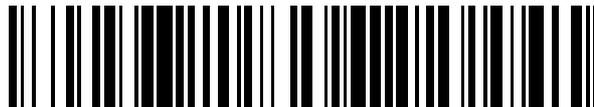


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 565**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2004 E 04761667 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1668369**

54 Título: **Ensayo de protección de epítomos y método para detectar conformaciones de proteínas**

30 Prioridad:

20.08.2003 US 496381 P

20.08.2003 CA 2437675

21.08.2003 US 497362 P

21.08.2003 CA 2437999

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

13.04.2016

73 Titular/es:

PROMIS NEUROSCIENCES INC. (100.0%)

1920 Yonge Street, Suite 200

Toronto, ON M4S 3E2, CA

72 Inventor/es:

CASHMAN, NEIL y

LEHTO, MARTY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 566 565 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de protección de epítomos y método para detectar conformaciones de proteínas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un ensayo de protección de epítomos para su uso en diagnóstico, pronóstico e intervención terapéutica en enfermedades, por ejemplo, enfermedades que implican agregación de polipéptidos tales como infecciones por priones.

10

Antecedentes de la invención

Plegamiento erróneo y agregación de proteínas

15

Las proteínas pueden plegarse para dar estructuras complejas y estrechamente empaquetadas. El plegamiento no sólo es crucial para la actividad biológica sino que la imposibilidad de que las proteínas se plieguen apropiadamente o permanezcan plegadas puede dar lugar a enfermedad (Dobson CM, Methods (2004) 34:4-14). El plegamiento erróneo puede provocar en algunos casos agregación de proteínas, lo que puede dar lugar a depósitos diferenciados extracelularmente (por ejemplo, placas) o intracelularmente (por ejemplo, inclusiones en el citosol o en el núcleo).

20

Enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedades priónicas se caracterizan por depósitos neurales de proteína agregada con plegamiento erróneo. La diabetes tipo II y el cáncer también se han vinculado al plegamiento erróneo de proteínas y es probable que haya aún enfermedades por identificar que resulten de errores en el plegamiento de proteínas y que en algunos casos conducen a consecuencias tales como agregación. La naturaleza del plegamiento erróneo y cualquier agregación en tales enfermedades no está normalmente bien caracterizada.

25

30 Enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas se han convertido en un problema sanitario importante desde el brote de la BSE o "enfermedad de las vacas locas" (revisado anteriormente, 40, 41). La BSE se descubrió por primera vez en el Reino Unido pero se ha extendido ahora a muchos otros países de Europa y a Japón. En el RU solo, ha habido casi 180.000 casos de BSE, que dieron como resultado la destrucción del ganado y la posible infección de 3-5 millones de cabezas estimadas. El coste total estimado para el RU superó los 2500 millones de dólares. Se cree que la BSE se transmite entre el ganado a través de la alimentación que contiene priones procedentes del ganado infectado, y se cree que se transmite a los seres humanos a través de la ingesta de carne de ternera u otros productos ganaderos de animales infectados.

35

40

Enfermedades priónicas emergentes

Las enfermedades priónicas son un grupo de síndromes neurodegenerativos de progresión rápida y sin tratamiento, caracterizados neuropatológicamente por cambio esponjiforme, pérdida de células neuronales, gliosis y acumulación en el cerebro de polipéptido amiloide anómalo. Las enfermedades priónicas humanas incluyen enfermedad de Creutzfeldt-Jakob clásica (CJD), que tiene formas esporádicas, iatrogénicas y familiares. Desde 1996, se ha identificado una "nueva variante" de CJD (vCJD) en el Reino Unido, Francia, la República de Irlanda, Hong Kong, Italia, los Estados Unidos y Canadá (40, 41). La CJD variante puede matar a individuos de tan sólo 14 años de edad con un periodo de incubación desconocido. Hay pocas dudas de que la vCJD es una forma humana de encefalopatía esponjiforme bovina (BSE) (42). La epidemia primaria por el consumo de ganado contaminado ha afectado a más de 130 individuos hasta la presentación de este documento.

45

50

El espectro de "epidemias secundarias de vCJD" a través de sangre, hemoderivados, cirugía, odontología, vacunas y cosméticos es de gran preocupación (40, 41). La detección de infectividad de priones en sangre en infecciones de BSE/vCJD experimentales de ratones y ovejas (40) sugiere que existe un riesgo especial de transmisión de vCJD a través de sangre y hemoderivados. Los recientes informes de vCJD en dos receptores de un donante que desarrollaron la enfermedad también son también alarmantes (52, 53). Canadá y los Estados Unidos han ampliado recientemente los aplazamientos de donantes de sangre con vCJD a todos los países de Europa occidental.

55

60

Aunque se conoce la tembladera de las ovejas desde hace siglos, la enfermedad priónica en animales más importante en la actualidad es la BSE. Más de 173.000 animales, principalmente de Gran Bretaña, han desarrollado BSE sintomática, y hasta 3 millones han entrado en el abastecimiento alimentario sin detectar. Ahora está notificándose BSE cada vez más en ganado que "nació tras la prohibición" en 1996 de la complementación alimenticia con harina de carne y huesos, lo que sugiere que pueden existir rutas alternativas que impiden que la epidemia se extinga fácilmente. Otro problema alarmante es la posible transmisión de BSE a las ovejas, lo que puede exponer a poblaciones humanas adicionales a la cepa priónica de BSE/vCJD. Informes recientes muestran

65

que los priones pueden replicarse en determinados grupos musculares de ovejas, animales experimentales y seres humanos (54-57), lo que indica un posible riesgo en tejidos considerados previamente seguros para el consumo humano.

- 5 La enfermedad consuntiva crónica (CWD) de cérvidos en cautividad y silvestres (ciervos y alces) representa otra enfermedad priónica animal de aparición reciente en América del Norte, cuyo impacto sobre la salud humana aún se desconoce. Es evidente que las enfermedades priónicas recientemente reconocidas suponen una amenaza para la seguridad de alimentos, hemoderivados y tratamientos médico-quirúrgicos.

10 Priones: Patógenos atípicos

Las enfermedades priónicas de aparición reciente, y la naturaleza únicamente polipeptídica de los priones, han creado importantes desafíos médicos, veterinarios y económicos en todo el mundo. Hasta la fecha, las únicas pruebas comercializadas para detectar la infección por priones se han basado en muestras cerebrales *post-mortem*.
 15 No existen pruebas bioquímicas para detectar priones en la sangre de animales infectados, a pesar de la detección mediante estudios de transmisión experimentales. El desarrollo de pruebas de diagnóstico sensibles y específicas para detectar la infección por priones es una tarea que supone un reto, en parte debido a la naturaleza poco común del agente infeccioso priónico. Los agentes infecciosos que transmiten las enfermedades priónicas difieren de otros patógenos en que no se ha detectado componente de ácido nucleico en los materiales infecciosos (41). Según la
 20 teoría de los priones desarrollada por el premio Nobel Dr. Stanley Prusiner, la infectividad reside en PrP^{Sc}, una isoforma conformacional con plegamiento erróneo del polipéptido priónico celular normal casi ubicuo PrP^C. PrP^{Sc} es de hecho la macromolécula más prominente (o quizá la única) en preparaciones de infectividad de priones, y no parece que sea un sustituto fiable para la infección por priones. PrP^{Sc} es parcialmente resistente a la digestión por proteasas, escasamente soluble y existe en un estado agregado, en contraposición a la isoforma sensible a proteasas, soluble, monomérica PrP^C (29, 31, 43-46).

PrP^{Sc} se deriva de su isoforma celular normal (PrP^C), que es rica en estructura en α -hélice, mediante un proceso protraduccional que implica una transición conformacional. Aunque la estructura primaria de PrP^C es idéntica a la de PrP^{Sc}, los cambios en la estructura secundaria y terciaria son responsables de las propiedades fisicoquímicas
 30 distintas de las dos isoformas.

Una de las dificultades en la evaluación de la seguridad de alimentos o hemoderivados de seres humanos potencialmente infectados con priones es la falta de una prueba de diagnóstico precisa para la sangre y otras muestras biológicas accesibles. Actualmente, no hay ninguna prueba de diagnóstico que pueda aplicarse para
 35 examinar animales vivos, seres humanos, sangre o hemoderivados en una fase temprana. Esto también proporciona un problema adicional en un trasplante de órganos, añadiendo un riesgo desconocido a los receptores de los órganos. Por tanto, como medida preventiva, países tales como el RU ya no recurren a plasma de sus habitantes. El riesgo de propagación de enfermedades priónicas ha afectado a otros países también. Por ejemplo, los Estados Unidos y Canadá no aceptan donaciones de sangre de individuos que hayan residido en el RU o Francia durante
 40 más de 3-6 meses.

Actualmente, el diagnóstico de vCJD sólo puede confirmarse tras el examen patológico del cerebro en la autopsia o biopsia. Algunas estrategias complementarias en la detección de CJD temprana incluyen electroencefalogramas (EEG), exploraciones mediante obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM) y pruebas en líquido
 45 cefalorraquídeo (LCR), que pueden ser útiles como marcadores "sustitutos" o "aproximados". La ausencia de una "prueba directa" para detectar la infección por priones supone un fuerte contraste con los agentes infecciosos convencionales, tales como virus y bacterias.

Algunas pruebas que están en proceso de comercializarse se basan en marcadores sustitutos de infección que son de "segunda generación" con respecto a los priones infecciosos reales.
 50

La resistencia a PrP proteasa es la base de la mayoría de las pruebas de diagnóstico disponibles comercialmente para detectar enfermedad priónica. En las metodologías actuales, se retira una muestra de cerebro y se digiere con proteasas que pueden eliminar PrP^C, pero dejan un núcleo resistente a proteasa de PrP^{Sc}. El fragmento de PrP^{Sc}
 55 resistente a proteasa se detecta entonces mediante inmunotransferencia (como en la prueba de Prionics) o mediante ELISA de captura (como en las pruebas de BioRad y Enfer, y en una nueva prueba de Prionics). Sin embargo, la digestión con proteasas es engorrosa y variable, conduciendo a falsos negativos y positivos. Además, hay algunas cepas de priones que se notifica que contienen PrP^{Sc} que es infeccioso y está agregado, pero que no es resistente a proteasa. PrP^{Sc} sensible a proteasa también predomina tempranamente en la infección y en la
 60 transmisión entre especies de la enfermedad (31).

La detección de fragmentos de PrP resistentes a proteasa también es la base de una prueba de diagnóstico en orina (47) que está desarrollando comercialmente Prionics. Sin embargo, la detección de PrP resistente a proteasa en orina sufre las mismas limitaciones que la prueba cerebral *post-mortem*, y tiene la desventaja adicional de requerir la
 65 precipitación de grandes volúmenes de orina, y una escasa sensibilidad (por ejemplo, detectando sólo PrP^{Sc} en fases tardías de la enfermedad, no de manera presintomática).

Los documentos WO00/22438 y US6.406.864 dan a conocer cada uno un método de ensayo que aísla y detecta la presencia de una conformación relacionada con enfermedad de una proteína (por ejemplo, PrP^{Sc}) presente en una muestra que también contiene la conformación no relacionada con enfermedad de la proteína (por ejemplo, PrP^C). La muestra se trata (por ejemplo, se pone en contacto con proteasa) de una manera que se hidroliza la conformación relacionada con enfermedad y no la conformación no relacionada con enfermedad. La muestra tratada se pone en contacto con una pareja de unión (por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une a PrP^{Sc}) y la aparición de unión proporciona una indicación de que está presente PrP^{Sc}. Alternativamente el PrP^{Sc} de la muestra tratada se desnaturaliza (por ejemplo, se pone en contacto con guanadina) o se despliega. El PrP^{Sc} desplegado se pone en contacto con una pareja de unión y la aparición de unión indica la presencia de PrP^{Sc} en la muestra. En otra realización, se hacen reaccionar PrP^{Sc} y PrP^C con un anticuerpo marcado que se une a ambas conformaciones y una conformación que se une sólo a la conformación relacionada con enfermedad, y la presencia de la conformación relacionada con enfermedad se determina comparando las dos.

LEHTO M T *et al* ABSTRACTS OF THE ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, WASHINGTON, DC, EE.UU., vol. 32, 2 de noviembre de 2002 (02-11-2002), página del resumen 692.9, da a conocer que el tratamiento con peroxinitrito de tejido cerebral provocó una reducción en la unión de los anticuerpos anti-PrP 3F4 y 6H4. El peroxinitrito indujo ocultamiento de epítopos más pronunciado en PrP cerebral normal que en PrP con plegamiento erróneo.

Otras enfermedades neurodegenerativas

Enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Parkinson/demencia por cuerpos de Lewy (PD, LBD) suponen retos importantes para la población en envejecimiento y el sistema de atención sanitaria (revisado en 1). Se estima que 364.000 canadienses de más de 65 años de edad tienen actualmente AD diagnosticada o una demencia relacionada (<http://www.alzheimer.ca/>). Con el aumento de la esperanza de vida, se espera que la incidencia de enfermedad neurodegenerativa crezca. Para 2025, la AD afectará a tantos como a un millón de canadienses, y para 2050, este número se duplicará.

AD, ALS y PD/LBD esporádicas están todas asociadas con acumulación neural de multímeros patológicos de polipéptidos con plegamiento erróneo (estos podrían ser posiblemente fibrillas, protofilamentos y agregados amorfos), incluyendo el fragmento de amiloide-beta (Abeta) de la proteína precursora de amiloide (APP) en AD; superóxido dismutasa-1 (SOD1) en ALS, y alfa-sinucleína en PD y LBD (1). Adicionalmente, la polineuropatía amiloidótica familiar (FAP) resulta de la agregación de transtiretina para formar depósitos de amiloide. Como con las enfermedades priónicas, mutaciones en genes que codifican para estos polipéptidos están asociadas con formas familiares dominantes autosómicas de AD, ALS y PD.

Enfermedad de Alzheimer

La AD es una enfermedad neurodegenerativa que provoca demencia común (memoria y cognición alteradas) asociada con la acumulación en el cerebro de placas extracelulares compuestas predominantemente de los péptidos Abeta (1-40), Abeta (1-42) y Abeta (1-43), todos los cuales son productos proteolíticos de APP (revisado en 4). Además, se acumulan intracelularmente ovillos neurofibrilares, compuestos principalmente por proteína tau fosforilada de manera anómala (una proteína asociada a microtúbulos neuronales), en neuronas moribundas (4). Las formas familiares de AD pueden estar provocadas por mutaciones en el gen de APP, o en los genes de presenilina 1 ó 2 (www.websiteformutaciones.com), cuyos productos proteicos están implicados en el procesamiento de APP para dar Abeta. Variantes alélicas de apolipoproteína E también influyen en la edad de comienzo de las formas tanto familiar como esporádica de AD (revisado en 5). Se ha detectado Abeta en la sangre y LCR de pacientes con AD y en controles normales (6). Abeta también está presente en filamentos de amiloide en placas y vasculares en trisomía 21 (síndrome de Down), hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (HCHWA)-tipo holandés, y envejecimiento cerebral normal (Mori, H *et al*. JBC (1992) 267: 17082-86). Se han detectado tau y tau fosforilada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con AD y pacientes con otras enfermedades neurológicas (7; revisado en 8).

Esclerosis lateral amiotrófica

La ALS es una enfermedad neuromuscular mortal, con una incidencia de 1 por cada 1000 adultos, que se presenta como debilidad progresiva, atrofia muscular y espasticidad, que se debe a la degeneración de ~500.000 "neuronas motoras inferiores" en la médula espinal y en el tronco encefálico, e innumerables "neuronas motoras superiores" en la corteza cerebral. Una clave importante en la etiología de ALS provino del hallazgo de que aproximadamente el 20% de los casos de ALS familiar (fALS) se deben a mutaciones en superóxido dismutasa-1 (SOD1) (10,11), una enzima de defensa frente a radicales libres. Se han catalogado hasta la fecha más de 100 mutaciones de cambio de sentido, sin sentido y de alteración del corte y empalme de intrones de SOD1 de fALS (12; www.alsod.org). Ratones transgénicos que expresan SOD1 humana mutante (mtHuSOD1) desarrollan un síndrome de neuronas motoras con similitudes clínicas y patológicas con ALS humana (13, 14), mientras que ratones que expresan SOD1 humana de tipo natural (wtHuSOD1) no desarrollan la enfermedad (13). Pueden detectarse inclusiones citoplasmáticas que contienen SOD1 en muchas neuronas motoras con enfermedad de pacientes con ALS familiar y esporádica (15), y

en la mayoría de los modelos de ratón transgénico (16, 17) y cultivo tisular (18) de la enfermedad.

Enfermedad de Parkinson y por cuerpos de Lewy

5 La PD es un trastorno del movimiento neurodegenerativo tan sólo secundario a la AD en cuanto a la prevalencia (~350 por 100.000 personas; 1). Se caracteriza clínicamente por rigidez, lentitud de movimiento y temblor (revisado en 21). La mayoría de los casos de enfermedad de Parkinson son esporádicos, pero las formas tanto esporádica como familiar de la enfermedad se caracterizan por cuerpos de Lewy intracelulares en neuronas moribundas de la sustancia negra, una población de neuronas del mesencéfalo (~60.000) que se diezman selectivamente en la PD.
 10 Los cuerpos de Lewy están compuestos predominantemente por alfa-sinucleína (22). Se han encontrado mutaciones en el gen que codifica para alfa-sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson familiar (revisado en 23; www.parkinsonsmutation.com). Otro gen asociado con PD recesiva autosómica es parkin, que está implicado en la degradación de alfa-sinucleína (22, 23). Se observan cuerpos de Lewy corticales difusos compuestos por alfa-sinucleína en la enfermedad por cuerpos de Lewy (LBD), un síndrome que provoca demencia asociado con cambios
 15 de tono parkinsoniano, alucinaciones y fluctuación de síntomas rápida (24). La LBD puede ser la segunda forma más común que provoca demencia neurodegenerativa tras la AD, representando del 20 al 30 por ciento de los casos entre personas de más de 60 años de edad (1, 24).

Enfermedad de Huntington y enfermedades relacionadas

20 La HD es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por expansión de repeticiones de CAG que codifican para poliglutamina en el extremo N-terminal de la proteína huntingtina (revisado en 48). Tramos de poliglutamina de ≥ 36 provocan enfermedad y repeticiones más largas provocan un comienzo más temprano (49, 50).

25 Otras enfermedades por poliglutamina tales como atrofia dentato-rubro y pálido-luisiana (DRPLA) y algunas formas de ataxia sino-cerebelosa (SCA) tienen también inclusiones intracelulares que se correlacionan aproximadamente con regiones de muerte neuronal. Interrupciones en la repetición de poliglutamina expandida en el producto del gen SCA-1 dan como resultado ausencia de la enfermedad (51).

30 Enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Parkinson/enfermedad por cuerpos de Lewy (PD, LBD) suponen retos importantes para la población en envejecimiento y el sistema de atención sanitaria. No existen pruebas bioquímicas específicas para enfermedades neurodegenerativas como un grupo (1,2). Puesto que las enfermedades neurodegenerativas se consideran “diagnósticos de exclusión”, se requiere una investigación muy amplia para lograr un diagnóstico
 35 “clínicamente probable” para estos estados progresivos, incurables y habitualmente mortales. Se utilizan pruebas sustitutas caras, tales como obtención de imágenes neurológicas, para aumentar la probabilidad de diagnóstico (2). La disponibilidad de pruebas bioquímicas específicas, sensibles y baratas para este grupo de enfermedades devastadoras podría ahorrar posiblemente recursos financieros para los sistemas de atención sanitaria sobrecargados. Además, un diagnóstico seguro de estas enfermedades en una fase sintomática más temprana
 40 aumenta la ventana para lograr una eficacia del tratamiento mejorada en un momento en el que la fisiopatología de la enfermedad es generalmente más sensible al tratamiento (3).

45 Se necesitan urgentemente estrategias de diagnóstico y examen eficaces, eficientes y baratas para el diagnóstico *antemortem* de enfermedades neurodegenerativas humanas, dada la población en envejecimiento y la presión financiera continua sobre el sistema de atención sanitaria.

Diabetes

50 También se observa agregación de proteínas en pacientes con diabetes tipo II. Se ha observado un aumento de la expresión del péptido derivado de adipocitos, resistina, en pacientes con diabetes tipo II (Youn BS *et al.* J Clin Endocrinol Metab. (2004); 89:150-6) y estudios sugieren que niveles de resistina elevados pueden desempeñar un papel en la obesidad y la resistencia a la insulina. Adicionalmente, la deposición de polipéptido amiloide de los islotes (también conocido como amilina) está asociada de manera patógena con diabetes tipo 2. Estos depósitos
 55 contienen polipéptido amiloide de los islotes, un péptido amiloidogénico único y están asociados con la muerte de células beta. Estudios recientes sugieren que las especies responsables de la muerte de células beta inducida por amiloide de los islotes se forman de manera temprana en la formación de amiloide de los islotes, cuando comienza la acumulación de polipéptido amiloide de los islotes (Hull RL *et al.* J Clin Endocrinol Metab. (2004) 89:3629-43). Una prueba de diagnóstico que pueda identificar polipéptido amiloide de los islotes patógeno sería muy útil para detectar
 60 diabetes tipo 2 en sus fases tempranas, cuando las intervenciones en la dieta y terapéuticas tienen una eficacia máxima.

Cáncer

65 También se considera que muchas formas de cáncer son enfermedades de la conformación de proteínas (Ishimaru D. *et al.* Biochemistry (2003) 42:9022-7). Un subconjunto de neuroblastomas, carcinomas y mielomas muestran una

5 acumulación anómala de agregados de proteína p53 supresora de tumores (Butler JS *et al.* Biochemistry (2003) 42: 2396-403; Ishimaru D. *et al.* Biochemistry (2003) 42:9022-7). Esta acumulación podría contribuir a la pérdida de función de p53 en algunas células cancerosas (Ishimaru D. *et al.* Biochemistry (2003) 42:9022-7). Ensayos que puedan detectar p53 acumulada podrían proporcionar un sistema de detección útil para el diagnóstico y podrían mejorar la intervención terapéutica individualizando la intervención terapéutica.

Sumario de la invención

10 Los inventores han desarrollado recientemente el ensayo de protección de epítomos (EPA), un método novedoso que proporciona una detección *antemortem* sensible y específica de proteínas de enfermedad en sangre y otros tejidos y líquidos accesibles. La invención muestra el papel de la agregación en enfermedades, tales como enfermedad priónica, y proporciona un ensayo que supera los problemas en la técnica anterior. En enfermedades priónicas, el polipéptido priónico monomérico celular normal PrP^C experimenta repliegamiento para dar una isoforma anómala, agregada, designada genéricamente PrP^{Sc}. Enfermedades tales como AD, PD, LBD, ALS y HD también se caracterizan por conformaciones con plegamiento erróneo y/o agregadas de proteínas celulares. Esta propiedad la aprovechan los métodos de la invención para proporcionar pruebas de diagnóstico sensibles y específicas para estas y otras enfermedades.

20 Según la invención, los métodos son útiles cuando un epítomo diana es accesible en una cualquiera de una proteína de tipo no natural (es decir proteína de enfermedad) o una proteína de tipo natural e inaccesible en la otra. La inaccesibilidad se debe a menudo a que la agregación hace que el epítomo diana sea inaccesible.

La invención incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítomo diana es un polipéptido de enfermedad (trastorno) o un polipéptido de tipo natural, que comprende:

- 25
- poner en contacto el polipéptido candidato con un agente de bloqueo; y
 - determinar si el epítomo diana es inaccesible o accesible para la modificación química por el agente de bloqueo.
- 30

La accesibilidad o inaccesibilidad del epítomo diana es indicativa de si el polipéptido candidato es un polipéptido de enfermedad (trastorno) o un polipéptido de tipo natural porque en una de la proteína de enfermedad (trastorno) y la proteína de tipo natural, el epítomo diana es accesible. En el otro polipéptido el epítomo diana es inaccesible.

35 En una realización, la invención proporciona un método de detección de enfermedades priónicas, por ejemplo, determinación de si un polipéptido candidato que incluye un epítomo diana está en una conformación de tipo natural o en una conformación de tipo no natural en la que está agregado, que comprende:

- 40
- hacer reaccionar una muestra de polipéptido (la muestra contiene normalmente PrP^{Sc} y/o PrP^C, y en muchos casos una abundancia de uno o del otro) con un agente de modificación química, normalmente un agente que reacciona químicamente con proteínas tales como peroxinitrito, que modifica epítomos accesibles (epítomos diana) de modo que no pueden unirse a un agente de detección;
 - desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
 - detectar con sonda con agentes de detección, tales como un anticuerpo contra un epítomo diana, para determinar si el polipéptido (tal como antes de la desagregación y/o desnaturalización) incluía epítomos diana inaccesibles.
- 45

50 PrP^C se hace "invisible" en el ensayo, porque los epítomos en las moléculas monoméricas se bloquean para el reconocimiento por anticuerpos mediante el agente de modificación química, mientras que las moléculas de PrP^{Sc} se "protegen" frente a la modificación química en virtud de que se secuestran dentro de agregados o no están disponibles de otra forma para la reacción. Alternativamente, se bloquean epítomos en las moléculas multiméricas para el reconocimiento por anticuerpos mediante el agente de modificación química, mientras que moléculas de PrP^C se "protegen" frente a la modificación química en virtud de una diferencia en los epítomos accesibles.

55

En otra realización, el método de detección de enfermedad de Alzheimer comprende:

- 60
- hacer reaccionar una muestra de polipéptido (la muestra contiene normalmente todo o parte del polipéptido precursor de amiloide con enfermedad o A beta o tau y/o el correspondiente polipéptido de tipo natural, y en muchos casos una abundancia de uno o del otro) con un agente de modificación química, normalmente un agente que reacciona químicamente con proteínas tales como peroxinitrito, que modifica epítomos expuestos de modo que no pueden unirse a un agente de detección;
 - desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
- 65

- detectar con sonda con agentes de detección, tales como un anticuerpo contra un epítipo diana para determinar si el polipéptido antes de la desagregación y/o desnaturalización incluía epítopos diana inaccesibles.

5 En realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos de detección de enfermedades para otras enfermedades caracterizadas por epítopos diana accesibles de manera diferencial en conformaciones de enfermedad y de tipo natural, por ejemplo, que resultan de proteínas con plegamiento erróneo y/o agregadas tales como enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad por cuerpos de Lewy (LBD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), diabetes y cáncer. Estos métodos incluyen de manera similar etapas tales como

10 hacer reaccionar una muestra de polipéptido (por ejemplo un polipéptido de enfermedad descrito en el presente documento) con un agente de modificación química, que modifica epítopos expuestos de modo que no pueden unirse a un agente de detección; luego desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y detectar con sonda con agentes de detección, tales como un anticuerpo contra un epítipo diana para determinar si el polipéptido antes de la desagregación y/o desnaturalización incluía epítopos diana inaccesibles. Estas etapas se adaptan de

15 manera similar para otros fines, tales como examinar sangre y hemoderivados, y otros usos descritos en el presente documento.

El método de la invención tiene muchas ventajas con respecto a la tecnología existente. Tal como se indicó anteriormente, la invención se denomina opcionalmente "EPA", que en el caso de la detección de enfermedad por

20 proteínas priónicas es un método sencillo y eficaz para detectar proteínas de enfermedad agregadas tales como PrP^{Sc}, la molécula patógena que se piensa que constituye la partícula infecciosa en enfermedades priónicas y polipéptido, asociada con AD.

La invención es útil en plataformas con capacidad robótica de alto rendimiento. Por ejemplo, EPA no depende de la

25 resistencia a PrP proteasa, la base de la mayoría de las pruebas de diagnóstico disponibles comercialmente para enfermedad priónica. La tecnología de protección de epítopos no requiere una etapa de digestión con proteasa, lo que hace que sea más sensible a la infección temprana. Con certeza, la ausencia de una etapa de digestión con proteasa permite que el EPA sea más propenso a plataformas con capacidad robótica de alto rendimiento.

30 Además, los métodos de la invención pueden usarse para detectar cualquier proteína que exista en dos o más conformaciones, en donde uno o más epítopos diana se ocultan en al menos una conformación.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método de detección que comprende:

- 35 - hacer reaccionar una muestra de polipéptido con un agente de modificación química, normalmente un agente que reacciona químicamente con proteínas, que se define que modifica epítopos expuestos de modo que no pueden unirse a agentes de detección;
 - desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
 - 40 - detectar con sonda con agentes de detección, tales como anticuerpos contra un epítipo diana para determinar si el polipéptido antes de la desagregación y/o desnaturalización incluía epítopos diana inaccesibles para el agente de modificación química.
- 45 El resultado indica si el polipéptido incluye epítopos inaccesibles, lo que es indicativo del tipo de polipéptido que está presente (es decir proteína de tipo natural o proteína de tipo no natural).

En una realización, la invención incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural (en una realización, en

50 la conformación de tipo no natural, el polipéptido candidato se agrega con polipéptido agregado), que comprende:

- poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente epítopos diana accesibles, en el que en una de la conformación de tipo no natural o la conformación de tipo natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la otra conformación, el epítipo diana es inaccesible y no reacciona con el agente de bloqueo. El agente de bloqueo sin reaccionar se retira del contacto con el polipéptido, por ejemplo, dejando tiempo para que el agente de bloqueo se consuma o se degrade o eliminándolo de manera activa mediante procesos físicos o químicos tal como se describe más adelante;
- 55 - modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible; y
- poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió de un epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítipo diana convertido indica que antes de la conversión el polipéptido candidato estaba en una conformación en la que el epítipo diana era inaccesible y en el que la ausencia de unión
- 60
- 65

entre el agente de detección y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación en la que el epítipo diana era accesible, indicando de ese modo si el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural.

5 La invención también incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural, que comprende:

- poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente un epítipo diana accesible, en el que en la conformación de tipo natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la conformación de tipo no natural, el epítipo diana es inaccesible y no reacciona con el agente de bloqueo. El agente de bloqueo sin reaccionar se retira del contacto con el polipéptido, por ejemplo, dejando tiempo para que el agente de bloqueo se consuma o se degrade o eliminándolo activamente mediante procesos físicos o químicos tal como se describe más adelante;
- 10
- 15 - modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible; y
- poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió de un epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítipo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural.
- 20

25 La invención también incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural, que comprende:

- poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente un epítipo diana accesible, en el que en la conformación de tipo no natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la conformación de tipo natural, el epítipo diana es inaccesible y no reacciona con el agente de bloqueo. El agente de bloqueo sin reaccionar se retira del contacto con el polipéptido, por ejemplo, dejando tiempo para que el agente de bloqueo se consuma o se degrade o eliminándolo de manera activa mediante procesos físicos o químicos tal como se describe más adelante;
- 30
- 35 - modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible; y
- poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió de un epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítipo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo natural y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo no natural.
- 40

45 La invención también incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana que se ha hecho reaccionar con un agente de bloqueo está en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural, que comprende:

- modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible;
- 50 - poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió de un epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítipo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural.
- 55

En los métodos de la invención, el epítipo es en muchos casos inaccesible en la conformación con plegamiento erróneo o de tipo no natural porque i) el plegamiento erróneo diferencial del polipéptido en comparación con el polipéptido plegado de tipo natural impide o reduce la reacción entre el agente de bloqueo y el epítipo diana, ii) el polipéptido en la conformación con plegamiento erróneo se agrega consigo mismo u otros polipéptidos en la conformación con plegamiento erróneo impidiendo o reduciendo la reacción entre al agente protector/de bloqueo y el epítipo diana, y/o iii) modificaciones postraduccionales del polipéptido impiden o reducen las reacciones entre el agente de bloqueo y el epítipo diana.

- 60

En un ejemplo, el polipéptido candidato comprende proteína priónica, la conformación plegada de tipo natural comprende la conformación de proteína priónica plegada de tipo natural y la conformación plegada erróneamente comprende la conformación de PrP^{Sc}. Alternativamente, la proteína plegada de tipo natural comprende la

- 65

conformación de APP o su producto de escisión amiloide-beta, y la conformación con plegamiento erróneo comprende la conformación de enfermedad de Alzheimer APP o su producto de escisión amiloide-beta.

5 En otro ejemplo, el polipéptido candidato comprende SOD1, alfa-sinucleína, polipéptido amiloide de los islotes, resistina o proteína p53. Los métodos y kits de la invención descritos en la solicitud son útiles, por ejemplo, para su aplicación a un polipéptido de tipo no natural que tiene una conformación que comprende múltiples copias de un polipéptido agregado entre sí a través de interacciones de zonas ricas en lámina beta del polipéptido. En una realización el polipéptido es polipéptido que está agregado en agregados de proteína priónica. En otra realización, el polipéptido es polipéptido que está agregado en placas de amiloide.

10 La invención también incluye i) polipéptido de la invención modificado mediante reacción con un agente de bloqueo enumerado en el presente documento y ii) el polipéptido modificado mediante reacción con un agente de detección. La invención también incluye composiciones y kits de la invención que incluyen estos polipéptidos modificados.

15 El agente de bloqueo es opcionalmente peroxinitrito, peróxido de hidrógeno, pirocarbonato de dietilo (DEPC), 4-hidroxinonenal (4HNE), un epóxido tal como conduritól-B-epóxido y 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano, metileno o diazirina y compuestos relacionados. En los métodos, el polipéptido se modifica opcionalmente mediante desnaturalización del polipéptido, por ejemplo con calor, detergente y/o agentes caotrópicos. El polipéptido se modifica opcionalmente mediante tratamiento con un agente de desagregación para desagregar el polipéptido de otros polipéptidos del mismo tipo, y de otras moléculas, en el que el agente de desagregación se selecciona opcionalmente de al menos uno del grupo que consiste en agente caotrópico (incluyendo sales de guanidina, urea o tiourea), detergente y calor.

25 Resulta fácilmente evidente para un experto que las etapas del método de la invención mencionadas en el presente documento que implican retirar el agente de bloqueo normalmente implican retirar física, químicamente o de otra forma el agente de bloqueo del polipéptido candidato para impedir su reacción adicional. La eliminación implica opcionalmente dejar que pase un tiempo suficiente de modo que el agente de bloqueo se retire del polipéptido candidato al consumirse o degradarse (por ejemplo, de manera que el agente de bloqueo se vuelve inerte o se oxida). La eliminación implica opcionalmente añadir un compuesto para reaccionar con cualquier exceso de agente de bloqueo para inactivarlo. La eliminación también implica opcionalmente la filtración física del agente de bloqueo mediante técnicas de filtración convencionales o centrifugación para separar el polipéptido candidato y agente de bloqueo, o unión física a un sustrato útil para retirar el agente de bloqueo, tal como mediante unión del agente de bloqueo o polipéptido candidato a un sustrato inmovilizado en una columna.

35 Retirar significa impedir reacciones adicionales mediante el agente de bloqueo, por ejemplo, inactivando física o químicamente el agente de bloqueo, extrayendo el agente de bloqueo del contacto con la muestra que incluye el polipéptido candidato o permitiendo que pase una cantidad de tiempo suficiente para que el agente de bloqueo se consuma o se degrade.

40 El agente de detección comprende opcionalmente un anticuerpo dirigido contra un epítipo de polipéptido priónico, un péptido de amiloide-beta, un epítipo de alfa-sinucleína o un epítipo de SOD1. El anticuerpo comprende opcionalmente todos o parte de los anticuerpos anti-prión 6H4 y 3F4, y los anticuerpos anti-amiloide-beta 6E10 y 4G8.

45 Los métodos de la invención se usan preferiblemente con mamíferos, tales como seres humanos. Además, los métodos de la invención se usan preferiblemente con mamíferos, tales como ganado. Además los métodos de la invención se usan con artículos alimenticios, artículos cosméticos, instrumentos dentales y quirúrgicos, aparatos de aspiración y productos farmacéuticos.

50 La invención también incluye un método de someter a prueba una muestra de un animal, usando métodos de la invención descrita en el presente documento, para determinar si el animal tiene una enfermedad caracterizada por la presencia de polipéptido candidato en una conformación de tipo no natural en la muestra, en el que el polipéptido candidato incluye un epítipo diana. Tales enfermedades se describen en el presente documento. En una realización, el método comprende; determinar si el polipéptido candidato está en i) una conformación de tipo natural o ii) una conformación de tipo no natural, mediante un método que comprende las etapas de:

60 poner en contacto la muestra con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente un epítipo diana accesible en el polipéptido candidato, en el que en la conformación de tipo natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la conformación de tipo no natural, el epítipo diana es inaccesible porque el polipéptido candidato está agregado, no pudiendo reaccionar el polipéptido agregado y el epítipo diana con el agente de bloqueo;

65 poner en contacto la muestra con un agente de conversión para modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en la muestra en un epítipo diana accesible;

poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se

convirtió de un epítopo diana inaccesible en un epítopo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítopo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y el animal tiene una enfermedad y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítopo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural.

5 La invención también incluye un método de la invención descrito en el presente documento para examinar, por ejemplo, sometiendo a prueba una muestra, tal como sangre o hemoderivados y otras muestras, para determinar si la muestra comprende un polipéptido candidato en una conformación de tipo no natural en el que el polipéptido candidato incluye un epítopo diana. En una realización, el método comprende; determinar si el polipéptido candidato está en i) una conformación de tipo natural o ii) una conformación de tipo no natural, mediante un método que comprende las etapas de:

15 poner en contacto la muestra con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente un epítopo diana accesible en el polipéptido candidato, en el que en la conformación de tipo natural, el epítopo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la conformación de tipo no natural, el epítopo diana es inaccesible y no puede reaccionar con el agente de bloqueo;

20 poner en contacto la muestra con un agente de conversión para modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítopo diana inaccesible en la muestra en un epítopo diana accesible;

25 poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítopo diana que se convirtió de un epítopo diana inaccesible en un epítopo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítopo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y la muestra comprende un polipéptido candidato en una conformación de tipo no natural y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítopo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural.

30 En otra realización, la invención se refiere a un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítopo diana está en i) una conformación de tipo natural o ii) una conformación de tipo no natural (por ejemplo, en el que el polipéptido se agrega en la conformación de tipo no natural), que comprende:

35 poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente un epítopo diana accesible, en el que en la conformación de tipo natural, el epítopo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la conformación de tipo no natural, el epítopo diana es inaccesible (por ejemplo, porque el polipéptido candidato está agregado) y el epítopo diana no puede reaccionar con el agente de bloqueo;

modificar el polipéptido candidato para convertir un epítopo diana inaccesible en un epítopo diana accesible; y

40 poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítopo diana que se convirtió de un epítopo diana inaccesible en un epítopo diana accesible, en el que la unión entre agente de detección y epítopo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítopo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural. También se retira el agente de bloqueo sin reaccionar del contacto con el polipéptido, por ejemplo, dejando que se consuma o se degrade o retirándolo de la reacción mediante procesos físicos o químicos.

50 El polipéptido candidato comprende opcionalmente proteína priónica, la conformación de tipo natural comprende la conformación de proteína priónica de tipo natural y la conformación de tipo no natural comprende la conformación de PrP^{Sc}. El polipéptido candidato comprende opcionalmente polipéptido amiloide-beta, proteína tau o proteína APP, SOD1, alfa-sinucleína, proteína huntingtina, p53 o polipéptido amiloide de los islotes o resistina. El agente de bloqueo se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en peroxinitrito, peróxido de hidrógeno, compuestos de metileno, anhídrido succínico, epóxidos, pirocarbonato de dietilo, 4-hidroxinonenal (4HNE) y diazirina. El polipéptido se modifica opcionalmente mediante desnaturalización del polipéptido. El polipéptido también se desnaturaliza opcionalmente mediante calor y/o detergente y/o agentes caotrópicos. El polipéptido se modifica opcionalmente mediante tratamiento con un agente de desagregación para desagregar el polipéptido de los agregados de polipéptido. El agente de desagregación se selecciona opcionalmente de al menos uno del grupo que consiste en agentes caotrópicos, detergente y calor. El detergente comprende opcionalmente SDS. El agente de detección comprende opcionalmente un aptámero o un anticuerpo, por ejemplo, dirigido contra un epítopo de polipéptido priónico. El anticuerpo comprende opcionalmente 6H4 o 3F4. El aptámero o anticuerpo está dirigido opcionalmente contra un péptido amiloide-beta. El anticuerpo comprende opcionalmente 6E10 o 4G8. La conformación de tipo no natural en determinadas realizaciones es indicativa de una enfermedad provocada por agregación de proteínas, tal como enfermedad priónica (por ejemplo BSE o CJD), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad por cuerpos de Lewy, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, cáncer o diabetes. Opcionalmente, antes de poner en contacto el agente de bloqueo con el polipéptido candidato, el polipéptido candidato está en una muestra que se trata previamente mediante uno o más de los siguientes métodos: adsorción, precipitación o centrifugación. Opcionalmente, antes de poner en contacto el agente de bloqueo con el polipéptido

candidato, el epítipo diana se mapea (es decir, el epítipo se identifica, por ejemplo, tal como se describe más adelante en la sección de "Epítipos diana"). Opcionalmente, el polipéptido está en una muestra *postmortem* o *antemortem* seleccionada del grupo de: LCR, suero, sangre, orina, muestra de biopsia o tejido cerebral. Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para detectar si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en i) una conformación de tipo natural o ii) una conformación de tipo no natural, que comprende un agente de detección que reconoce el epítipo diana e instrucciones para al menos uno de i) mapear un epítipo diana, ii) poner en contacto un polipéptido candidato con un agente de bloqueo y iii) poner en contacto un polipéptido candidato con un agente de detección. El kit es útil para implementar un método de la invención descrito en el presente documento. El agente de detección comprende opcionalmente un aptámero o un anticuerpo. El anticuerpo comprende opcionalmente 6H4, 3F4, 6E10 o 4G8, opcionalmente inmovilizado en un soporte sólido. El kit comprende además opcionalmente tampones y reactivos, por ejemplo, para ELISA, tal como ELISA de tipo sándwich, ELISA fluorescente. El kit comprende además opcionalmente un agente de bloqueo. El kit comprende además opcionalmente un agente de desnaturalización seleccionado de al menos uno del grupo de detergentes y agentes caotrópicos. El kit comprende además opcionalmente un patrón de polipéptido. El kit comprende opcionalmente una proteína de enfermedad recombinante o una proteína recombinante que imita a una proteína de enfermedad. En otra realización, la invención se refiere a un método de detección de si un polipéptido candidato que se ha puesto en contacto con un agente de bloqueo está en i) una conformación de tipo natural o ii) una conformación de tipo no natural, en el que el polipéptido candidato comprende al menos un epítipo diana y, tras el contacto con el agente de bloqueo y la eliminación del agente de bloqueo, el polipéptido candidato se ha modificado convirtiéndose de cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, comprendiendo el método: poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió de un epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, en el que la unión entre el agente de detección y el epítipo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural (por ejemplo, una conformación agregada) y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural. También son útiles en este método enfermedades, agentes de bloqueo, epítipos diana, agentes de detección y otros aspectos descritos en el presente documento. Las enfermedades, los agentes de bloqueo, los epítipos diana, los agentes de detección y otros aspectos descritos en el presente documento se adaptan también fácilmente para los métodos descritos en párrafos precedentes, tales como métodos para someter a prueba una muestra de un animal (tal como un ser humano, ganado, etc.) para determinar si el animal tiene una enfermedad o examinar una muestra.

La situación inversa a los métodos descritos en algunos de los párrafos mencionados anteriormente también se detecta de manera útil, por ejemplo, cuando la conformación de tipo natural incluye un epítipo inaccesible y la conformación de tipo no natural tiene un epítipo accesible. Esta situación también se adapta fácilmente a los métodos descritos en el presente documento, tales como diagnosticar una enfermedad o examinar muestras.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se facilitan a modo de ilustración sólo.

40 Breve descripción de los dibujos

Se describen realizaciones de la invención en relación con los dibujos en los que:

45 Figura 1. PrP cerebral agregada *in vitro* mediante tratamiento con ácido se protege frente a la modificación mediante peroxinitrito

Se trató homogeneizado de cerebro humano tratado con ácido o de manera simulada con concentraciones crecientes de peroxinitrito (ONOO) y luego se sometió a inmunotransferencia con 3F4 (panel A) o 6H4 (panel B). Efecto del peroxinitrito sobre el epítipo de 3F4 (C) y 6H4 (D) en homogeneizado de cerebro tratado de manera simulada (□) y con ácido (●). Se barrieron las películas de inmunotransferencia y se determinaron las intensidades de banda mediante el software Unscanit. Los resultados son las intensidades relativas combinadas de 3 experimentos separados.

55 Figura 2. PrP en cerebro de hámster infectado con tembladera se protege frente a la modificación mediante peroxinitrito

(A) Efecto del tratamiento con peroxinitrito sobre el epítipo de 6H4 en cerebro de hámster infectado con tembladera. (B) Se barrió la transferencia en (A) y se determinaron las intensidades de banda relativas usando el software Unscanit. (●) Cerebro de hámster infectado con tembladera. (□) Cerebro de hámster normal.

Figura 3. La protección frente a la modificación inducida por peroxinitrito se debe a agregación en cerebro tratado con ácido

65 (A) Efecto del peroxinitrito sobre la inmunoprecipitación (IP) de PrP en homogeneizado de cerebro tratado con ácido y de manera simulada. Se trató el homogeneizado de cerebro con peroxinitrito 10 mM seguido por incubación

durante 2 h a T.A. con (+) o sin (-) clorhidrato de guanidina (Gu) 2,5 M. Se sometieron a inmunoprecipitación las muestras resultantes con 6H4 o 3F4. Precipita más PrP en la muestra tratada con ácido tras el tratamiento con peroxinitrito + Gu mientras que en la muestra simulada, Gu no tiene ningún efecto. Esto sugiere que Gu puede descomponer PrP agregada en la muestra con ácido que se protege frente a la destrucción mediante peroxinitrito.

5 (B) Efecto del peroxinitrito sobre PrP en homogeneizado de cerebro tratado con ácido y de manera simulada tal como se mide mediante ELISA. Se trató el homogeneizado de cerebro con concentraciones crecientes de peroxinitrito seguido por Gu 2,5 M. Tras una dilución de 10 veces, se analizaron las muestras mediante ELISA de tipo sándwich con 6H4 como Ac de captura y 3F4 como Ac de detección. De manera similar a los datos de inmunotransferencia e IP, los resultados muestran que PrP con plegamiento erróneo se protege frente a la
10 destrucción mediante el tratamiento con peroxinitrito, debido a agregación.

Figura 4. Detección de amiloide-beta (Abeta) agregado usando EPA

15 El epítipo de 6E10 en la región de Abeta de APP es menos accesible para la modificación con peroxinitrito en cerebro con enfermedad de Alzheimer en comparación con cerebro normal (panel A), y en homogeneizados de cerebro que se han tratado a pH bajo para inducir agregación de proteínas (panel B). El péptido Abeta 1-42 agregado *in vitro* muestra una protección de epítipos destacada del epítipo de 6E10 frente a la modificación con peroxinitrito, en comparación con Abeta 1-42 no agregado soluble (panel C). Abeta 1-42 normal y agregado tratado con concentraciones crecientes de peroxinitrito y luego sometido a inmunotransferencia con anticuerpo 6E10
20 también muestra una protección de epítipos destacada (panel D).

Figura 5. Detección de epítipos modificables mediante DEPC en SOD1

25 (A) Inmunotransferencia de tipo Western que muestra SOD1 soluble tratada con concentraciones crecientes de DEPC y sometida a inmunotransferencia con anticuerpo de oveja anti-SOD1. (B) Representación gráfica de la disminución de la unión del anticuerpo a SOD1 con la concentración creciente de DEPC.

30 Figura 6. Detección de alfa-sinucleína agregada usando EPA (A). Inmunotransferencia de tipo Western que muestra el efecto de concentraciones crecientes de DEPC sobre la unión del anticuerpo a alfa-sinucleína soluble e insoluble. (B) Representación gráfica que muestra el grado de unión del anticuerpo a alfa-sinucleína normal (-) e insoluble (π).

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona un método útil para la detección de un homólogo de polipéptido relacionado con enfermedad de un polipéptido celular normal que forma agregados o conduce de otra forma al ocultamiento de uno o más epítipos que no están ocultos en el polipéptido de tipo natural o normal. La invención reconoce la importancia de la agregación en la patología de enfermedades tales como enfermedad priónica. La invención también se aprovecha de este efecto de agregación y proporciona un ensayo que supera los problemas de los ensayos de detección de la técnica anterior. En una realización, el método de la invención se aplica a la detección de PrP^{Sc} en
40 plasma, suero, orina u otra muestra biológica. Los métodos de la invención son útiles además para detectar cualquier polipéptido que existe en dos o más conformaciones, en donde uno o más epítipos diana son inaccesibles en al menos una conformación. En una realización, la invención incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en una conformación de tipo natural o de tipo no natural.

45 “Epítipo” se refiere a una parte de una secuencia de aminoácidos contiguos o no contiguos (antígeno) que se reconoce por y a la que se une un agente de detección tal como un anticuerpo. Preferiblemente, el epítipo es un epítipo lineal en un polipéptido que incluye normalmente de 3 a 10 o de 6 a 10 o más aminoácidos contiguos que se reconocen por y a los que se une un agente de detección. Un epítipo conformacional incluye aminoácidos no contiguos. Algunas veces los epítipos conformacionales pueden restablecerse por sí mismos tras la
50 desnaturalización mediante replegamiento parcial sobre, por ejemplo, una membrana de inmunotransferencia. El agente de detección tal como un anticuerpo reconoce la estructura tridimensional. Cuando una molécula de proteína se pliega para dar una estructura tridimensional, los aminoácidos que forman el epítipo se colocan de una manera que permite que el agente de detección reconozca y se una a los aminoácidos. En una proteína no plegada (desnaturalizada) sólo se reconoce el epítipo lineal y queda unido al agente de detección. Puesto que la proteína no está plegada antes del contacto con el agente de detección, el epítipo inaccesible será normalmente un epítipo
55 lineal.

60 “Agente de bloqueo” se refiere a un agente que reduce la reactividad del epítipo, por ejemplo uniéndose al epítipo o modificando y destruyendo la reactividad del epítipo, por ejemplo en un grupo lateral de aminoácido dentro de un epítipo lineal, de modo que se impide que el epítipo se una al agente de detección (habitualmente pero no siempre un anticuerpo). Un ejemplo de un agente de bloqueo es peroxinitrito. Otros ejemplos incluirían metileno, peróxido de hidrógeno, pirocarbonato de dietilo, 4-hidroxinonenal (4HNE), epóxidos tales como conduritól-B-epóxido y 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano y -diazirina. Los agentes de modificación química que saturan aminoácidos accesibles críticos para el reconocimiento de epítipos en condiciones nativas son los más útiles en las aplicaciones de
65 tecnología de protección de epítipos. Adicionalmente, el agente de bloqueo puede fosforilar, glicosilar o modificar de otro modo un epítipo diana. El agente de bloqueo también puede incluir péptidos, anticuerpos o fragmentos de

anticuerpo que se unen al epítipo. El agente de bloqueo debe modificar eficazmente aminoácidos accesibles (por ejemplo modificar al menos: el 50%, el 75%, el 90%, el 95% o el 99% de los aminoácidos accesibles).

5 “Epítipo accesible” es un epítipo diana que está disponible para reaccionar con un agente de bloqueo en métodos de la invención. Por ejemplo, un epítipo que está disponible para reaccionar con un agente de bloqueo es un epítipo accesible. Tras reaccionar con un agente de bloqueo, se impide que el epítipo accesible se una al agente de detección (tras esta etapa de reacción, el epítipo que se ha reaccionado puede denominarse epítipo bloqueado).

10 “Anticuerpo” pretende incluir anticuerpos completos y fragmentos de los mismos que también reaccionan específicamente con uno o más epítopos de proteína, tales como epítopos de proteína de enfermedad. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y examinarse los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera tal como se describe a continuación. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ tratando un anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'.

15 “Aptámero” significa una macromolécula tal como una molécula de péptido, ARN o ADN que puede interactuar específicamente con una diana de proteína o péptido.

20 “Epítipo inaccesible” significa que la modificación del epítipo diana mediante el agente de bloqueo químico se impide o se reduce significativamente (por ejemplo se reduce en al menos: el 50%, el 75%, el 90% o el 95%), por ejemplo, mediante plegamiento erróneo diferencial en relación con el polipéptido de tipo natural, mediante agregación de polipéptido con plegamiento erróneo o mediante modificaciones postraduccionales del polipéptido. En algunos casos, el epítipo inaccesible se convierte en un epítipo accesible eliminando el impedimento (por ejemplo plegamiento erróneo o agregación) que impide o reduce significativamente la modificación del epítipo diana mediante el agente de bloqueo. El epítipo inaccesible que se convierte en un epítipo accesible también puede denominarse “epítipo revelado”.

25 “Agente de detección” se refiere a un agente que se une a un epítipo y que puede detectarse, tal como un anticuerpo específico para epítopos de polipéptidos priónicos que pueden usarse para detectar con sonda la muestra que contiene el polipéptido. El agente de detección se usa tras desplegarse el polipéptido de manera que la detección se une preferentemente a los epítopos no bloqueados, no modificados.

30 “Proteína de enfermedad o polipéptido de enfermedad” se refiere a un polipéptido asociado con un estado de enfermedad o trastorno en donde la conformación modular o de orden superior del polipéptido difiere de la conformación de tipo natural o sin enfermedad e incluye mutantes, variantes y versiones polimórficas del mismo. Una proteína de enfermedad o polipéptido de enfermedad también puede denominarse proteína o polipéptido de conformación de tipo no natural. La conformación modular se refiere a cambios conformacionales en la estructura tridimensional de una única molécula de proteína. La conformación de orden superior se refiere a cambios conformacionales en la estructura tridimensional de muchas moléculas de proteína agregadas entre sí. La agregación puede consistir en una o más proteínas diferentes y puede asociarse con moléculas distintas de proteínas. Los polipéptidos candidatos de tipo natural y de tipo no natural, incluyendo proteínas o polipéptidos de enfermedad, también incluyen proteínas recombinantes, tales como polipéptidos expresados de manera celular (es decir bacterias, usando sistemas de baculovirus, etc.) y polipéptidos traducidos *in vitro*.

35 “Conformación plegada de tipo natural” se refiere a la conformación plegada de tipo natural de una proteína en un estado sin enfermedad o sin trastorno.

40 “Conformación con plegamiento erróneo” se refiere a la conformación plegada de un polipéptido en un estado de enfermedad o trastorno en donde la conformación difiere de la conformación de tipo natural. La diferencia en la conformación es como resultado de plegamiento diferencial. El plegamiento diferencial puede provocar agregación de proteínas.

45 “Conformación de tipo natural” se refiere a la conformación de un polipéptido en su estado habitual o normal o en un estado de referencia o deseado y puede incluir polipéptido en un estado sin enfermedad o trastorno.

50 “Conformación de tipo no natural” se refiere a una conformación de polipéptido que difiere de la conformación del polipéptido de tipo natural y puede incluir una conformación de polipéptido en una enfermedad o un trastorno, en donde la conformación difiere de la conformación de tipo natural. La diferencia en la conformación puede ser como resultado de plegamiento diferencial, agregación de polipéptidos o modificación postraduccional diferencial en comparación con el polipéptido de tipo natural. En el caso de agregación de polipéptidos, la agregación puede impedir la accesibilidad del epítipo en vez de la conformación cambiada.

55 Enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Parkinson/demencia por cuerpos de Lewy (PD, LBD) suponen retos importantes para la población en envejecimiento y el sistema de atención sanitaria. No existe una prueba bioquímica específica para enfermedades

neurodegenerativas como grupo (1, 2). AD, ALS y PD/LBD esporádicas están todas asociadas con acumulación neural de multímeros patológicos de polipéptidos con plegamiento erróneo (tales como fibrillas, protofilamentos y agregados amorfos), incluyendo el fragmento Abeta de la proteína precursora de amiloide (APP) en AD; superóxido dismutasa-1 (SOD1) en ALS, y alfa-sinucleína en PD y LBD (1). Como con las enfermedades priónicas, mutaciones

5 en genes que codifican para estos polipéptidos propensos a agregación están asociadas con formas familiares autosómicas dominantes de AD, ALS y PD. La detección de agregados de polipéptidos con plegamiento erróneo asociados con enfermedad permite pruebas de diagnóstico *antemortem* sensibles y específicas para enfermedades neurodegenerativas.

10 Para ello, los inventores han inventado el “ensayo de protección de epítomos” (EPA), una tecnología innovadora para la detección de polipéptidos agregados en tejidos y líquidos biológicos accesibles, tales como sangre y LCR, que sirven como “sumideros” para los agregados liberados desde neuronas moribundas. El método consiste opcionalmente en:

- 15 - hacer reaccionar una muestra con un agente de modificación química;
- desagregar y desnaturalizar los polipéptidos tratados;
- 20 - detectar con sonda la muestra con agentes de detección tales como anticuerpos contra epítomos específicos bloqueados mediante el modificador químico; y
- detectar polipéptidos unidos a agente (por ejemplo, mediante ELISA).

25 Los polipéptidos solubles normales en la muestra se vuelven “invisibles” en el ensayo, porque no se detectan epítomos accesibles mediante un agente de detección (por ejemplo bloqueados para el reconocimiento por anticuerpos), mientras que una proporción de polipéptidos en los agregados se “protegen” frente a la modificación química en virtud de su secuestro interior, y todavía están disponibles para su detección mediante un agente de detección (por ejemplo anticuerpo de unión) tras la desagregación.

30 Los métodos de la invención son útiles para diagnosticar enfermedades caracterizadas por plegamiento erróneo y/o agregación de polipéptidos tales como en las enfermedades mencionadas anteriormente o para enfermedades o trastornos caracterizados por polipéptidos con epítomos diana accesibles de manera diferencial por lo demás en conformaciones de proteína de enfermedad y de tipo natural.

35 Los presentes inventores también han encontrado que el tratamiento de polipéptido priónico de ratón recombinante (rmPrP) a bajo pH en presencia de bajas concentraciones de agentes desnaturalizantes provoca que el polipéptido adquiera un contenido aumentado de láminas beta, reminiscente de la isoforma de polipéptido priónico asociado con enfermedad con plegamiento erróneo, PrP^{Sc}. Esta conversión de rmPrP está asociada con un aumento de la accesibilidad al disolvente de cadenas laterales de tirosina⁴. Los inventores han encontrado que el tratamiento de

40 homogeneizado de cerebro normal con ácido y agentes desnaturalizantes provoca que PrP se vuelva insoluble en detergente (29). Con el fin de detectar con sonda la accesibilidad en superficie de tirosinas y otros residuos en PrP^C normal y con plegamiento erróneo, se trató tejido cerebral humano normal y con plegamiento erróneo por ácido con el compuesto de nitración química peroxinitrito. El tratamiento con peroxinitrito de tejido cerebral provocó una

45 reducción de la unión de los anticuerpos anti-PrP 3F4 y 6H4 tal como se mide mediante inmunotransferencia, inmunoprecipitación y ELISA. El bloqueo de epítomos inducido por peroxinitrito era más pronunciado en PrP de cerebro normal que en PrP con plegamiento erróneo, mostrando un efecto protector de la agregación. Se observaron hallazgos similares en cerebro de hámster normal e infectado con tembladera, en las que los epítomos de 3F4 y 6H4 de PrP de cerebro con tembladera se protegieron parcialmente frente a la modificación inducida por peroxinitrito. La inmunoprecipitación de cerebro tratado con peroxinitrito con anticuerpos anti-nitrotirosina sugiere

50 que o bien PrP se nitra en los residuos de tirosina o bien otro polipéptido en proximidad a PrP se nitra e inmunoprecipita conjuntamente PrP.

Por consiguiente, la invención incluye un método de determinación de la agregación de polipéptidos, incluyendo pero sin limitarse a PrP^{Sc}, que comprende:

- 55 • hacer reaccionar una muestra con un agente de modificación química en donde tal agente podría ser, pero sin limitarse a, peroxinitrito
- 60 • desagregar y/o desnaturalizar la muestra modificada químicamente con calor, detergente o agentes caotrópicos; y
- detectar con sonda con anticuerpos específicos para epítomos de polipéptidos priónicos.

65 Los inventores han mostrado además que los métodos de la invención son útiles para detectar proteínas de enfermedad de Alzheimer.

En una realización, el método de detección de enfermedad de Alzheimer comprende:

- 5 - hacer reaccionar una muestra de polipéptido (la muestra contiene normalmente la totalidad o parte de una proteína o un polipéptido de enfermedad tal como polipéptido precursor amiloide o amiloide-beta o tau y/o el polipéptido de tipo natural correspondiente, y en muchos casos una abundancia de uno u otro) con un agente de modificación química, normalmente un agente de bloqueo tal como peroxinitrito, que modifica epítomos expuestos de modo que no pueden unirse a un agente de detección;
 - 10 - desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
 - detectar con sonda con agentes de detección, tales como un anticuerpo contra un epítomo diana para determinar si el polipéptido antes de la desagregación y/o desnaturalización incluía epítomos diana inaccesibles.
- 15 Filamentos en placa o vasculares que contienen Abeta también están asociados con estados tales como trisomía 21 (síndrome de Down), hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (HCHWA)-tipo holandés y envejecimiento cerebral normal (Mori, H *et al.* JBC (1992) 267: 17082-86). Por consiguiente, en una realización, la detección de proteína de enfermedad Abeta es pronóstico de enfermedades HCHWA-tipo holandés o envejecimiento cerebral normal.
- 20 Además, los métodos de la invención pueden combinarse con otros métodos de diagnóstico tales como exploraciones mediante obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI) o tomografía computerizada (CT) para confirmar el diagnóstico.
- 25 Los métodos de la invención son útiles para detectar una diana que incluye proteína o polipéptido que existe en dos o más conformaciones, en donde uno o más epítomos diana están ocultos en al menos una conformación.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método de detección que comprende:

- 30 - hacer reaccionar un polipéptido con un agente de modificación química, normalmente un agente de bloqueo, que se define que modifica epítomos expuestos de modo que no pueden unirse a agentes de detección;
 - desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
 - 35 - detectar con sonda con agentes de detección, tales como anticuerpos contra un epítomo diana para determinar si el polipéptido antes de la desagregación y/o desnaturalización incluía epítomos diana inaccesibles para el agente de modificación química.
- 40 El resultado indica si el polipéptido incluye epítomos inaccesibles, lo que es indicativo del tipo de polipéptido que está presente (es decir proteína de tipo natural o de tipo no natural).

La invención también incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítomo diana que ha reaccionado con un agente de bloqueo está en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural, que comprende:

- 45 - modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítomo diana inaccesible en un epítomo diana accesible; y
- 50 - poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítomo diana que se convirtió de un epítomo diana inaccesible en un epítomo diana accesible, en el que la unión entre el agente de detección y el epítomo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítomo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural.

55 En otra aplicación, la invención también incluye un método de detección de un polipéptido modificado de manera intrínseca, en el que la modificación protege al epítomo diana frente a la reacción con el agente de detección, que comprende:

- 60 - poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente un epítomo diana accesible, en el que en una de la conformación de tipo no natural o la conformación de tipo natural, el epítomo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la otra conformación, el epítomo diana es inaccesible y no reacciona con el agente de bloqueo;
- 65 - hacer reaccionar la muestra con un agente que elimina la modificación intrínseca del epítomo diana de polipéptido modificado de manera intrínseca;

- desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
- detectar con sonda con un agente de detección, tal como anticuerpos contra el epítipo diana, para determinar si el polipéptido candidato es un polipéptido modificado de manera intrínseca.

5

Agentes de modificación química

El agente de modificación química de la invención comprende cualquier compuesto químico (incluyendo un agente biológico) que modifica residuos de epítipos diana de manera que el epítipo se vuelve invisible mediante los métodos de la invención (es decir, no se detecta mediante el agente de detección o se reduce la detección). Por ejemplo, el peroxinitrito modifica preferentemente tirosina, serina, metionina, histidina y triptófano así como cisteína y otros aminoácidos (25, 26). DEPC modifica preferentemente histidinas (37), y el anhídrido succínico modifica preferentemente residuos que comprenden aminas. Los epóxidos, incluyendo conduritól-B-epóxido y 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano) son un grupo de reactivos usados ampliamente para la "inhibición suicida" de cadenas laterales de grupo carboxilo, tales como los residuos catalíticos de aspartil proteasas (19, 20). El peróxido de hidrógeno y el metileno también son útiles. Los compuestos químicos pueden modificar el epítipo diana oxidando, nitrando, reduciendo o modificando de otro modo el epítipo. Además, el epítipo puede modificarse mediante un agente de modificación química que es un grupo fosfato (mediante fosforilación), o un grupo glicosilo (mediante glicosilación), y/u otro grupo químico que oculta el epítipo diana.

10

15

20

Por consiguiente, en una realización, el agente de modificación química se elige del grupo de peroxinitrito, DEPC, peróxido de hidrógeno, anhídrido succínico, metileno y epóxidos (conduritól-B-epóxido y 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano y/o variantes relacionadas de los mismos.

25

Tras reaccionar con polipéptido candidatos, se elimina el agente de modificación química. Resulta fácilmente evidente para un experto que las etapas del método de la invención mencionadas en el presente documento que implican eliminar el agente de bloqueo normalmente implican eliminar física, químicamente o de otro modo el agente de bloqueo del polipéptido candidato para impedir su reacción adicional. La eliminación implica opcionalmente dejar que pase un tiempo suficiente de modo que el agente de bloqueo se retire del polipéptido candidato al consumirse o degradarse (por ejemplo, de manera que el agente de bloqueo se vuelve inerte o se oxida). La eliminación implica opcionalmente añadir un compuesto para que reaccione con cualquier cantidad de agente de bloqueo en exceso para inactivarlo. La eliminación también implica opcionalmente la filtración física del agente de bloqueo mediante técnicas de filtración convencionales o centrifugación para separar el polipéptido candidato y agente de bloqueo, o la unión física a un sustrato útil para eliminar el agente de bloqueo, tal como mediante unión del agente de bloqueo o polipéptido candidato a un sustrato inmovilizado en una columna.

30

35

Eliminar significa impedir reacciones adicionales mediante el agente de bloqueo, por ejemplo, inactivando física o químicamente el agente de bloqueo, extrayendo el agente de bloqueo del contacto con la muestra que incluye el polipéptido candidato o permitiendo que pase una cantidad de tiempo suficiente para que el agente de bloqueo se consuma o se degrade.

40

La modificación química de un epítipo diana conduce al ocultamiento de un epítipo frente al reconocimiento por anticuerpos. En una realización, el tratamiento con un agente de bloqueo tal como peroxinitrito conduce a la destrucción de epítipos en proteínas monoméricas pero no epítipos en proteínas agregadas tales como proteínas de enfermedad o polipéptidos de tipo no natural.

45

Tratamiento previo

Los métodos de la invención también contemplan el tratamiento previo de la muestra para potenciar la detección mediante EPA. Por ejemplo si se observa una disminución de la detección de proteínas agregadas tales como priones en sangre u orina, se emplean fácilmente estrategias de limpieza previa para potenciar la detección con detergentes, agentes de precipitación y adsorbentes tales como los usados normalmente en ensayos ELISA comerciales que conoce un experto en la técnica. También pueden tratarse previamente muestras de polipéptido con agentes tales como detergentes o guanidina o calor. Finalmente las muestras pueden concentrarse o limpiarse previamente mediante métodos tales como centrifugación. Por consiguiente, en una realización, las muestras se tratan previamente antes de emplear un método de la invención.

50

55

Detección de proteínas o polipéptidos agregados o con plegamiento erróneo

Los inventores han encontrado un método que detecta polipéptidos que tienen epítipos diana que son accesibles para la detección en una conformación e inaccesibles en otra mediante la modificación de epítipos inaccesibles mediante un agente de modificación. Los inventores han identificado varios epítipos que son útiles como epítipos diana en los métodos de la invención. Se identifican otros epítipos diana tal como se describe a continuación.

60

65

Epítomos diana

Se identifican epítomos diana para polipéptidos que existen en dos o más conformaciones en las que los epítomos que pueden detectarse mediante agentes de detección tales como anticuerpos, aptámeros o péptidos, son accesibles en una conformación e inaccesibles en la otra conformación. Cuando se encuentra que un epítomo está bloqueado frente a la detección por un agente de bloqueo en una conformación del polipéptido, el epítomo es un epítomo diana. Para identificar epítomos diana, se elige un agente de detección tal como un anticuerpo. Si el agente de detección es un anticuerpo, es preferiblemente un anticuerpo monoclonal aunque también pueden utilizarse anticuerpos policlonales. El epítomo, que puede ser un epítomo lineal o no lineal, y que se reconoce específicamente por el anticuerpo, es opcionalmente un epítomo conocido. Se elige un agente de modificación química candidato tal como peroxinitrato. Si se conoce el epítomo reconocido por el agente de detección, el agente de modificación química candidato se elige preferiblemente basándose en su capacidad para modificar residuos de aminoácido en el epítomo diana. Por ejemplo, el peroxinitrito modifica preferentemente residuos de tirosina e histidina con cierta modificación de cisteína y otros aminoácidos. El peroxinitrito se elige opcionalmente como agente de modificación química si están presentes tirosinas y/o histidinas en el epítomo diana. Se hacen reaccionar alícuotas de una muestra que comprende polipéptido de tipo natural y alícuotas de una muestra que comprende polipéptido de tipo no natural con concentraciones crecientes del agente de modificación química elegido. Cada muestra comprende uno o más de polipéptido recombinante, extractos celulares o muestras de tejido que se sabe que expresan el polipéptido en la conformación o bien de tipo natural o bien de tipo no natural. Preferiblemente, las muestras de polipéptido tienen concentraciones similares de polipéptido. La muestra de polipéptido de conformación de tipo no natural se obtiene alternativamente tratando un polipéptido en conformación de tipo natural con un agente, tal como ácido, que induce la conversión a una conformación de tipo no natural.

Cada muestra de polipéptido se desnatura y/o se desagrega para convertir cualquier supuesto epítomo diana inaccesible en un epítomo diana accesible. Cada muestra de polipéptido se pone en contacto entonces con el agente de detección elegido. Se realiza la detección usando técnicas conocidas en la técnica tales como ELISA e inmunotransferencia de tipo Western. Se comparan la cantidad de señal generada por el agente de detección para una muestra que comprende polipéptido en una conformación de tipo natural tratada con agente de protección y para una muestra que comprende polipéptido, en una conformación de tipo no natural tratada con agente de protección. Una diferencia en la detección en una o más concentraciones de agente de modificación química indica que el epítomo está protegido en una conformación e indica además que el epítomo es un epítomo diana. Una diferencia a lo largo de un intervalo de concentraciones de agente de modificación química indica que el epítomo diana es útil para EPA. El proceso se repite con diferentes agentes de bloqueo y/o agentes de detección y se identifican epítomos diana. Habitualmente, se normaliza y se valora el agente de bloqueo y se realizan experimentos usando un modificador químico "universal" tal como metileno^{24,25} que opcionalmente produce una protección más uniforme y completa del epítomo diana.

Por consiguiente en un ejemplo, un método de identificación de un epítomo diana en un polipéptido que tiene dos o más conformaciones en las que el epítomo diana es accesible para la detección en una conformación e inaccesible en otra conformación, comprende:

- hacer reaccionar una muestra que comprende polipéptido en una conformación de tipo natural y una muestra que comprende polipéptido en una conformación de tipo no natural normalmente con una o más concentraciones de un agente de modificación química;
- desnaturar y/o desagregar cada muestra para convertir cualquier epítomo diana inaccesible en un epítomo diana accesible;
- poner en contacto las muestras con un agente de detección; y
- comparar la señal generada por el agente de detección para muestras que comprenden polipéptido en una conformación de tipo natural tratadas con agente de modificación química y para muestras que comprenden polipéptido en una conformación de tipo no natural tratadas con agente de modificación química, en las que una diferencia en la detección entre la muestra que comprende polipéptido de tipo natural y la muestra que comprende muestra de tipo no natural indica que el epítomo está protegido en una conformación e indica además que el epítomo es un epítomo diana.

Condiciones para EPA

Los experimentos de valoración con peroxinitrito, peróxido de hidrógeno y metileno (basándose en la fotólisis con luz UV de la diazirina precursora) u otros agentes de modificación, son útiles para mejorar las condiciones para la protección de epítomos.

Se hacen reaccionar opcionalmente muestras que se sabe que contienen polipéptidos en dos o más conformaciones, incluyendo proteínas de enfermedad, usando inmunotransferencia y ELISA. En cada caso, se

preparan las muestras y opcionalmente se mezclan con concentraciones crecientes del agente de modificación y se procesan, por ejemplo, mediante inmunotransferencia, ELISA y/o fluorescencia con resolución temporal. Esto define el tipo y la concentración de agente químico que permiten la máxima distinción entre proteínas monoméricas y agregadas incluyendo proteínas de enfermedad. Experimentos informativos adicionales pueden implicar el uso de

5 proteína de enfermedad (tal como proteínas priónicas tratadas con ácido o proteínas p53 mutantes y otras proteínas enumeradas en esta solicitud) recombinante (de tipo no natural) y proteína normal (de tipo natural) en lugar de muestras que contienen proteínas de enfermedad.

En algunos casos, las proteínas de enfermedad pueden tener diferentes propiedades para la modificación química que las que tienen las proteínas de enfermedad recombinantes, y las proteínas de enfermedad en un tipo de muestra (tal como tejido cerebral) pueden presentar diferentes propiedades de modificación química que las proteínas de enfermedad que circulan en la sangre, o que pueden detectarse en orina. Un experto en la técnica identificará fácilmente las condiciones óptimas para priones endógenos usando técnicas conocidas.

15 El EPA logra una utilidad comercial superior detectando proteínas de enfermedad en tejidos y líquidos biológicos para lo que no existe una tecnología actual. Algunas proteínas de enfermedad tienen una abundancia muy baja. Por ejemplo, los priones tienen una abundancia muy baja (10-100 priones/ml mediante ensayo biológico), y PrP resistente a proteasas en orina sólo puede detectarse de manera intermitente/espóradica mediante precipitación de grandes volúmenes de fluido. Además, cualquier análisis de sangre futuro debe enfrentarse a altas concentraciones

20 de proteína de tipo natural (es decir para PrP^C (normalmente 10⁶ veces más que para PrP^{Sc}) y “bloqueo” por proteínas plasmáticas heterólogas. Usando el régimen optimizado de modificación química y el sistema DELFIA-TRF, los umbrales de sensibilidad para EPA en sangre y orina se determinan opcionalmente usando:

25 1. Plasma y orina de animal y ser humano “con adiciones conocidas” con una valoración de proteína de enfermedad;

2. Plasma y orina de animales con enfermedad modelo que expresan una proteína de enfermedad.

Los líquidos biológicos clínicamente accesibles por vías no invasivas proporcionan un sustrato para una prueba *antemortem* práctica para el diagnóstico y el examen de enfermedades que implican proteínas de enfermedad agregadas en seres humanos y animales. Los métodos de esta invención también son útiles en pruebas *postmortem*. Un experto en la técnica determina fácilmente si el EPA con valoración “con adiciones conocidas de proteína de enfermedad” en sangre y orina normales revela señales de DELFIA-TRF similares con respecto a la misma valoración de proteína de enfermedad en tampón, mostrando que el EPA se no ve afectado por “factores de

35 bloqueo” en estos líquidos biológicos. El “bloqueo” preferente de proteína de enfermedad por proteínas heterólogas puede potenciar realmente la protección de epítomos frente a agentes de modificación química. Si se observa una disminución de la detección de proteína de enfermedad en sangre u orina, se emplean fácilmente estrategias de limpieza previa para potenciar la detección de proteína de enfermedad, por ejemplo, con detergentes, agentes de precipitación y adsorbentes usados normalmente en ensayos ELISA comerciales que conoce un experto en la técnica.

En una realización, los métodos de la invención implican la detección de epítomos diana en polipéptidos con plegamiento erróneo o agregados. En otra realización, la invención proporciona un método para mejorar u optimizar la detección de polipéptidos que pueden existir en 2 o más conformaciones. En otra realización, la detección de polipéptidos con plegamiento erróneo y/o agregados es indicativa de enfermedad (proteínas de enfermedad). En otra realización, se detectan los polipéptidos usando agentes de detección tales como anticuerpos, aptámeros o péptidos que se unen específicamente a epítomos de polipéptidos que pueden modificarse químicamente. En otra realización, estos polipéptidos son proteínas de enfermedad. Los anticuerpos frente a epítomos de proteína candidatos son anticuerpos disponibles comercialmente o se preparan fácilmente por un experto en la técnica e

50 incluyen fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de cadena sencilla. Todos los métodos mencionados anteriormente se implementan fácilmente usando las etapas descritas en esta solicitud.

Anticuerpos

55 La invención contempla el uso de anticuerpos conocidos como agente de unión incluyendo biotina-3F4 y 3F4 y 6H4 que reconocen proteínas de enfermedad priónicas. 3F4 reacciona frente al epítomo MKHM y 6H4 reacciona frente al epítomo DYEDRYRE. Adicionalmente, 6E10 que reconoce Abeta, reacciona frente al epítomo EFRHDS (residuos 3-8).

60 En la siguiente tabla se enumeran otros anticuerpos y los epítomos reconocidos (si se conocen) que se usan opcionalmente con los métodos de la invención.

Tabla. Anticuerpos útiles para detectar para detectar proteínas de enfermedad

Proteína	Anticuerpo	Mono/poli	Epítipo	Empresa
Abeta	4G8	Monoclonal	Dentro de aa 18-22 de Abeta humano	Signet
	6E10	Monoclonal	Dentro de aa 3-8 de Abeta humano	Signet
	ab2539	Policlonal	NA	Abcam
	Abeta-NT	Policlonal	NA	QED Bioscience
	DE2B4	Monoclonal	Dentro de aa 1-17 de Abeta humano	Acris antibodies
	NBA-104E	Monoclonal	Dentro de aa 1-16 de Abeta humano	Stressgen
Alfa-sinucleína	4D6	Monoclonal	Desconocido	Acris antibodies
	ab6162	Policlonal	NA	Abcam
	LB509	Monoclonal	Desconocido	Zymed
	Syn-1	Monoclonal	Dentro de aa 91-99 de a-sin humana	BD Biosciences
	Syn-204	Monoclonal	Dentro de aa 87-110 de a-sin humana	Lab Vision
	Syn-211	Monoclonal	Dentro de aa 121-125 de a-sin humana	Lab Vision
Tau	Anti-Tau-1' de ratón	Monoclonal	Dentro de aa 95-108 de tau humana	Biomeda
	Anti-Tau-2 de ratón	Monoclonal	Desconocido	Stressgen
	T14	Monoclonal	Dentro de aa 141-178 de tau humana	Zymed
	T46	Monoclonal	Dentro de aa 404-441 de tau humana	Zymed
	Tau-2	Monoclonal	Desconocido	Acris antibodies
	Tau-5 (ab3931)	Monoclonal	Desconocido	Abcam
SOD1	SOD1 de ratón	Monoclonal	Desconocido	Sigma-aldrich
	SOD1 de conejo	Policlonal	Desconocido	Stressgen
	SOD1 de rata	Policlonal	Desconocido	Stressgen
	SOD1 de oveja	Policlonal	Desconocido	OxisResearch

- 5 Se preparan anticuerpos frente a epítipos de proteína de enfermedad usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, usando un péptido de una proteína de enfermedad que incluye un supuesto epítipo diana, se preparan anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales usando métodos convencionales. Puede inmunizarse un mamífero (por ejemplo, un ratón, hámster o conejo) con una forma inmunogénica del péptido que provoca una respuesta de anticuerpos en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en un péptido incluyen conjugación con portadores u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la proteína o el péptido se administran en presencia de adyuvante. Puede monitorizarse el avance de la inmunización mediante la detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Se usan opcionalmente procedimientos de ELISA convencionales u otros procedimientos de inmunoensayo con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Tras la inmunización, pueden obtenerse antisueros y, si se desea, anticuerpos policlonales aislados de los sueros.
- 10
- 15 Para producir anticuerpos monoclonales, opcionalmente se recogen células productoras de anticuerpos (linfocitos) de un animal inmunizado y se fusionan con células de mieloma mediante procedimientos convencionales de fusión de células somáticas, inmortalizando por tanto estas células y produciendo células de hibridoma. Tales técnicas se

conocen bien en la técnica, (por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originariamente por Kohler y Milstein (Nature 256, 495-497 (1975)) así como otras técnicas tales como la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, Immunol. Today 4, 72 (1983)), la técnica del hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.* Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., páginas 77-96), y examen de bibliotecas combinatorias de anticuerpos (Huse *et al.*, Science 246, 1275 (1989)). Pueden examinarse de manera inmunoquímica las células de hibridoma para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con el péptido y pueden aislarse los anticuerpos monoclonales.

También se contemplan dentro del alcance de la invención derivados de anticuerpos quiméricos, es decir, moléculas de anticuerpo que combinan una región variable de animal no humano y una región constante humana. Las moléculas de anticuerpo quiméricas incluyen, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de un ratón, una rata, u otras especies, con regiones constantes humanas. Los métodos convencionales usados para preparar anticuerpos quiméricos que contienen la región variable de inmunoglobulina que reconoce epítomos de proteína de enfermedad de la invención (véanse, por ejemplo, Morrison *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851 (1985); Takeda *et al.*, Nature 314, 452 (1985), Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Boss *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.397; Tanaguchi *et al.*, publicación de patente europea EP171496; publicación de patente europea 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B).

Se generan fácilmente anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, específicos tales como, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales Fv de cadena sencilla reactivos frente a epítomos de proteína de enfermedad examinando bibliotecas de expresión que codifican para genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias con péptidos producidos a partir de las moléculas de ácido nucleico de proteínas de enfermedad. Por ejemplo, se expresan fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones FV en bacterias usando bibliotecas de expresión en fago (véanse por ejemplo Ward *et al.*, Nature 341, 544-546: (1989); Huse *et al.*, Science 246, 1275-1281 (1989); y McCafferty *et al.* Nature 348, 552-554 (1990)). Alternativamente, se usa un ratón SCID-hu, por ejemplo el modelo desarrollado por Genpharm, para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos.

Anticuerpos específicamente reactivos con epítomos de proteína de enfermedad, o derivados, tales como conjugados enzimáticos o derivados marcados, son útiles para detectar epítomos de proteína de enfermedad en diversas muestras (por ejemplo materiales biológicos). Son útiles como reactivos de diagnóstico o pronóstico y se usan fácilmente para detectar anomalías en el nivel de expresión de proteínas, o anomalías en la estructura y/o ubicación temporal, tisular, celular o subcelular de epítomos de proteína de enfermedad. También son útiles inmunoensayos *in vitro* para evaluar o monitorizar la eficacia de terapias particulares. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse *in vitro* para determinar el nivel de expresión de un gen de un polipéptido que existe en dos o más conformaciones tal como una proteína de enfermedad en células modificadas mediante ingeniería genética para producir la proteína de enfermedad.

Los anticuerpos son útiles en cualquier inmunoensayo conocido que se basa en la interacción de unión entre un determinante antigénico de los epítomos de proteína de enfermedad y los anticuerpos. Ejemplos de tales ensayos son radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo ELISA incluyendo ELISA de tipo sándwich), inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, aglutinación en látex, hemaglutinación y pruebas histoquímicas. Los anticuerpos son útiles para detectar y cuantificar la proteína de enfermedad en una muestra para determinar su papel y diagnosticar la enfermedad provocada por la proteína de enfermedad.

En particular, los anticuerpos de la invención son útiles en análisis inmunohistoquímicos, por ejemplo, a nivel celular y subcelular, para detectar una proteína de enfermedad, localizarla en células y tejidos particulares, y en ubicaciones subcelulares específicas, y cuantificar el nivel de expresión.

Se conocen técnicas citoquímicas en la técnica para localizar antígenos usando microscopía óptica y electrónica para detectar polipéptidos tales como proteínas de enfermedad. Generalmente, un anticuerpo de la invención se marca opcionalmente con una sustancia detectable y se localiza el polipéptido reconocido en tejidos y células basándose en la presencia de la sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores luminiscentes tales como luminol; marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa del rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa), grupos biotínico (que pueden detectarse mediante avidina marcada por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos), epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, colas epitópicas). En algunas realizaciones, se unen marcadores a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. También pueden acoplarse anticuerpos con sustancias electrodensas, tales como ferritina u oro coloidal, que se visualizan fácilmente mediante microscopía electrónica.

El anticuerpo o la muestra pueden inmovilizarse sobre un portador o soporte sólido que puede inmovilizar células, anticuerpos etc. Por ejemplo, el portador o soporte puede ser nitrocelulosa, o vidrio, poliacrilamidas, gabros y magnetita. El material de soporte puede tener cualquier configuración posible incluyendo esférica (por ejemplo

perla), cilíndrica (por ejemplo superficie interior de un pocillo o tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla), o plana (por ejemplo lámina, tira de ensayo). También pueden emplearse métodos indirectos en los que se amplifica la reacción antígeno-anticuerpo primaria mediante la introducción de un segundo anticuerpo, que tiene especificidad para el anticuerpo reactivo frente a epítomos de proteína de enfermedad. A modo de ejemplo, si el anticuerpo que

5 tiene especificidad frente a un epítomo de polipéptido tal como un epítomo de proteína de enfermedad es un anticuerpo de IgG de conejo, el segundo anticuerpo puede ser gamma-globulina de cabra anti-conejo marcada con una sustancia detectable tal como se describe en el presente documento.

10 Cuando se usa un marcador radiactivo como sustancia detectable, pueden localizarse proteínas de enfermedad mediante autorradiografía. Pueden cuantificarse los resultados de la autorradiografía determinando la densidad de partículas en las autorradiografías mediante diversos métodos ópticos, o mediante el recuento de los granos.

Aptámeros

15 Los aptámeros también son útiles en los métodos de la invención para detectar polipéptidos tales como proteínas de enfermedad. Los aptámeros son macromoléculas que pueden reconocer dianas tales como proteínas con alta especificidad y sensibilidad.

20 Los aptámeros de ácido nucleico son pequeñas moléculas aisladas de bibliotecas combinatorias mediante un procedimiento denominado evolución sistémica de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) (revisado en Cerchia L *et al*, FEBS Letters 528 (2002) 12-12). Usando esta tecnología, pueden identificarse aptámeros que se unen a proteínas con alta especificidad y selectividad de diana. Las afinidades pueden ser comparables a interacciones de antígeno-anticuerpo. Se ha mostrado la discriminación entre proteína nativa y

25 desnaturalizada (Bianchini *et al*. Immunol Methods (2001) 252:191-97) haciendo que los aptámeros sean agentes de detección útiles para los métodos de la invención.

Los aptámeros de péptidos, también conocidos como paptámeros, proteínas con inserto de tiorredoxina o

30 perturbágenos son proteínas artificiales en las que se expresa un péptido insertado en una superficie expuesta al disolvente de una proteína estructuralmente estable que funciona como armazón (Crawford M. *et al*. Brief Funct Genomic Proteomic. 2003 Apr;2:72-9). Los aptámeros de péptidos pueden funcionar de manera similar a los anticuerpos y tienen constantes de disociación que son comparables a, y a veces mejores que, las de los anticuerpos. Pueden usarse para detectar con sonda proteínas inmovilizadas sobre nitrocelulosa (Crawford M. *et al*. Brief Funct Genomic Proteomic. 2003 Apr;2:72-9). Se ha mostrado que los aptámeros de péptidos presentan diferentes afinidades por pequeños cambios, tales como diferencias de un solo aminoácido, que hacen que sean

35 útiles para la detección de polipéptidos que existen en dos o más conformaciones, tales como proteínas de enfermedad que presentan diferentes conformaciones de plegamiento o agregación.

Por consiguiente, en una realización de la invención, se usan aptámeros de ácido nucleico y/o péptidos con los métodos de la invención para distinguir entre proteínas de conformación de tipo natural y de enfermedad. En una

40 realización, la proteína de enfermedad es una proteína priónica. En otra realización, la proteína de enfermedad es amiloide-beta. En otra realización, la proteína de enfermedad es proteína tau. En otra realización, la proteína de enfermedad es alfa-sinucleína. En otra realización, la proteína de enfermedad es SOD-1.

Desnaturalización y desagregación

45 En los métodos, el polipéptido se modifica opcionalmente desnaturalizando el polipéptido, por ejemplo con calor, detergente y/o agentes caotrópicos. El polipéptido se modifica opcionalmente mediante tratamiento con un agente de desagregación para desagregar el polipéptido de otros polipéptidos del mismo tipo, y de otras moléculas, en los que el agente de desagregación se selecciona opcionalmente de al menos uno del grupo que consiste en agentes caotrópicos, detergente y calor. Los agentes caotrópicos pueden incluir, pero no se limitan a, tales como sales de guanidina, urea y tiourea.

50

Los inventores han mostrado que el tratamiento de proteínas con clorhidrato de guanidina aumenta la cantidad de proteína protegida detectable.

55

La combinación de métodos de desagregación puede dar como resultado una desagregación optimizada. Por ejemplo, la ebullición de muestras en tampón de carga de dodecilsulfato de sodio (SDS; también conocido como laurilsulfato de sodio) puede aumentar la solubilización de polipéptidos tales como proteínas de enfermedad, aumentando los epítomos disponibles para interactuar con el agente de detección. Por ejemplo, la ebullición de

60 muestras en tampón de carga de SDS da como resultado una solubilización potenciada, y permite la detección de epítomos protegidos mediante ELISA de tipo sándwich. El sistema de ensayo ELISA de tipo sándwich puede identificar proteína de enfermedad agregada en muestras de homogeneizado de tejido si las muestras se llevan a ebullición en tampón de carga de SDS tras tratamiento con peroxinitrito. A concentraciones de peroxinitrito mayores de 8 mM, hay 2,5-3 veces como mucho de PrP detectada en la muestra tratada con ácido en comparación con la muestra tratada de manera simulada. Por consiguiente, en una realización la muestra se lleva a ebullición en carga

65 de SDS tras el tratamiento con agente de modificación y antes de la detección con un agente de detección tal como

un anticuerpo.

ELISA de dos puntos por fluorescencia con resolución temporal (TRF), y fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA)

5 Tal como se mencionó previamente, pueden emplearse técnicas de ELISA mediante los métodos de la invención. El ELISA de dos puntos por fluorescencia con resolución temporal que emplea la tecnología de fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA) es 1000 veces más sensible que las técnicas de ELISA convencionales y puede usarse con los métodos de la invención para detectar polipéptidos agregados *in vitro*, en
10 tejido neural de modelos de neurodegeneración en ratón transgénico, y en muestras cerebrales de pacientes con AD, ALS, PD y LBD humanos.

15 El ensayo DELFLIA usa un trazador marcado con lantánido quelado, tal como europio (Eu) y fluorescencia con resolución temporal (TRF) para medir la señal de salida (33). El beneficio de los quelatos de lantánidos es que su fluorescencia es intensa y dura hasta 200.000 veces más tiempo que la de fluoróforos convencionales, lo que permite la captura de señal tras haber desaparecido la fluorescencia de interferencia inespecífica (particularmente crítica para muestras biológicas, que pueden presentar fluorescencia intrínseca considerable, cuya emisión es de vida corta comparativamente). Los sistemas basados en DELFLIA pueden medir tan sólo 100 fmol/pocillo de Eu (33).

20 En una realización de la invención, se emplean un agente de modificación química y un anticuerpo en un sistema de DELFLIA TRF en placa de 96 pocillos de tipo "sándwich" de detección por captura sensible en la detección de proteínas específicas de enfermedad agregadas descritas en el presente documento, tales como Abeta, tau, SOD1, huntingtina, alfa-sinucleína, polipéptido amiloide del islote, resistina y p53.

25 Un EPA de dos puntos aumenta la especificidad para la detección de proteínas secuestradas en agregados de una muestra clínica. En una realización, están presentes dos o más epítopos modificables químicamente en cada polipéptido de prueba, lo que aumentaría la especificidad de pruebas de diagnóstico que empleasen esta tecnología (por ejemplo, el uso en ELISA de dos puntos). En una realización, los epítopos modificables químicamente se modifican mediante el mismo producto químico. En otra realización, los epítopos se modifican mediante uno de dos
30 o más productos químicos diferentes. Los epítopos modificados pueden reconocerse por el mismo anticuerpo o pueden reconocerse por dos o más anticuerpos diferentes. Para uso clínico y comercial, el EPA debe ser sensible y específico para polipéptidos agregados *in vitro* e *in vivo*. Con anticuerpos y regímenes de modificación química óptimos, y el sistema DELFLIA-TRF, EPA puede detectar 10^5 - 10^6 moléculas de polipéptidos solubles. Esto puede corresponder a un único agregado de polipéptido, si estos agregados son de tamaño similar a agregados de
35 proteína priónica en enfermedad (35, 36).

Por consiguiente, en una realización, el sistema DELFLIA-TRF EPA puede usarse para identificar proteínas de enfermedad que tienen una abundancia muy baja, de tan sólo un único agregado de polipéptido.

40 Aplicaciones de diagnóstico y examen

Se necesitan urgentemente estrategias de diagnóstico y examen eficaces, eficientes y económicas para el diagnóstico *antemortem* de enfermedades neurodegenerativas humanas, dado el envejecimiento de la población y presión financiera continuada sobre el sistema de atención sanitaria. El EPA obtendrá utilidad clínica mediante la
45 detección de agregados de polipéptido en tejidos y líquidos biológicos relevantes y accesibles, para lo que existe una tecnología actual. En una realización, los métodos de la invención se usan para diagnosticar a individuos que tienen una enfermedad relacionada con proteína de enfermedad. En una realización, la invención se usa para diagnosticar a individuos que tienen una enfermedad neurodegenerativa. En otra realización, la invención se usa para diagnosticar a individuos que tienen una enfermedad neurodegenerativa seleccionada del grupo que comprende enfermedades priónicas, AD, HD, ALS y PD. En una realización adicional, los métodos de la invención se usan de manera *postmortem* para determinar si el individuo tenía una enfermedad relacionada con proteína de
50 enfermedad.

Los métodos de la invención se usan para detectar si un ser humano tiene una enfermedad relacionada con proteína de enfermedad. En otra realización, los métodos se usan para detectar si un animal no humano tiene una enfermedad relacionada con proteína de enfermedad. En una realización adicional, el animal no humano es uno del grupo que comprende ganado, ovejas y cérvidos. En otra realización, los métodos de la invención se usan para detectar si el ganado tiene una enfermedad relacionada con proteína de enfermedad.

60 En una realización, los métodos de la invención se usan para detectar proteínas de enfermedad en muestras biológicas. Las muestras biológicas pueden comprender líquidos biológicos, tales como LCR, suero, sangre, lágrimas, exudados peritoneales u orina, o muestras de tejido tales como biopsias o tejido cerebral. Las muestras en una realización son muestras *antemortem*. En otra realización, son muestras *postmortem*.

65 Los métodos de la invención son útiles para cuantificar la detección de la forma soluble de proteínas relacionadas con enfermedad tales como Abeta, tau, SOD1 huntingtina, alfa-sinucleína, polipéptido amiloide del islote, resistina y

proteína p53.

En otra realización, se usa EPA para determinar la sensibilidad y especificidad de la detección de agregados en homogeneizados de cerebro (APP mutante humana) y LCR (34) de ratón CRND8 y ratones transgénicos SOD1 mutantes para G93A humano (13).

En otra realización, la invención se usa para determinar la sensibilidad y especificidad de la detección de agregados en homogeneizados de cerebro humano normal (tratado y sin tratar a bajo pH) y congelado enfermo (AD, ALS, PD, LBD).

Los métodos de la invención se usan en una realización para garantizar preparaciones derivadas de sangre o tejidos de mamífero o que implican procesos en los que sangre o tejidos de mamífero entran en contacto con preparaciones, están libres de proteínas de enfermedad. En una realización, la preparación es un producto farmacéutico. En otra realización, la preparación es una vacuna. En una realización adicional, la preparación es un cosmético. En una realización, las preparaciones se someten a prueba para detectar proteínas priónicas. En otra realización, las preparaciones se someten a prueba para detectar amiloide-beta. En otra realización, las preparaciones se someten a prueba para detectar proteína tau. En otra realización, las preparaciones se someten a prueba para detectar alfa-sinucleína. En una realización adicional, las preparaciones se someten a prueba para detectar SOD-1.

En otra realización, los métodos de la invención se usan para examinar sangre y hemoderivados (por ejemplo, fracciones sanguíneas tales como plasma sanguíneo o compuestos aislados o fabricados a partir de sangre) usados para transfusiones u otros procedimientos médicos para detectar proteínas de enfermedad. En otra realización, la invención se usa para examinar trasplantes de órganos para detectar proteínas de enfermedad. En una realización, las preparaciones se examinan para detectar proteínas priónicas. En otra realización, las preparaciones se examinan para detectar amiloide-beta. En una realización, las preparaciones se examinan para detectar proteína tau. En otra realización, las preparaciones se examinan para detectar alfa-sinucleína. En una realización adicional, las preparaciones se examinan para detectar SOD-1.

La invención también es útil para garantizar que las fuentes de alimentos están libres de proteínas de enfermedad. En otra realización, los métodos de la invención se usan para someter a prueba productos comestibles derivados de mamíferos tales como carnes y productos cárnicos; y productos lácteos. Es particularmente importante examinar alimentos posiblemente contaminados con tejido neural (tales como "carne separada mecánicamente", y carnes despiezadas que contienen ganglios de la raíz dorsal u otro tejido neural) para detectar contaminación priónica.

Los instrumentos que se usan para procedimientos invasivos también pueden ser una fuente de transmisión de enfermedad. En una realización, se someten a prueba instrumentos usados para procedimientos médicos y quirúrgicos para detectar la presencia de proteínas de enfermedad usando métodos de la invención. En otra realización, se someten a prueba instrumentos usados para higiene dental para detectar la presencia de proteínas de enfermedad.

En una realización adicional, la invención proporciona métodos para garantizar que han sido satisfactorios métodos de descontaminación para eliminar proteínas de enfermedad y tejidos que contienen proteína de enfermedad. En una realización, los métodos de la invención se usan para evaluar procedimientos de descontaminación en una planta procesadora de carne. En otra realización, los métodos de la invención se usan para evaluar la descontaminación en una planta procesadora de alimentos. En otra realización, se someten a prueba instrumentos usados para cirugía u odontología para detectar la presencia de proteínas de enfermedad.

Aplicaciones de pronóstico

Puede monitorizarse de manera periódica la conversión de proteínas priónicas, polipéptido relacionado con enfermedad de Alzheimer u otro polipéptido de enfermedad/trastorno en un sujeto a lo largo del tiempo (por ejemplo en un primer momento y un segundo momento al menos una semana o al menos un mes tras el primer momento) para identificar, por ejemplo, niveles aumentados o disminuidos de PrP^C o niveles aumentados o disminuidos de PrP^{Sc} en el sujeto. Los métodos de la invención también son útiles para medir el nivel de un sujeto de PrP^C o PrP^{Sc} para determinar la respuesta del sujeto a la terapia farmacológica. La disminución de los niveles de proteína priónica en el sujeto a lo largo del tiempo indica una respuesta positiva a la terapia farmacológica. Se usan los mismos métodos con otra proteína de enfermedad o trastorno.

Puesto que muchas enfermedades neurológicas están asociadas con proteínas agregadas, son útiles métodos similares para estas enfermedades y sus proteínas agregadas, incluyendo, pero sin limitarse a: esclerosis lateral amiotrófica (superóxido dismutasa 1), enfermedad de Alzheimer (amiloide-beta), enfermedad de Parkinson (alfa-sinucleína), enfermedad de Huntington (huntingtina), cáncer (p53), diabetes (por ejemplo, polipéptido amiloide del islote y resistina) y otras enfermedades que implican plegamiento, agregación o modificación postraduccional anómalos de la proteína. Una prueba de este tipo es útil en el líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales además de la sangre periférica. En la enfermedad de Alzheimer, el estado de agregación del péptido amiloide-beta

se monitoriza opcionalmente determinando la accesibilidad de dos epítomos detectados por los anticuerpos monoclonales 6E10 y 4G8, además de otros epítomos de amiloide-beta, usando los métodos descritos en esta solicitud, por ejemplo, con un anticuerpo anti-6E10 o anti-4G8 (agente de detección) conocidos en la técnica.

5 Identificación de inhibidores de conversión priónica

Puesto que la invención es útil para detectar diferencias entre polipéptidos, la invención incluye además un ensayo para evaluar si un compuesto candidato puede inhibir o estabilizar la conversión priónica o la formación de otros polipéptidos de enfermedad o trastorno, tales como amiloide-beta, tau y APP en enfermedad de Alzheimer, SOD1 en esclerosis lateral amiotrófica, alfa-sinucleína en la enfermedad de Parkinson y por cuerpos de Lewy, huntingtina en enfermedad de Huntington, polipéptido amiloide del islote y resistina en diabetes y p53 en cáncer. La invención también incluye compuestos para inhibir o estabilizar la conversión priónica (o conversión de otros polipéptidos de enfermedad o trastorno) identificada mediante los métodos descritos en la solicitud. La disminución de la conversión de proteína en un sustrato intermedio de proteína priónica o PrP^{Sc} (u otros polipéptidos de enfermedad o trastorno) muestra que el compuesto candidato es útil para tratar la enfermedad priónica.

Los ensayos de la invención son útiles para examinar compuestos candidatos para determinar si inhiben la formación de PrP^{Sc} (o la formación de otros polipéptidos de enfermedad o trastorno de la proteína de tipo natural). Puede ponerse en contacto la proteína con un compuesto candidato *in vivo* o *in vitro* y luego usarse en los métodos de la invención para determinar si la proteína de tipo natural se ha convertido en PrP^{Sc} o si PrP^{Sc} se ha convertido en la proteína de tipo natural. Se usan métodos similares con respecto a otros polipéptidos de enfermedad o trastorno. Las proteínas recombinantes son útiles para identificar inhibidores de la agregación.

Por tanto, la invención también proporciona métodos para identificar sustancias que inhiben la conversión en PrP^{Sc} (por ejemplo, conversión en proteína priónica de la proteína de tipo natural o del producto intermedio en PrP^{Sc}) que comprende las etapas de:

- hacer reaccionar un polipéptido y una sustancia candidata, y
- determinar si la proteína se ha convertido en PrP^{Sc} usando los métodos de la invención.

Se realizan opcionalmente métodos similares para identificar compuestos que estabilizan el estado priónico de tipo natural, o se unen a PrP^{Sc} y bloquean la conversión de isoformas de PrP^{Sc} recrutables.

La invención también proporciona métodos para identificar sustancias que inhiben la conversión en polipéptidos de enfermedad o trastorno (por ejemplo la conversión de la proteína de tipo natural en la proteína amiloide-beta, tau o APP en la enfermedad de Alzheimer y otras proteínas y enfermedades descritas en esta solicitud) que comprenden las etapas de:

- hacer reaccionar un polipéptido y una sustancia candidata, y
- determinar si la proteína se ha convertido en la proteína amiloide-beta o APP en la enfermedad de Alzheimer usando los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de identificación de sustancias que revierten la formación de PrP^{Sc} que comprende las etapas de:

- hacer reaccionar un polipéptido y una sustancia candidata, y
- determinar si la PrP^{Sc} se ha convertido en la proteína de tipo natural usando los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de identificación de sustancias que revierten la formación de proteína amiloide-beta o APP en la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de:

- hacer reaccionar un polipéptido y una sustancia candidata; y
- determinar si la proteína amiloide-beta o APP en la enfermedad de Alzheimer se ha convertido en la proteína de tipo natural usando los métodos de la invención.

Se usan los mismos métodos con otros polipéptidos asociados con enfermedades y trastornos descritos en esta solicitud.

Pueden someterse a prueba muestras biológicas y bibliotecas disponibles comercialmente para detectar sustancias tales como proteínas o pequeñas moléculas orgánicas que se unen a una proteína. Los inhibidores se dirigen preferiblemente hacia dominios específicos de proteínas de enfermedad tales como proteína priónica. Para lograr

especificidad, los inhibidores deben seleccionar como diana las secuencias únicas y/o características conformacionales de la proteína de enfermedad.

5 Detección de conformación de proteínas

La invención incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana es un polipéptido de conformación de tipo no natural o un polipéptido de conformación de tipo natural, que comprende:

- 10 – poner en contacto el polipéptido candidato con un agente de bloqueo; y
- determinar si el epítipo diana es inaccesible o accesible para la modificación química mediante el agente de bloqueo.

15 La accesibilidad o inaccesibilidad del epítipo diana es indicativa de si el polipéptido candidato es un polipéptido de conformación de tipo no natural o un polipéptido de conformación de tipo natural porque en una de la proteína de tipo no natural y la proteína de tipo natural, el epítipo diana es accesible. En el otro polipéptido, el epítipo diana es inaccesible.

20 En una realización, la invención incluye un método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural, que comprende:

- 25 – poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente el epítipo diana accesible, en el que en una de la conformación de tipo no natural o la conformación de tipo natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la otra conformación, el epítipo diana es inaccesible y no reacciona con el agente de bloqueo;
- retirar el agente de bloqueo sin reaccionar del contacto con el polipéptido (por ejemplo, permitiendo que el agente de bloqueo se consuma o degrade en la muestra que comprende el polipéptido candidato o mediante procesos de retirada físicos o químicos);
- 30 – modificar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible; y
- poner en contacto el polipéptido con un agente de detección que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió del epítipo diana inaccesible al epítipo diana accesible, en el que la unión entre el agente de detección y el epítipo diana convertido indica que antes de la conversión el polipéptido candidato estaba en una conformación en la que el epítipo diana era inaccesible y en el que la ausencia de unión entre el agente de detección y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación en la que el epítipo diana era accesible, indicando de ese modo si el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural o una conformación de tipo no natural.

45 Un polipéptido puede tener más de dos conformaciones. Por ejemplo un polipéptido puede existir en una conformación de tipo natural, en una conformación benigna de plegamiento erróneo, agregada o de otro modo de tipo no natural no asociada con enfermedad, y una conformación asociada con enfermedad (es decir, agregada en estructuras de orden superior). Los métodos de la invención pueden aplicarse para distinguir cada uno de estos estados a través del uso de uno o más agentes de modificación química y/o uno o más agentes de detección tales como anticuerpos.

50 Detección de polipéptidos modificados intrínsecamente

La invención también proporciona un método de detección de polipéptidos que existen en dos o más conformaciones en las que los epítipos diana en una de las conformaciones se modifican mediante un mecanismo intrínseco. El mecanismo intrínseco puede incluir la modificación intracelular y/o postraduccional de un polipéptido tal como fosforilación y/o glicosilación o una modificación que resulta de un aditivo usado en un procedimiento. La modificación intrínseca bloquea un epítipo diana ocultándolo de la detección con un agente de detección. La muestra de polipéptido se hace reaccionar con un agente de bloqueo que reacciona con el epítipo diana disponible en el polipéptido que no se modifica de manera intrínseca. Entonces se elimina la modificación intrínseca. Por ejemplo si la modificación intrínseca es fosforilación, el polipéptido se trata con una fosfatasa que elimina la fosforilación y convierte el epítipo diana inaccesible en el polipéptido modificado de manera intrínseca previamente, en el epítipo accesible. El polipéptido se detecta entonces con un agente de detección tal como un anticuerpo.

60 Por consiguiente en una realización, la invención proporciona un método de detección de epítipos diana modificados de manera intrínseca en un polipéptido que tiene dos o más conformaciones, que comprende:

- 65 – poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo que bloquea selectivamente el epítipo diana

accesible, en el que en una de la conformación de tipo no natural o la conformación de tipo natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la otra conformación, el epítipo diana es inaccesible y no reacciona con el agente de bloqueo;

- 5 – hacer reaccionar la muestra con un agente que elimina la modificación intrínseca del epítipo diana del polipéptido modificado de manera intrínseca;
- desagregar y/o desnaturalizar el polipéptido en la muestra; y
- 10 – detectar con sonda con un agente de detección, tal como anticuerpos contra el epítipo diana, para determinar si el polipéptido candidato es un polipéptido modificado de manera intrínseca.

En una aplicación, los métodos de la invención pueden usarse para detectar si polipéptidos presentes en productos alimenticios se han modificado químicamente mediante los procedimientos de fabricación. Por ejemplo, pueden someterse a prueba productos lácteos para detectar la presencia de formaldehído, que se usa como agente bacteriostático. El formaldehído formila la gamma(2)-caseína (Pizzano R. *et al* J. Agric Food Chem (2004) 52:649-54) ocultando epítipos modificados de la posterior detección mediante el agente de detección.

Kits

20 Los métodos descritos en el presente documento se realizan opcionalmente utilizando kits de diagnóstico preenvasados que comprenden los reactivos necesarios para realizar cualquiera de los métodos de la invención. Por ejemplo, los kits incluyen normalmente al menos un ácido nucleico, péptido o anticuerpo específicos descritos en el presente documento, que se usan convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos, para examinar y diagnosticar a pacientes y para examinar e identificar aquellos individuos que expresan una proteína de conformación de enfermedad. Los anticuerpos del kit pueden comprender anticuerpo completo, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo monoclonal y/o anticuerpo policlonal. Los kits también incluyen opcionalmente al menos un agente químico para modificar epítipos reconocidos por un anticuerpo o aptámero. El kit se basa opcionalmente en tecnología ELISA tal como ELISA de tipo sándwich y DELFIA y puede emplear detergentes, agentes de precipitación (tales como ácido fosfotúngstico) y adsorbentes usados normalmente en tecnología ELISA y conocidos por un experto en la técnica. El kit también incluirá instrucciones detalladas para llevar a cabo los métodos de la invención. Las proteínas recombinantes son útiles para patrones en kits.

Todos de tales ensayos pueden adaptarse y optimizarse para una plataforma sencilla de alto rendimiento.

35 Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente invención.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

El peroxinitrito reacciona de manera diferente con PrP en homogeneizado de cerebro normal y tratado con ácido o con tembladera

45 Cuando se incubaba homogeneizado de cerebro a pH 3,5 en presencia de guanidina, PrP se vuelve insoluble en detergente y es más susceptible a plegamiento erróneo con respecto a una isoforma resistente a PK en presencia de PrP^{Sc} (29). Esta PrP tratada con ácido es un “prión modelo” que tiene parcialmente plegamiento erróneo y/o agregación que se asemeja a las características de PrP^{Sc}. Cuando se incubaba homogeneizado de cerebro simulado (□) y tratado con ácido (●) con concentraciones crecientes de peroxinitrito y luego se somete a inmunotransferencia, hay menos PrP reconocida tanto por 3F4 (figuras 1A y C) como por 6H4 (figuras 1B y D) en homogeneizado de cerebro tratado de manera simulada que en homogeneizado de cerebro tratado con ácido. La PrP en el homogeneizado de cerebro tratado con ácido está protegida frente a la modificación mediante peroxinitrito.

55 Ejemplo 2

La PrP en cerebro de hámster infectado con tembladera está protegida frente a la modificación mediante peroxinitrito

60 El fenómeno de protección de epítipos para “priones modelo” observado en el ejemplo 1 también se observó para proteína priónica con plegamiento erróneo de enfermedad auténtica en cerebro de hámster infectado con tembladera (Ha) (figuras 2A y B). Como con los priones modelo, los epítipos de 3F4 y 6H4 de PrP en el homogeneizado de cerebro Ha^{Sc} están protegidos frente a la modificación mediante peroxinitrito. Queda claro que los “priones modelo” y HaPrp^{Sc} comparten características que proporcionan protección frente a la modificación química mediante peroxinitrito, tal como plegamiento erróneo o agregación diferencial.

65

Ejemplo 3La agregación es responsable de la reducción en modificación de epítomos inducida por peroxinitrito de PrP con plegamiento erróneo

5 Para mostrar que la protección de epítomos de cerebro tratado con ácido y con tembladera se debía a agregación, se trataron muestras con peroxinitrito y luego se incubaron con o sin guanidina antes de la inmunoprecipitación. El tratamiento de las muestras con guanidina disocia los agregados de PrP (43-45) que protegen el polipéptido frente a la modificación mediante peroxinitrito. La incubación de cerebro tratado de manera simulada con guanidina 2,5 M tras el tratamiento con peroxinitrito no mostró un aumento de los epítomo de 3F4 y 6H4 tal como se revela mediante inmunoprecipitación (figura 3A, carriles 1-4). Sin embargo, cuando se incubó con guanidina homogeneizado de cerebro ácido tratado con peroxinitrito, hubo un aumento de PrP que pudo detectarse mediante inmunoprecipitación con inmunoperlas con 3F4 y 6H4 (figura 3A, carriles 5-8). Esto muestra que la guanidina puede disociar agregados de homogeneizado de cerebro tratado con ácido y liberar PrP que está protegida frente a la modificación mediante peroxinitrito. Se usaron otros medios de solubilización de agregados de PrP y la ebullición de muestras en tampón de carga de SDS dio como resultado la mayor solubilización observada hasta la fecha.

Ejemplo 420 Optimización de los parámetros de EPA

Los experimentos de valoración con peroxinitrito, peróxido de hidrógeno y metileno (basándose en la fotólisis con luz UV de la diazirina precursora) u otros agentes de modificación, identifican las condiciones óptimas para la protección de epítomos en:

- 25 1. "Priones modelo" de cerebro normal de hámster y ser humano, usando inmunotransferencia y ELISA con fluorescencia convencional.
- 30 2. Priones infecciosos de cerebro de hámster y ser humano, usando análisis de inmunotransferencia y fluorescencia con resolución temporal

En cada caso, se preparan homogeneizados de cerebro y se mezclan con concentraciones crecientes del agente de modificación y se procesan tal como se describe (inmunotransferencia, y fluorescencia con resolución temporal). Esto define el tipo y la concentración de agente químico que permite la máxima distinción entre proteínas priónicas monoméricas y agregadas. Experimentos control informativos adicionales incluyen usar PrP^C de hámster recombinante en tampón y en cerebro de ratón deficiente PrP^{-/-}, y mediante cerebro de ratón normal e infectado con tembladera (PrP murina es 6H4+ y 3F4-).

40 En algunos casos, los priones infecciosos pueden tener diferentes propiedades para la modificación química que las que tienen los "priones modelo", y los priones cerebrales pueden presentar diferentes propiedades para la modificación química que las que tienen los priones endógenos que circulan en la sangre, o PrP^{Sc} detectable en orina de animales infectados. Un experto en la técnica identificará las condiciones óptimas para detectar priones endógenos auténticos usando técnicas conocidas.

45 Ejemplo 5EPA adaptado para un sistema de ELISA fluorescente

50 Se adaptó el ensayo de protección de epítomos para PrP agregada para un sistema de ELISA de tipo sándwich fluorescente usando 6H4 como anticuerpo de captura y 3F4 como anticuerpo de detección (figura 3B). El sistema de ensayo ELISA de tipo sándwich puede identificar PrP agregada en homogeneizado de cerebro tratado con ácido pero sólo si las muestras se llevan a ebullición en tampón de carga de SDS tras el tratamiento con peroxinitrito. A concentraciones de peroxinitrito mayores de 8 mM, hay 2,5-3 veces como mucho de PrP detectada en la muestra tratada con ácido en comparación con la muestra tratada de manera simulada.

Ejemplo 6Detección de un único prión cerebral

60 Se ha estimado que un único prión cerebral comprende 10^5 - 10^6 moléculas de PrP^{Sc}. Se ha logrado la detección de 10^6 - 10^9 moléculas de PrP recombinante usando ELISA con fluorescencia convencional. El ensayo usado es aproximadamente 1000 veces más sensible para la detección de un único prión; la sensibilidad necesaria se proporciona mediante el fluoroinmunoensayo de disociación aumentada por lantánidos (DELFI A). DELFI A usa un trazador marcado con lantánido quelado, tal como europio (Eu) y fluorescencia con resolución temporal (TRF) para medir la señal de salida. El beneficio de los quelatos de lantánidos es que su duración de fluorescencia es 200.000 veces más larga que la de fluoróforos convencionales, lo que permite la captura de señal tras haber desaparecido la

fluorescencia de interferencia inespecífica (particularmente crítica para muestras biológicas, que pueden presentar fluorescencia intrínseca considerable).

5 Los sistemas basados en DELFIA pueden medir tan sólo 100 fmol/pocillo de Eu que es >1000 veces más sensible que los ensayos ELISA convencionales, que detectan priones individuales mediante EPA. El lector de placas de 96 pocillos para TRF para el sistema DELFIA lo fabrica Wallac-Victor (Perkin-Elmer), y se usa para automatizar el análisis de muestras.

10 Usando un modificador químico óptimo y condiciones óptimas, se proporciona un ensayo en placa de 96 pocillos de captura sensible para la detección de priones de hámster y ser humano, usando el sistema DELFIA TRF. Esto se usa para:

1. Caracterizar, optimizar y cuantificar la detección de proteína priónica recombinante mediante TRF.

15 2. Determinar la sensibilidad de DELFIA-TRF para priones cerebrales de hámster y de ser humano.

Ejemplo 7

Detección de proteínas priónicas en líquidos biológicos

20 El EPA logra utilidad comercial detectando PrP^{Sc} en tejidos y líquidos biológicos para lo que no existe una tecnología actual. Los priones sanguíneos tienen una abundancia muy baja (10-100 priones/ml mediante ensayo biológico), y sólo puede detectarse PrP resistente a proteasas en orina de manera intermitente/ esporádica mediante precipitación de grandes volúmenes de fluido. Además, cualquier análisis de sangre futuro debe enfrentarse a altas
25 concentraciones de PrP^C (10⁶ veces más que PrP^{Sc}) y “bloqueo” por proteínas plasmáticas heterólogas. Usando el régimen optimizado de modificación química y el sistema DELFIA-TRF, se determinan los umbrales de sensibilidad para EPA en sangre y orina usando:

30 1. Plasma y orina de hámster y ser humano “con adiciones conocidas” con una valoración de priones de hámster 263K;

2. Plasma y orina de hámsteres sirios infectados “de manera endógena” con enfermedad priónica con 263K

35 Los líquidos biológicos clínicamente accesibles por vías no invasivas proporcionan un sustrato para una prueba *antemortem* práctica para el diagnóstico y el examen de infección priónica en seres humanos y animales. Los métodos de esta invención también pueden usarse en pruebas *postmortem*. Un experto en la técnica determina fácilmente si EPA con valoración con “adiciones conocidas de priones” en sangre y orina normales revela señales de DELFIA-TRF similares a las de la misma valoración de priones en tampón, mostrando que el EPA no se ve afectado por “factores de bloqueo” en estos líquidos biológicos. De manera interesante, el “bloqueo” preferente de PrP^{Sc} por
40 proteínas heterólogas puede potencialmente reducir la protección de epítomos frente a agentes de modificación química. Si se observa una disminución de la detección de priones en sangre u orina, se emplean fácilmente estrategias de limpieza previa para potenciar la detección de PrP^{Sc} con detergentes, agentes de precipitación y adsorbentes usados normalmente en ensayos ELISA comerciales que conoce un experto en la técnica.

45 Se someten a prueba plasma y orina de ser humano y bovinos y otros líquidos corporales usando condiciones de EPA optimizadas y se compararon con muestras de la variante humana CJD y BSE, respectivamente. Aunque el anticuerpo monoclonal 6H4 reconoce PrP de todas las especies relevantes, otros anticuerpos (disponibles comercialmente) se usan para el sistema DELFIA TRF para ganado, ovejas y cérvidos, que carecen del epítomo de 3F4. Otros anticuerpos y epítomos útiles en métodos descritos en esta solicitud resultarán fácilmente evidentes a los
50 expertos en la técnica.

Ejemplo 8

Detección de amiloide-beta (Abeta) agregado usando EPA

55 El péptido amiloide-beta (Abeta) es un producto de escisión normal del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP). El Abeta se acumula en placas diferenciadas en regiones afectadas del cerebro con enfermedad de Alzheimer, y desencadena la muerte neuronal y gliosis observadas en esta enfermedad. El Abeta en placas se agrega y es rico en la estructura de lámina beta, a diferencia de la región Abeta de APP expresada por
60 células normales. Usando la tecnología de protección de epítomos, se demostró que el epítomo de 6E10 en la región Abeta de APP es menos accesible para la modificación mediante peroxinitrito en el cerebro con enfermedad de Alzheimer en comparación con cerebro normal (figura 4, panel A). De manera similar, el epítomo de 6E10 está parcialmente protegido en homogeneizados de cerebro que se han tratado a bajo pH para inducir agregación de proteínas (figura 4, panel B). El péptido Abeta 1-42 agregado mediante incubación durante la noche a 1 mg/ml en
65 agua muestra protección de epítomos destacada del epítomo de 6E10 para la modificación mediante peroxinitrito, en comparación con Abeta 1-42 no agregado soluble (figura 4, panel C). Un ejemplo adicional de este fenómeno se

presenta en la figura 4, panel D que muestra Abeta 1-42 normal (○) y agregado (●) tratado con concentraciones crecientes de peroxinitrito, sometido a inmunotransferencia con anticuerpo 6E10.

5 El epítipo de 6E10 de APP tampoco está disponible para la modificación mediante peroxinitrito en homogeneizados de cerebro con AD y en homogeneizados de cerebro normales agregados mediante bajo pH, pero el cerebro normal sin tratar no muestra esta protección (figura 4, paneles A y B), mostrando interacción molecular *in vivo* de APP con una molécula de bloqueo de dominio de Abeta (quizá el propio Abeta; ref. 9).

10 La detección mediante EPA sensible y específica de Abeta agregado en líquidos biológicos (tales como sangre y líquido cefalorraquídeo), o protección de epítipos de Abeta en APP en células y tejidos, proporciona una prueba de diagnóstico *antemortem* para la enfermedad de Alzheimer. Los métodos de la invención descritos en esta solicitud se usan para esta prueba de diagnóstico.

15 Detección de proteína tau agregada mediante EPA

Las neuronas moribundas liberan proteínas intracelulares tales como tau en el LCR (39) y es probable que en última instancia en sangre. Se realizan directamente estudios de tau en muestras de cerebro incluyendo muestras de pacientes con Alzheimer y cerebro de control.

20 Ejemplo 9

Detección de superóxido dismutasa 1 (SOD1) agregada mediante EPA

25 Se detectan inclusiones citoplasmáticas que contienen SOD1 en muchas neuronas motoras enfermas de pacientes con ALS familiar y esporádica (15), y en la mayor parte de modelos de ratón transgénico (16, 17) y de cultivo tisular (18) de la enfermedad. SOD1 humana puede agregarse *in vitro*. Además, SOD1 puede modificarse mediante anhídrido succínico y DEPC. Puede aprovecharse esta propiedad mediante la tecnología de EPA para discriminar entre proteína SOD1 agregada y sin agregar.

30 Se agregó SOD1 purificada de eritrocitos humanos (Sigma) en una reacción de oxidación catalizada por metal. Se trató SOD1 soluble con concentraciones variables de DEPC, se desnaturalizó con calor, y se sometió a inmunotransferencia con anticuerpos anti-SOD1. La inmunotransferencia de tipo Western muestra que concentraciones crecientes de DEPC están asociadas con disminuciones en la unión a anticuerpo en SOD1 soluble (figura 5) mostrando que están disponibles sitios para la modificación mediante un agente de bloqueo.

35 Se usan anticuerpos contra SOD1 seleccionados *a priori* por su utilidad en EPA para distinguir SOD1 agregada específica de enfermedad de SOD1 de tipo natural. Los factores relevantes incluyen:

40 1) seleccionar un epítipo en la superficie molecular del dímero nativo para que sea accesible para la modificación química en el estado soluble nativo;

2) identificar un epítipo lineal para optimizar la detección en el estado desnaturalizado en inmunotransferencias y ELISA;

45 3) inmunogenicidad;

4) carácter único para SOD1; y

50 5) presencia de aminoácidos ácidos (Glu y Asp) que se modifican fácilmente mediante epóxidos.

Las cinco secuencias de SOD1 que cumplen estos criterios son: 22QKESNG27; 51EDNTAGCTSA60; 74PKDEERHV81; 89ADKDG93; y 127GKGGNEQSTK136 (en negrita: cadenas laterales solvatadas).

55 Adicionalmente la secuencia de bucle electrostático y bucle de unión a zinc de SOD1 humana son secuencias accesibles en superficie y están implicadas en la formación de agregados (Elan, J. *et al.* Nature Structural Biology (2003) 10:461-67).

Estas secuencias son:

60 Bucle electrostático de SOD1 humana: Asp Leu Gly Lys Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser

Bucle de unión a zinc de SOD1 humana: Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu

65 Ejemplo 10

Detección de alfa-sinucleína agregada mediante EPA

La mayor parte de los casos de enfermedad de Parkinson son esporádicos, pero las formas tanto esporádica como familiar de la enfermedad se caracterizan por cuerpos de Lewy intracelulares en neuronas moribundas de la sustancia negra, una población de neuronas del mesencéfalo (~60.000) que están diezmadas selectivamente en PD. Los cuerpos de Lewy se componen predominantemente de alfa-sinucleína (22). Se han encontrado mutaciones en el gen que codifica para alfa-sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson familiar (revisado en 23). Otro gen asociado con PD autosómica recesiva es Parkin, que está implicada en la degradación de alfa-sinucleína (22, 23). Se observan cuerpos de Lewy (LBD), un síndrome que provoca demencia asociado con cambios de tono parkinsoniano, alucinaciones y rápida fluctuación sintomática (24).

El epítipo de Syn-1 se bloquea opcionalmente mediante modificación química de alfa-sinucleína recombinante con DEPC (reactivo con histidina), y se protege parcialmente la alfa-sinucleína agregada *in vitro* frente al bloqueo de epítopos mediante DEPC (figura 6).

La alfa-sinucleína agregada *in vitro* está protegida frente a la modificación mediante DEPC mientras que la proteína normal no lo está. Se incubó alfa-sinucleína mutante A53T tres mg/ml a 37°C durante tres días para la agregación. Se aplicó la reacción de agregación a ultracentrifugación. Se trataron proteína normal antes de la agregación (que contenía alfa-sinucleína soluble) y la resuspensión del sedimento de la ultracentrifugación (que contenía alfa-sinucleína insoluble) con concentraciones variables de DEPC, se desnaturalizaron con calor, y se sometieron a transferencia con anticuerpo frente a Syn-1 de BD Biosciences. La figura 6A muestra que concentraciones crecientes de DEPC se asocian con una disminución gradual en la unión a anticuerpo en alfa-sinucleína normal. La alfa-sinucleína insoluble muestra pocos cambios en la unión a anticuerpo con concentraciones crecientes de DEPC hasta que las concentraciones de DEPC alcanzan 1 mM. Se presenta una representación gráfica de estos hallazgos en la figura 6B. El grado de unión a anticuerpo para alfa-sinucleína normal tratada con DEPC (-) disminuye gradualmente de forma global pero más rápidamente a mayores concentraciones de DEPC. Por otra parte, la alfa-sinucleína insoluble (π) muestra pocos cambios en el grado de unión a anticuerpo. El último punto de datos a DEPC 0,01 M para alfa-sinucleína insoluble aumenta debido al oscurecimiento de la película.

Ejemplo 11

Detección de proteínas agregadas en LCR

Se ha cuantificado Abeta depositado de manera extracelular en LCR y sangre de pacientes con AD y controles normales (6-8). Se han detectado proteínas neuronales intracelulares, tales como alfa-sinucleína, en LCR y sangre (37, 38). Las neuronas moribundas liberan proteínas intracelulares 14-3-3, enolasa específica de neuronas, tau y alfa-sinucleína en el LCR (39), y es probable que en última instancia en sangre. Una proporción de proteína liberada en la enfermedad está en forma agregada. Se aplica la tecnología de EPA para determinar la proporción de agregados de polipéptido en muestras de LCR de pacientes con AD, ALS, PD y LBD. Se mide la señal para polipéptidos desagregados antes y después del tratamiento químico, representando los epítopos "total" y "protegido", respectivamente, para determinar la proporción de polipéptido en el estado agregado. Usando los AcM y regímenes de modificación química optimizados, y el sistema DELFIA-TRF, se determina la sensibilidad de EPA en:

1. LCR normal "con adiciones conocidas" con polipéptidos agregados *in vitro*.

2. LCR de pacientes con AD, ALS, PD y LBD.

Se determina la proporción de polipéptidos agregados en una muestra de LCR, aunque constituya sólo 10^5 - 10^6 moléculas. Se emplean opcionalmente detergentes, agentes de precipitación (tales como ácido fosfotúngstico) y adsorbentes usados normalmente en ensayos ELISA comerciales para enriquecer para especies relevantes. Los líquidos biológicos clínicamente accesibles por vías no invasivas proporcionan un sustrato ideal para una prueba *antemortem* práctica para el diagnóstico y el examen de enfermedades neurodegenerativas.

Materiales y métodos

PrP de hámster recombinante (rhaPrP) y 6H4 procedían de Prionics. PrP humana recombinante (rhuPrP) procedía de Roboscreen. Biotina-3F4 y 3F4 procedían de Signet. 3F4 reacciona contra MKHM y 6H4 reacciona contra DYEDRYRE. El anticuerpo 6E10 anti-Abeta (de Signet) reacciona contra EFRHDS (residuos 3-8).

En la tabla 1 anterior, se proporcionan otros anticuerpos y los epítopos reconocidos, si se conocen.

Preparación de APP y PrP con plegamiento erróneo con ácido.

Se usó PrP con plegamiento erróneo con ácido como "priones modelo" en este estudio y se preparó como en (29). En resumen, se mezclaron 100 μ l de homogeneizado de cerebro al 10% con un volumen igual de GdnHCl 3,0 M (concentración final de 1,5 M) en PBS a pH 7,4 o pH 3,5 ajustado con HCl 1 N, seguido por rotación a temperatura ambiente. Tras incubación durante 5 h, se precipitaron con metanol las muestras con 5 volúmenes de metanol

enfriado con hielo y se resuspendieron los sedimentos en 100 μ l de tampón de lisis. Se designaron las muestras tratadas a pH 7,4 como muestras tratadas de manera simulada.

Tratamiento con peroxinitrito de homogeneizados de cerebro

5 Se agitó en vórtex una alícuota (18 μ l) de homogeneizado de cerebro normal o con plegamiento erróneo/enfermo mientras se añadían 2 μ l de peroxinitrito en NaOH 100 mM/H₂O₂ 60 mM para dar una concentración de peroxinitrito final de 0-15 mM. Tras agitar en vórtex durante 15 s más, se sometieron las muestras a inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación o ELISA de tipo sándwich.

10 Tratamiento con DEPC de SOD1 de eritrocitos

15 Se agrega SOD1 purificada de eritrocitos humanos (Sigma) en una reacción de oxidación catalizada por metal que consiste en SOD1 40 μ M, ácido ascórbico 4 mM y CuCl₂ 0,2 mM en tampón Tris-acetato 10 mM (pH 7) a 37°C durante tres días. Se tratan el sobrenadante sometido a ultracentrifugación (que contiene SOD1 soluble) y la resuspensión de sedimento (que contiene SOD1 insoluble) con concentraciones variables de DEPC (de 100 μ M a 0,1 M), se desnaturalizan con calor y se someten a inmunotransferencia con anticuerpo anti-SOD1.

20 Inmunotransferencia de tipo Western

20 Se llevan a ebullición muestras en tampón de carga de SDS (Tris 62 mM (pH 6,8), glicerol al 10%, SDS al 2%, beta-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,01%) durante 5 min y se separan sobre geles de poliacrilamida con Tris-glicina al 12% seguido por transferencia a Hybond-P. Se detectó PrP usando 3F4 (1:50000) 6H4 (1:10000) o 6E10 (1:1000) como anticuerpos primarios y anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (1:10000) como anticuerpo secundario seguido por exposición a ECL-Plus y visualización mediante exposición a película X-OMAT de Kodak. Se cuantificaron las intensidades de las bandas usando el software UnScan-IT.

Inmunoprecipitación

30 Se incubaron muestras con 50 μ l de perlas magnéticas Dynal M-280 (100 μ g/ml) conjugadas con Ac en un volumen final de 1 ml de tampón de unión (NP-40 al 3%; Tween-20 al 3%) durante 3 h a temperatura ambiente con rotación. Se lavaron las perlas en tampón de lavado (NP-40 al 2%; Tween-20 al 2%) 3 veces y se llevaron a ebullición en 30 μ l de tampón de carga de SDS sin beta-mercaptoetanol durante 5 min. Se analizaron los sobrenadantes mediante inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió anteriormente.

35 ELISA de tipo sándwich

40 Se unió el anticuerpo de captura (6H4; 1:5000 en tampón de unión de bicarbonato 50 mM, pH 9,6) a una placa opaca de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) mediante incubación durante la noche a 4°C. Tras el bloqueo con BSA al 1% en TBST al 0,05% durante 2 h, se lavaron las placas 3 veces en TBST y se incubaron durante la noche a 4°C con concentraciones patrón de rhuPrP o rHaPrP junto con homogeneizados de cerebro desconocidos. Se lavaron las placas 3 veces y se incubaron con el anticuerpo de detección biotina-3F4 (1:5000) a T.A. durante 1 h. Tras el lavado 3 veces, se añadió avidina-HRP (1:5000) y se incubó durante 30 min a T.A. Tras una etapa de lavado final (3 veces) se reveló la placa con sustrato fluorescente Quantablu durante 10-90 min a T.A. y se determinaron las intensidades de fluorescencia con una excitación de 325 nm y emisión de 420 nm. La invención no se limita a los ejemplos dados a conocer.

50 Por la presente se hace referencia a las publicaciones, patentes y solicitudes de patente, incluyendo la solicitud estadounidense n.º 60/496.381 (titulada Methods of Detecting Prion Protein (Cashman & Lehto), presentada el 20 de agosto de 2003 la solicitud estadounidense n.º 60/497.362 (titulada Epitope Protection Assay (Cashman & Lehto), presentada el 21 de agosto de 2003 y las solicitudes canadienses correspondientes n.ºs 2.437.675 y 2.437.999.

Bibliografía

- 55 1. Prusiner SB. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med.* 344:1516-26, 2001.
2. Caselli RJ. Current issues in the diagnosis and management of dementia. *Semin Neurol.* 23:231-40, 2003.
3. Cashman NR. Do the benefits of currently available treatments justify early diagnosis and announcement? Arguments for. *Neurology.* 53(Suppl 5):S50-2, 1999.
- 60 4. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81:741-66, 2001.
5. Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.* 6:345-51, 2003.

65

6. Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 57:100-5,2000.
7. Clark CM, Xie S, Chittams J *et al.* Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol.* 60:1696-702, 2003.
8. Green AJ. Cerebrospinal fluid brain-derived proteins in the diagnosis of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28:427-40, 2002.
9. Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, *et al.* Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 3:460-4, 2000.
10. Rosen DR, Siddique T, Patterson D. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362:59-62, 1993.
11. Deng HX, Hentati A, Tainer JA *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science.* 261:1047-51, 1993.
12. Anderson, PM in Brown RH, Meininger V, Swash eds. *Amyotrophic Lateral Sclerosis.* London: Martin Dunitz. 2000.
13. Gurney, M.E., Pu,H., Chiu, A.Y., *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264:1772-1775, 1994.
14. Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., *et al.* Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92: 689-693, 1995.
15. Kato, S., Takikawa,M., Nakashima,K., *et al.* New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. *Amyotroph.Lateral.Scler.Other Motor Neuron Disord.* 1: 163-184, 2000.
16. Bruijn, L.I., Becher,M.W., Lee,M.K. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 18: 327-338, 1997.
17. Bruijn, L.I., Houseweart,M.K., Kato,S., Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-1854, 1998.
18. Durham, H.D., Roy, J., Dong, L., y Figlewicz, D.A. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56:523-530, 1997.
19. Li YK, Chir J, Chen FY. Catalytic mechanism of a family 3 beta-glucosidase and mutagenesis study on residue Asp-247. *Biochem J* 355(Pt 3):835-40, 2001
20. Rose RB, Rose JR, Salto R, Craik CS, Stroud RM. Structure of the protease from simian immunodeficiency virus: complex with an irreversible nonpeptide inhibitor. *Biochemistry* 32:12498-507, 1993.
21. Olanow CW. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu Rev Med* 55:41-60, 2004.
22. Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 250 Suppl 3:III11-4, 2003.
23. Eriksen JL, Dawson TM, Dickson DW, Petrucelli L Caught in the act: alpha-synuclein is the culprit in Parkinson's disease. *Neuron* 40:453-6, 2003.
24. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D *et al.* Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3:19-28, 2004.
25. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Freeman BA, Radi R. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J Biol Chem* 274:842-8, 1999.
26. Alvarez B, Radi R Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 25:295-311, 2003.
27. Sokol PP, Holohan PD, Ross CR. Arginyl and histidyl groups are essential for organic anion exchange in renal brush-border membrane vesicles. *J Biol Chem* 263:7118-23, 1988.
28. Zou W-Q, Yang D-S, Fraser PE, Cashman NR, Chakrabarty A. All-or-none fibrillogenesis of a prion peptide. *Europ J Biochem* 268:4885-4891, 2001.

29. Zou W-Q, Cashman NR. Acidic pH and detergents enhance in vitro conversion of human brain PrPC to a PrPSc-like form. *J Biol Chem* 277:43942-43947 2002.
- 5 30. Rakhit R, Cunningham P, Furtos-Matei A, Dahan S, Qi X-F, Crow J, Cashman NR, Kondejewski LH, Chakrabartty A. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 277:47551-62002, 2002.
- 10 31. Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou W-Q, Estey LA., Kondejewski LH, Francoeur GP, Papadopoulos M, Haghghat A, Spatz SJ, Tonelli Q, Ledebur HC, Chakrabartty A, Cashman NR. A PrPSc - specific immunological epitope. *Nature Medicine* 9:893-9, 2003.
- 15 32. Rakhit R, Crow JP, Lepock JR, Kondejewski LH, Cashman NR, Chakrabartty A. Monomeric Cu/Zn superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial ALS. *J Biol Chem* e-pub enero de 2004.
33. MacGregor, I., Hope, J., Barnard, G. Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for the analysis of normal prion protein in human blood and its components. *Vox Sang* 77:88-96, 1999.
- 20 34. Chishti MA, Yang DS, Janus C *et al.* Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276:21562-70, 2001.
- 35 35. Bolton D.C., McKinley M.P., y Prusiner S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311, 1982.
- 25 36. Beekes M., Baldauf E., y Diring H. Sequential appearance and accumulation of pathognomic markers in the central nervous system of hamsters orally infected with scrapie *J. Gen. Virol* 77:1925-1934, 1996.
- 30 37. Borghi R, Marchese R, Negro A, *et al.* Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett.* 287:65-7, 2000.
38. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, *et al.* Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17:1945-7, 2003.
- 35 39. Verbeek MM, De Jong D, Kremer HP. Brain-specific proteins in cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurodegenerative diseases. *Ann Clin Biochem* 40(Pt 1):25-40, 2003.
40. Coulthart, M. B. y Cashman, N. R. (2001) *CMAJ.* 165, 51-58
- 40 41. Prusiner, S. B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 13363-13383
42. Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., y Smith, P. G. (1996) *Lancet* 347, 921-925.
- 45 43. Kocisko, D. A., Lansbury, P. T., Jr., y Caughey, B. (1996) *Biochemistry* 35, 13434-13442
44. Barnard, G., Helmick, B., Madden, S., Gilbourne, C., y Patel, R. (2000) *Luminescence.* 15, 357-362
- 45 45. Meyer, R. K., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., y Vandeveld, M. (1999) *J. Virol.* 73, 9386-9392
- 50 46. Kang, S. C., Li, R., Wang, C., Pan, T., Liu, T., Rubenstein, R., Barnard, G., Wong, B. S., y Sy, M. S. (2003) *J. Pathol.* 199, 534-541.
47. Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. (2001) *J Biol Chem.* 276, 31479-82.
- 55 48. Ross CA *et al.* *Nature Medicine*, (2004) S10-17.)
49. Davies SW *et al* *Cell* 90, 537-548 (1997).
50. Scherzinger E *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4604-9, (1999).
- 60 51. Sen S *et al* *Protein Sci.* (2003) 12:953-962.
52. Llewelyn CA *et al.* *Lancet* (2004) 363:417-421
53. Peden AH *et al.* *Lancet* (2004) 364:527-529
- 65 54. Andreatti O *et al.* *Nat. Med.* (2004) 6:591-593

55. Thomzig A *et al.* J Clin Invest. (2004) 10:1465-72.
56. Glatzel M *et al.* N Engl J Med. (2003) 349:1812-20
- 5 57. Bosque PJ *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. (2002) 99:3812-7

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de si un polipéptido candidato que incluye un epítipo diana está en i) una conformación de tipo natural o ii) una conformación de tipo no natural, que comprende:
- 5 poner en contacto el polipéptido con un agente de bloqueo seleccionado de peroxinitrito, peróxido de hidrógeno, anhídrido succínico, conduritól-B-epóxido, 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano, pirocarbonato de dietilo y 4-hidroxinonenal (4HNE) que bloquea selectivamente un epítipo diana accesible, en el que en la conformación de tipo natural, el epítipo diana es accesible y reacciona con el agente de bloqueo, y en el que en la conformación de tipo no natural, el epítipo diana es inaccesible porque el polipéptido candidato está agregado y el epítipo diana no puede reaccionar con el agente de bloqueo;
- 10 retirar el agente de bloqueo sin reaccionar del contacto con el polipéptido;
- 15 desnaturalizar y/o desagregar el polipéptido candidato para convertir cualquier epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible; y
- 20 poner en contacto el polipéptido con un anticuerpo que se une selectivamente al epítipo diana que se convirtió de un epítipo diana inaccesible en un epítipo diana accesible, en el que la unión entre anticuerpo y epítipo diana convertido indica que el polipéptido candidato estaba en una conformación de tipo no natural y en el que la ausencia de unión entre el anticuerpo y el epítipo diana indica que el polipéptido estaba en una conformación de tipo natural
- 25 en el que el polipéptido candidato comprende polipéptido amiloide-beta, proteína APP, SOD1 o alfa-sinucleína.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido candidato comprende proteína APP.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido candidato comprende polipéptido amiloide-beta.
- 30 4. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido candidato comprende SOD1 o alfa-sinucleína.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente de bloqueo se selecciona del grupo que consiste en peroxinitrito y pirocarbonato de dietilo.
- 35 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido se desnaturaliza y/o se desagrega con calor, detergente y/o un agente caotrópico.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 ó 6, en el que el polipéptido candidato comprende polipéptido amiloide-beta y el anticuerpo comprende 6E10 que reacciona frente a un epítipo dentro de los aminoácidos 3-8 de amiloide-beta humano, o el anticuerpo comprende 4G8 que reacciona frente a un epítipo dentro de los aminoácidos 18-22 de amiloide-beta humano.
- 40 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 6, en el que el polipéptido candidato es superóxido dismutasa 1 SOD1.
- 45 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 4 a 6, en el que el polipéptido candidato es alfa-sinucleína.
- 50 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la conformación de tipo no natural es indicativa de una enfermedad neurodegenerativa.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por cuerpos de Lewy y esclerosis lateral amiotrófica.
- 55 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que antes de poner en contacto el agente de bloqueo con el polipéptido candidato, el polipéptido candidato está en una muestra que se trata previamente mediante uno o más de los siguientes métodos: adsorción, precipitación o centrifugación.
- 60 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el polipéptido está en una muestra *postmortem* o *antemortem* seleccionada del grupo que consiste en LCR, suero, sangre, orina, muestra de biopsia y tejido cerebral.
- 65 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5 a 7 ó 10 a 13, en el que dicho polipéptido candidato comprende polipéptido amiloide-beta o APP y dicho agente de bloqueo es peroxinitrito.

Fig 1

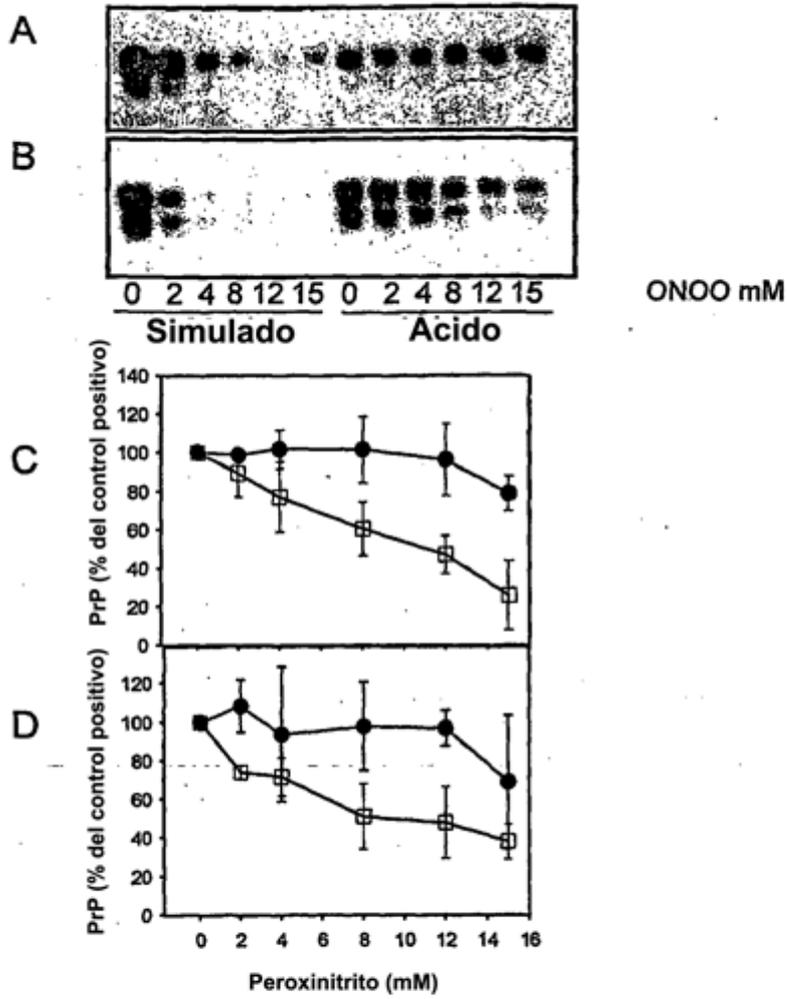
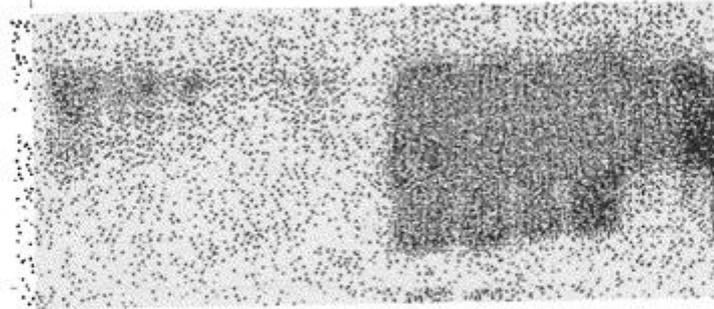


Fig 2

A



ONOO mM 0 2 4 8 12 15 0 2 4 8 12 15

Normal Tembladera

B

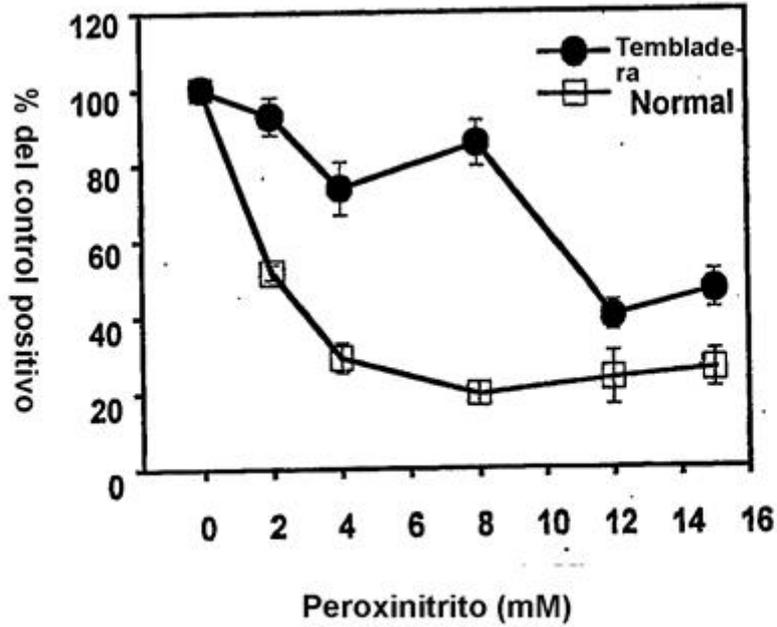


Fig 3

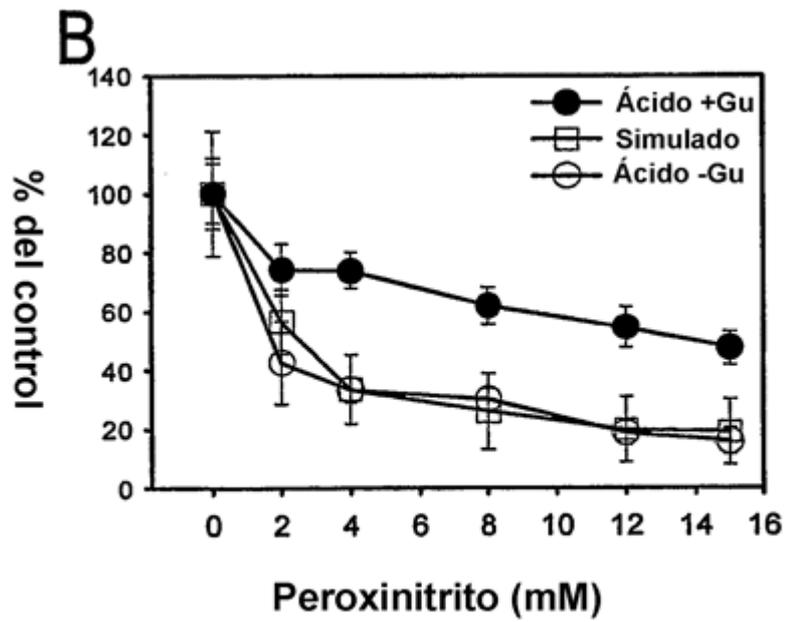
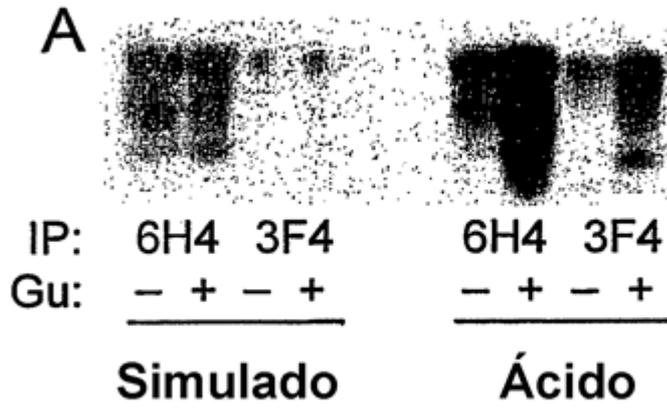


Figura 4

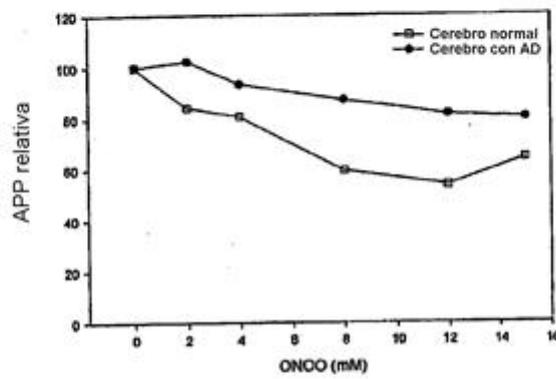
A



Normal

AD

Tratamiento con ONOO de cerebro normal y con AD



B



Simulado

Ácido

Efecto de ONOO sobre APP β en cerebro tratado con ácido y de manera simulada

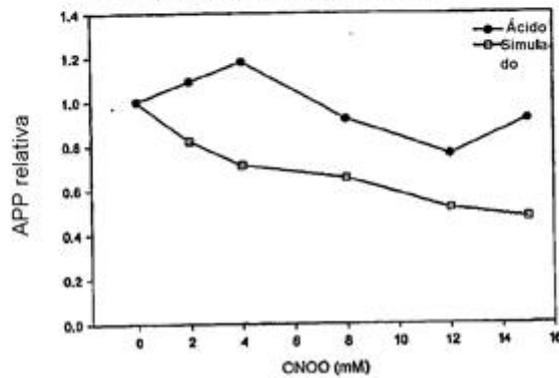
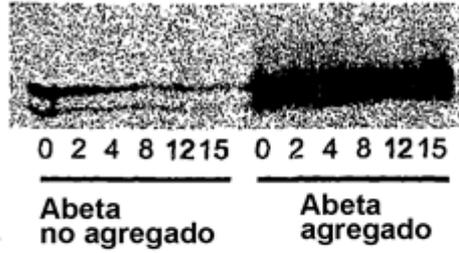
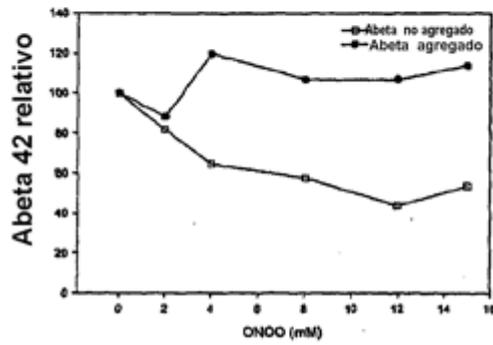


Figura 4

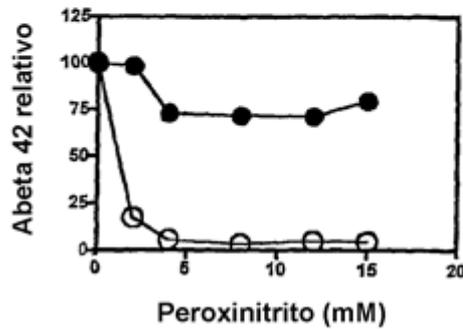
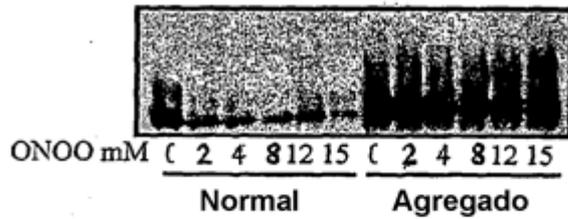
C



Tratamiento con ONOO de Abeta agregado y no agregado



D



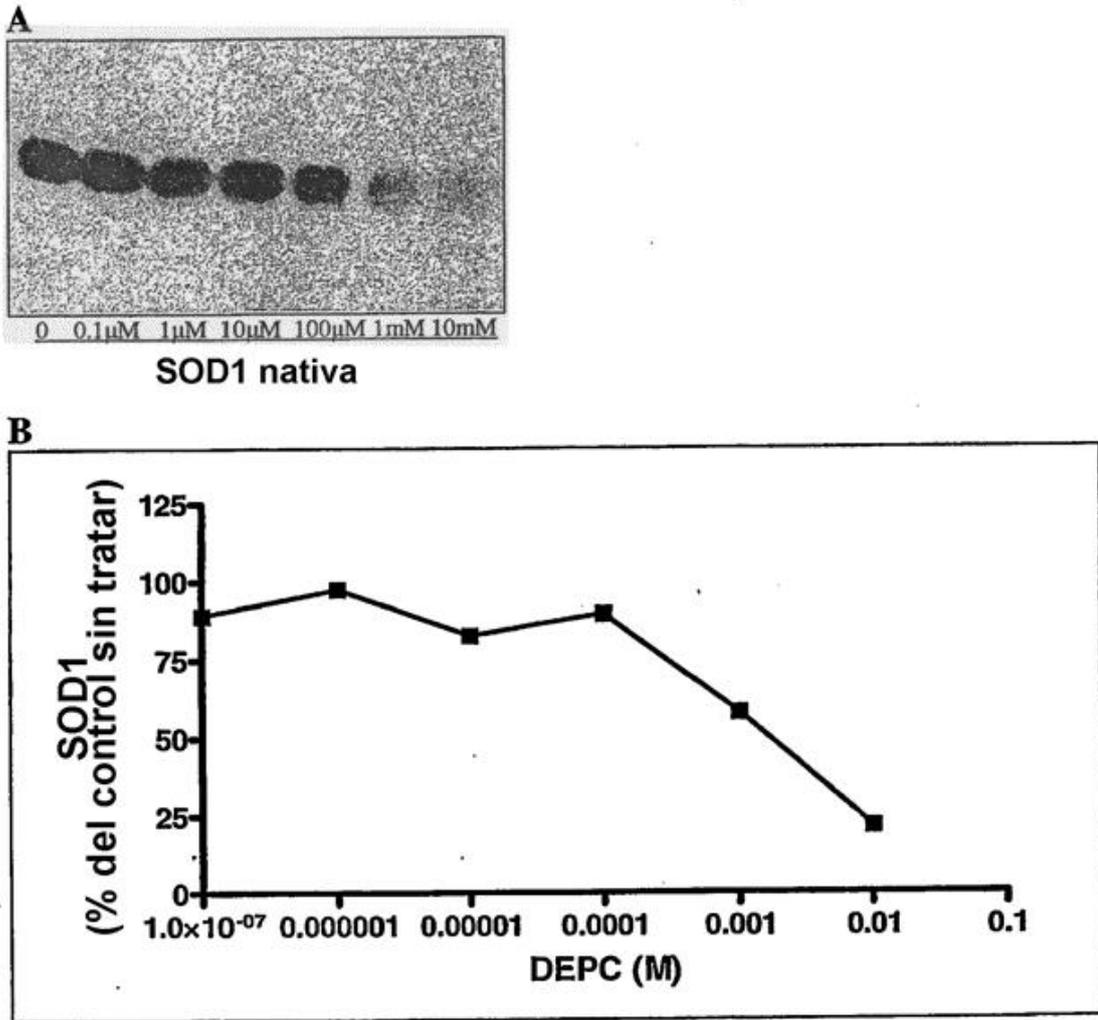


Figura 5

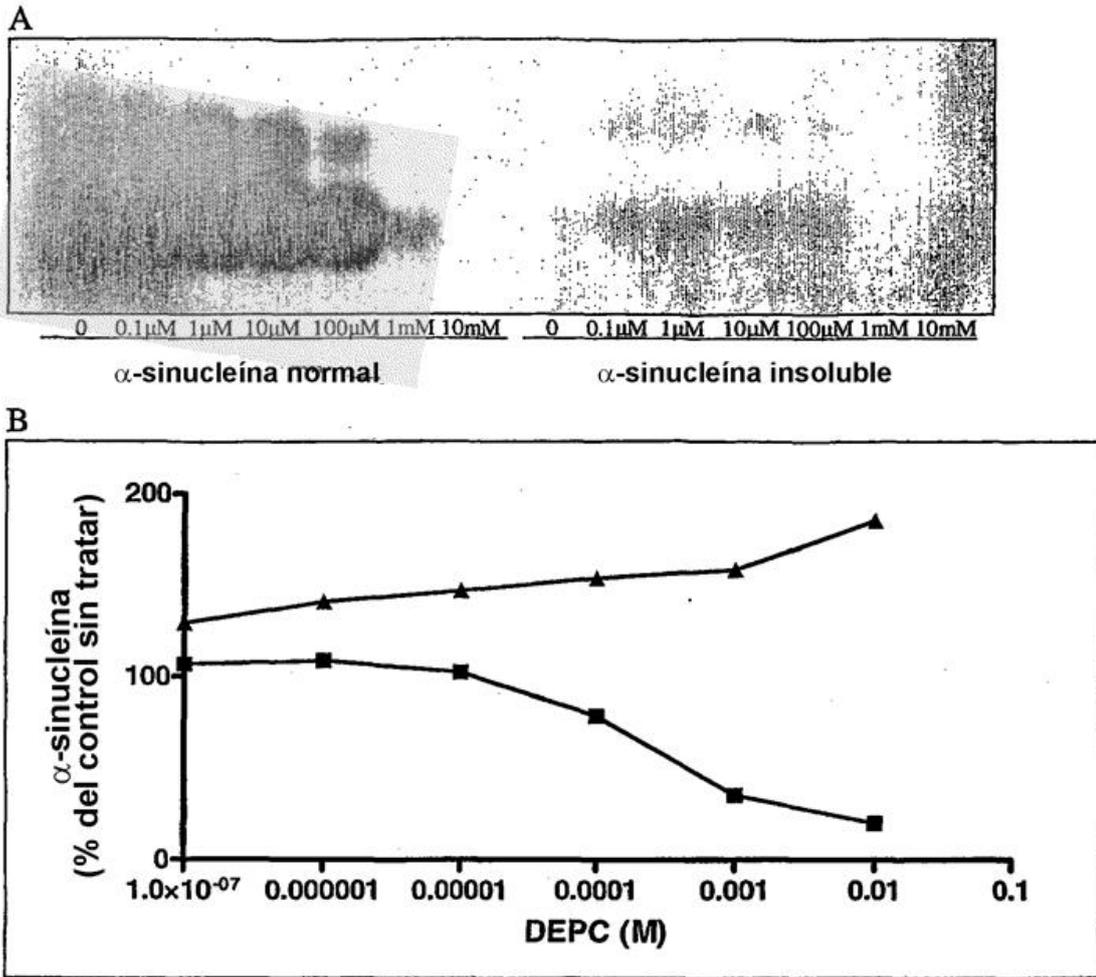


Figura 6