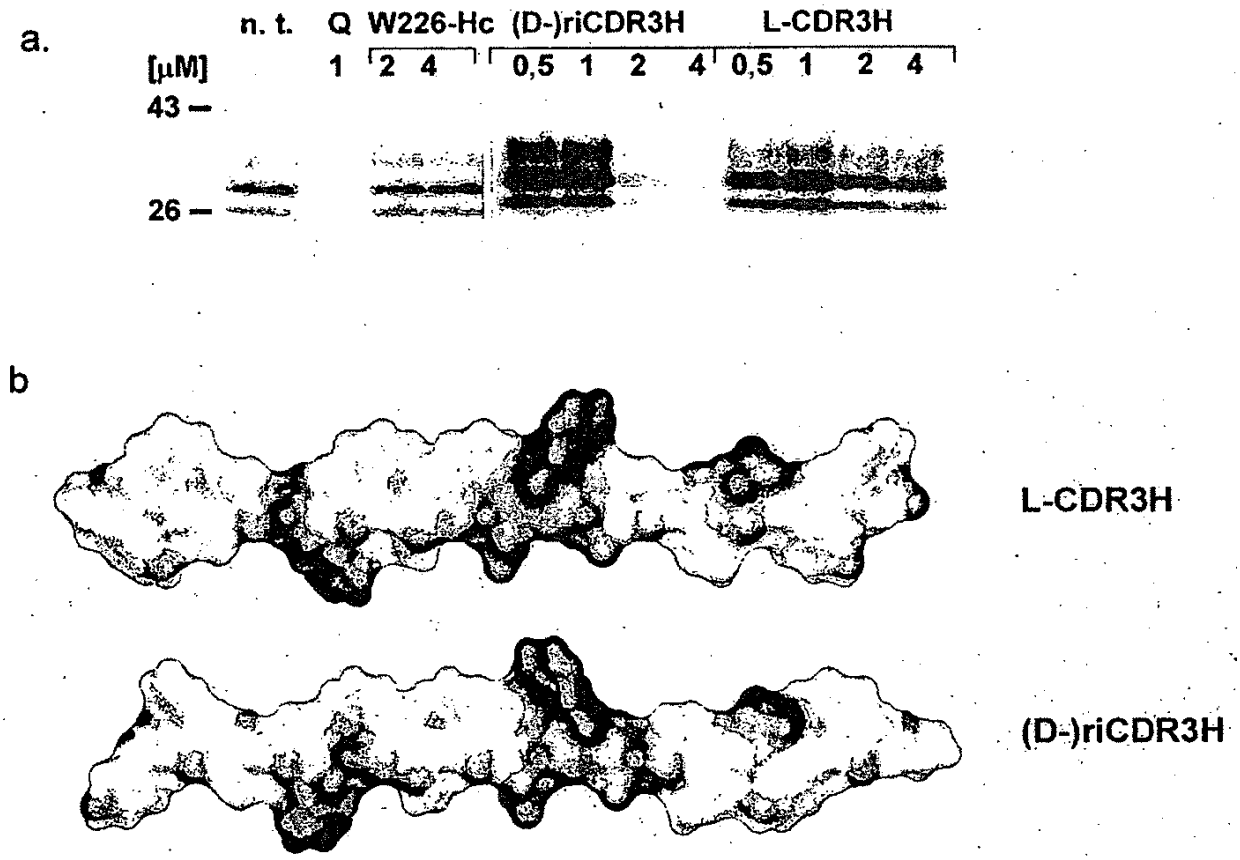

a.
n. t.
Q
W226-Hc
(D-)riCDR3H
L-CDR3H
[µM]
1
2
4
0,5
1
2
4
0,5
1
2
4
43
26
b
L-CDR3H
(D-)riCDR3H
c.
Ensayo *pull-down*
L-CDR3H
(D-)riCDR3H
sin péptido
N
Sc
N
Sc
N
Sc
N
Sc
N
Sc
N
Sc
N
Sc
N
Sc
PK
- - + + - - + + - - + + - - + +
43
26

Fig. 5

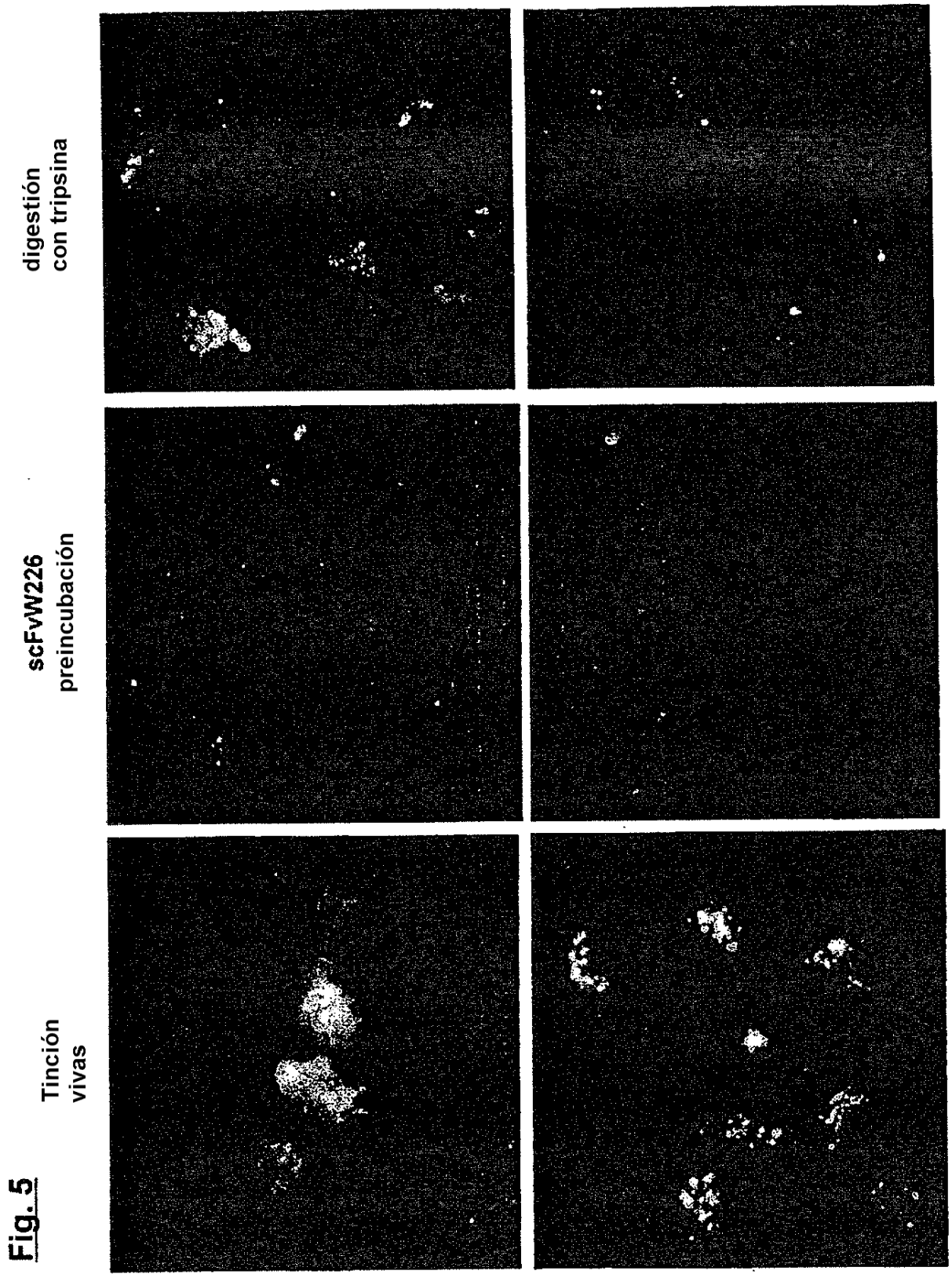

Tinción vivas
scFvW226 preincubación
digestión con tripsina
(D-)riCDRH3 -TAMRA
L-CDR3H -TAMRA

Fig. 6

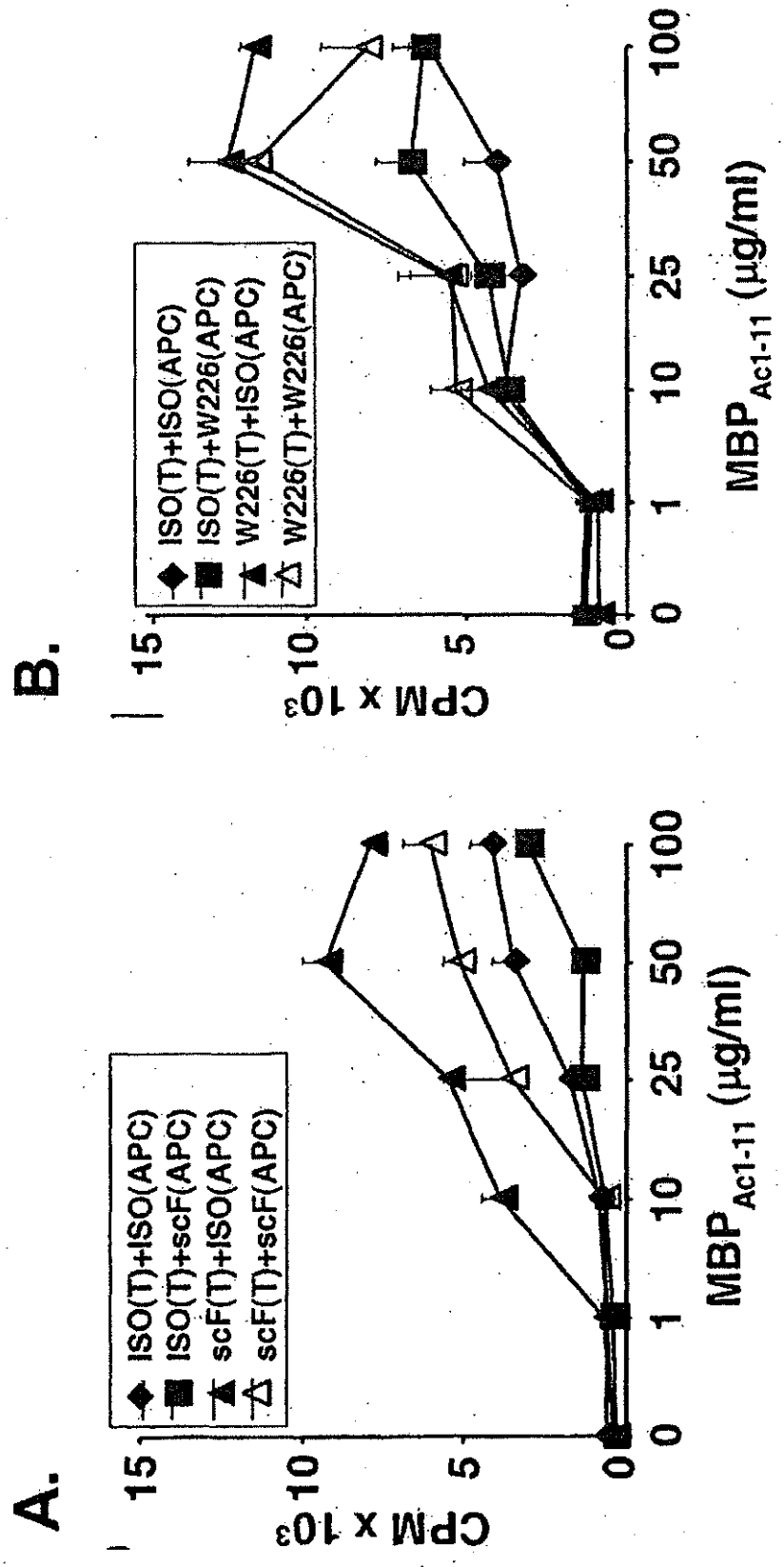

A.
B.
CPM x 10³
MBP Ac1-11 (µg/ml)
ISO(T)+ISO(APC)
ISO(T)+scF(APC)
scF(T)+ISO(APC)
scF(T)+scF(APC)
ISO(T)+ISO(APC)
ISO(T)+W226(APC)
W226(T)+ISO(APC)
W226(T)+W226(APC)
0
5
10
15
0
1
10
25
50
100

Fig. 7