

Даний винахід відноситься до виявлення білка-пріона (який також називається PrP-Sc-білком) як показника трансмісивних губчастих енцефалопатій (ТГЕ). Зокрема, даний винахід відноситься до (а) моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з консервативним епітопом білків-пріонів, і (b) суміші моноклональних антитіл, що містить моноклональне антитіло в комбінації з другим моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з другим консервативним епітопом білків-пріонів. Нові антитіла і суміш антитіл придатні для імуноаналізів для виявлення білків-пріонів у жуйних тварин і інших видів, у яких ТГЕ зустрічається в природних умовах, або у родинних видів, потенційно схильних до ТГЕ.

Трансмісивні губчасті енцефалопатії (ТГЕ) являють собою гетерогенну групу нейродегенеративних захворювань з летальним виходом, які виникають у людини, жуйних травоядних тварин, норки і кішок. Прототипом цієї групи є скрепті овець. ТГЕ характеризуються відкладенням пріонних білків (що також позначаються як PrP-скрепті або PrP-Sc), інфекційної форми білків, в центральній нервовій системі уражених хворобою індивідумів. Пріони були визначені як невеликі білкові інфекційні частки, які стійкі до інактивації за допомогою процедур, які модифікують нуклеїнові кислоти. Термін «пріон» є скороченням слів «протеїн» і «інфекція», і пріони значною мірою, якщо не виключно, складаються тільки з молекул PrP-Sc, що кодуються геном PrP. Пріонні захворювання часто називають губчастими енцефалопатіями через те, що при посмертному мікроскопічному або гістопатологічному дослідженні головного мозку інфікованої тварини видні великі вакуолі в корі головного мозку і мозочку. Пріонні білки є нерозчинними, стійкими до протеаз глікопротеїдами, виникаючими внаслідок посттрансляційної модифікації нормальних глікопротеїдів ссавців (PrP-клітинний або PrP-C), і відкладення білка PrP-Sc, аномальної ізоформи сіалоглікопротеїду PrP-C, в центральній нервовій системі є достовірним маркером інфекції ТГЕ.

Найбільш широко вивчені ТГЕ у сільськогосподарських тварин, включаючи скрепті у овець і кіз, губчасту енцефалопатію корів (BSE) у великої рогатої худоби (яка також називається захворюванням «коров'ячий сказ»), і хронічну виснажуючу хворобу (GWD) у гібридного оленя і лося. Інші ТГЕ тварин включають трансмісивну енцефалопатію норок (TME) і котячу губчасту енцефалопатію (FSE) домашніх і не домашніх кішок. Зовсім недавно повідомлялося про ТГЕ не у людей, а в інших приматів, що утримуються в зоопарках Франції; ймовірно, це захворювання виникло з BSE [Bons et al, Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 96: 4046-4051 (1999)]. Також були ідентифіковані пріонні хвороби у людей. До них відносяться: хвороба Кройцфельда-Якоба (CJD); синдром Гертсмана-Штрауслера-Шейнкера (GSS); фатальне сімейне безсоння (FFI) і хвороба Куру.

Агент, що передається при цих захворюваннях залишається спірним. Однак, як вказано вище, нерозчинна ізоформа (пріон або PrP-Sc) сіалоглікопротеїду ссавців (PrP-клітинний або PrP-C) є основним компонентом інфекційного матеріалу. Мабуть, ізоформа скрепті білка-пріону (PrP-Sc) необхідна як для передачі, так і патогенезу трансмісивних нейродегенеративних захворювань тварин і людини [дивись S.B.Prusiner, Science 252: 1515-1522 (1991) і S.B.Prusiner, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 13363-13383 (1998)]. Основна гіпотеза полягає в тому, що пріонні захворювання виникають внаслідок перетворення PrP C в PrP Sc в процесі нуклеації і полімеризації.

Поширення нових трансмісивних губчастих енцефалопатій у великої рогатої худоби у Великобританії і Європі і у гібридних оленів і лосів в частини Сполучених Штатів надало особливе значення необхідності надійних діагностичних тестів. Крім того, епізоотія ТГЕ серед великої рогатої худоби і її передбачуваний взаємозв'язок з новим варіантом хвороби Кройцфельда-Якоба [M.E.Bruce et al., Nature 389: 498-501 (1997) і A.F.Hill et al., Nature 389: 448-450 (1997)] розширили суспільні і наукові знання про ці відносно рідкі захворювання і висунули на перший план необхідність преклінічного виявлення ТГЕ. Хоч в Сполучених Штатах не було виявлено випадків BSE, чутливі імуногістохімічні способи і способи преклінічного виявлення є основою для виявлення, спостереження і контролю ТГЕ.

Пріонні захворювання можуть мати тривалий інкубаційний період. Наприклад, у овець може вимагатися від 3 до 5 років з часу інфікування тварини до моменту, коли у неї виявляються перші ознаки захворювання. При губчастій енцефалопатії корів (BSE) може вимагатися від двох до восьми років з часу інфікування тварини до моменту, коли у неї виявляються перші ознаки захворювання. У інфікованих тварин і людей не спостерігається ні специфічної для захворювання імунної відповіді, ні встановлених біохімічних, гематологічних і грубих патологічних порушень. Тому рання діагностика трансмісивних губчастих енцефалопатій може бути заснована на появі клінічних ознак, електроенцефалографії або інвазивному способі взяття біопсії головного мозку. Підтвердження ТГЕ здійснюють при посмертному мікроскопічному або гістопатологічному дослідженні тканини головного мозку в підозрілих випадках. Посмертна гістопатологічна діагностика ТГЕ жуйних тварин заснована на появі вакуолізації нейронів, губчастих змін, гліозу і астроцитозу. Однак вказані вияви можуть варіювати по інтенсивності і анатомічній локалізації в залежності від видів хазяїна, індивідумів, генетики хазяїна, стадії захворювання і джерела інфекції. Таким чином, діагностика тільки на основі гістопатології може бути невизначеною на ранніх стадіях і звичайно не можлива в аутолізованій тканині.

Відкладення білка-пріона (PrP-Sc) в центральній нервовій системі є надійним маркером ТГЕ. Тому імуногістохімічне виявлення PrP-Sc є важливим доповненням до гістопатологічних досліджень при діагностиці, нагляді і контролі ТГЕ. Моноклональне антитіло 263K 3F4 [патент США №4806627] виявляє PrP-Sc у хом'яків і людей, і отримало широко поширене застосування в діагностичних аналізах і дослідженнях патогенезу ТГЕ людини. Основний недолік полягає в тому, що воно не реагує з PrP овець і великої рогатої худоби [R.J.Kascsak et al., Immunological Investigations 26: 259-268 (1977)]. Антисироватка кролика, реактивна по відношенню до PrP-Sc жуйних тварин, володіє тим недоліком, що її не можна стандартизувати для широко поширеного застосування через обмеження в кількості і специфічності. Моноклональні антитіла переважніше за кролячу антисироватку, оскільки кількість не обмежені, і специфічність можна точно визначати на рівні одного епітопа. Однак вказана специфічність може бути недоліком у видів з поліморфними генами PrP. Зміна єдиної основи, що приводить в результаті до амінокислотної заміни в епітопі, може виключити скріплення антитіла. Ген PrP людини має, щонайменше, 18 патогенних мутацій, що приводять до спадкового пріонного

захворювання [J.Collinge et al., *Philos. Trans. Royal Soc. Lond. (Biol.)* 343: 371-378 (1994)] і ряд непатогенних мутацій, одна з яких (кодон 129), яка пов'язана з схильністю до ятрогенної, спорадичної і атипової CJD [J.Collinge et al., *Lancet* 337: 1441-1442, (1991); M.S.Palmer et al., *Nature* 352: 340-342 (1991); M.Zeidler et al., *Lancet* 350: 668 (1997)]. [M.Horiuchi et al. (*Journal of General Virology* 76: 2586-2587 (1995))] описують панель синтетичних пептидів, які спричиняли утворення моноклональних і поліклональних антитіл, реактивних по відношенню до PrP-клітинного (не пов'язаному із захворюванням білка) на імуноблотах відібраної тканини овець і великої рогатої худоби. Вказані автори не повідомляли про ефективне виявлення пов'язаної із захворюванням ізоформи PrP-Sc. Крім того, вони не повідомляли про ефективне виявлення ні PrP-C ні PrP-Sc в фіксованих формаліном тканинах.

Посмертну діагностику пріонних захворювань проводять з використанням гістологічних і імуногістохімічних аналізів тканини головного мозку. Тестування перед смертю у людей з передбачуваної CJD виконують шляхом імуногістохімічного і гістологічного дослідження біопсій головного мозку. Крім того, у людей з новим варіантом CJD, пов'язаним з тим, що вони зазнавали впливу BSE, має місце накопичення PrP-Sc в лімфоїдних тканинах [A.F.Hill et al., *Lancet* 349: 99 (1997)]. Присутність PrP-Sc в лімфоїдній тканині відрізняє атипову CJD від спорадичного або сімейного захворювання. Оскільки біопсія головного мозку у жуйних тварин не здійсненна, при новому підході, заснованому на спостереженні W.J.Hadlow et al. [*The Journal of Infectious Diseases* 146: 657-664 (1982)] для біопсії були вибрані лімфатичні вузли. Hadlow et al. показали, що інфективність виявлялася в деяких лімфатичних вузлах (ретрофарингеальних, мигдаликах, мезентеральних, підлопаткових, бронхіально-медіастинальних і селезінкових) і лімфоїдної тканини в кишечнику овець, інфікованих скрепії. У дослідженнях Hadlow, виконаних до відкриття білка-пріону, виявлена інфективність при щепленні мишей. Race et al. [*American Journal of Veterinary Research* 53: 883-889 (1992)], Ikegami et al. [*Veterinary Record* 128: 271-275 (1991)] і van Keulen et al. [*Journal of Clinical Microbiology* 34: 1228-1231 (1996)] виконали схожі дослідження за допомогою вестерн-імуноблотів або імуногістохімічного аналізу вибраних лімфатичних вузлів, використовуючи поліклональну антисироватку. Біопсія тканини мигдаликів у людей з клінічними ознаками атипової CJD є менш інвазивною процедурою, ніж біопсія головного мозку, і імуноаналіз лімфоїдної тканини можна використати для діагностики атипової CJD і для того, щоб відрізнити цю форму від сімейної, ятрогенної і спорадичної CJD. Однак у жуйних домашніх тварин до основних недоліків відбору зразків тканини мигдаликів або лімфоїдної тканини відносяться наступні: відбір зразків вказаних внутрішніх тканин вимагає інвазивних способів, що дорого коштують, включаючи загальну анестезію з супутнім їй ризиком і періодом відновлення; лімфоїдні тканини овець часто інфіковані бактеріями, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, які порушують структуру лімфатичного вузла і обмежують його використання в даних дослідженнях; тканина мигдаликів поглинає антигени навколишнього середовища, включаючи грибові антигени, деякі з яких перехресно реагують з PrP-Sc, даючи невизначені або помилково позитивні імуногістохімічні реакції, рішення відносно яких повинні бути прийняті за допомогою технічно необхідного Вестерн-блот-аналізу. Зовсім недавно O'Rourke et al. [*The Veterinary Record*, May 2, 1998, pp.489-491] описали неінвазивний діагностичний аналіз для преклінічного виявлення PrP-Sc у овець з використанням лімфоїдної тканини мигальної перетинки (третьої повіки).

Сучасні норми федерального права США вимагають винищення інфікованих скрепії овець, а в деяких штатах потрібне знищення всіх овець в стаді, що народилися в 60-денний період після народження ягняти у вівці, у якій згодом виявили скрепії. Подібні процедури знищення є такими, що дуже дорого коштують для виробництва. Крім того, вівці в Америці великі, м'ясні і швидко зростають. Багато які зарубіжні країни дуже б хотіли закупити вівці в Америці для генетичних цілей, але це не допускається через наявність скрепії.

Епідемія BSE в Великобританії і Європейському Співтоваристві обійшлася виробникам і споживачам прямими втратами поголів'я худоби і посередньою втратою ринків яловичини і субпродуктів з яловичини, включаючи економічно важливі фармацевтичні продукти. Країни, виробляючи баранину і яловичину, у всьому світі здейснюють програми контролю і карантину, що дорого коштують, щоб підтримати свій статус країни, в якій немає BSE. Що ще більш важливо, дані декількох наукових напрямів дослідження представили суворий доказ того, що в Великобританії BSE були інфіковані люди. Розмах цього нового захворювання ще не встановлений.

Необхідною є система реагентів для практичного імуноаналізу, відповідна для виявлення PrP-Sc в тканинах людини, сільськогосподарських тварин, домашніх тварин і не домашніх тварин в зоопарках. Реагенти для аналізу повинні бути придатними для виявлення PrP-Sc у індивідумів з різними генотипами PrP в межах кожного виду; і чутливими і специфічними при використанні у множині стандартних лабораторних протоколів.

Даний винахід відноситься до способів виявлення білків-пріонів або PrP-Sc-білків як показника трансмісивних губчастих енцефалопатій. В одному варіанті даний винахід охоплює моноклональні антитіла, які специфічно зв'язуються з консервативним епітопом на білках-пріонах, ідентифікованим як Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser, і способи імуноаналізу з використанням антитіл, включаючи імуногістохімічний аналіз і Вестерн-блоттинг. Антитіла придатні для виявлення PrP-Sc в фіксованій або нефіксованій тканині як показник наявності TГЕ-інфекції.

У другому варіанті даний винахід відноситься до суміші моноклональних антитіл, що містить вищезазначене моноклональне антитіло в комбінації з другим моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з другим консервативним епітопом на білках-пріонах, визначеним як Ile-His-Phe-Gly. Останнє антитіло Описане в заявці з реєстраційним №08/950271. Несподівано автори виявили, що Комбінація (позначена тут як суміш моноклональних антитіл) антитіл до окремих епітопів, що не перекриваються, забезпечує оптимальне поєднання високої Чутливості, визначеної специфічності і широкої реакційної здатності по відношенню до PrP-білків, незважаючи на внутрішньовидову і міжвидову відмінність. Одне або обидва моноклональних антитіла у вказаній суміші можуть впізнавати епітопи, виявлені у всіх видів ссавців, для яких повідомлялося про TГЕ природного походження, і у ряду близько родинних видів.

Крім того, даний винахід охоплює способи імуноаналізу з використанням антитіл першого варіанту і суміші антитіл, включаючи імуногістохімічний аналіз, Вестерн-імуноблоти і дот-блоти.

Антитіло першого варіанту і суміш антитіл згідно з даним винаходом можна використовувати при неінвазивному діагностичному аналізі з використанням лімфоїдної тканини третьої повіки, щоб виявити PrP-Sc, як описано в заявці з реєстраційним №08/950271. Мигальна перетинка або третя повіка (*palpebra tertia*) жуйних тварин складається з хрящової пластинки з поверхневими лімфоїдними фолікулами і серозно-слизоутворюючої секретуючої залози під кон'юнктивою бульбарною поверхнею. Жуйні тварини, включаючи вівці, кіз, гібридного оленя, лося і велику рогату худоба, мають третю повіку. Зразок лімфоїдної тканини, пов'язаної з мигальною перетинкою, можна легко отримати, вивернувши третю повіку. Звичайно видні два грона лімфоїдної тканини, розташованих над більш блідою тканиною залози. Біопсію лімфоїдної тканини можна виконати, використовуючи тільки локальний анестетик. Потім зібраний зразок тканини піддають імуногістохімічному аналізу або аналізу іншими способами виявлення білка, які можуть виявити пріон або PrP-Sc, якщо він присутній в тканині. Таким чином, третя повіка являє собою легко доступний зразок для тестування тканини живих тварин або тварин, у яких зразки беруть при забої. Вказаний спосіб визначення представляє дуже необхідний практичний спосіб раннього виявлення PrP-Sc і забезпечує способи преклінічної діагностики ТГЕ.

Згідно з даним відкриттям предметом даного винаходу є моноклональні антитіла, які впізнають консервативний епітоп білка-пріона, і панспецифічна Суміш антитіл, яка містить моноклональні антитіла до окремих епітопів, що не перекриваються на білках-пріонах видів, у яких ТГЕ зустрічається в природних умовах (люди, велика рогата худоба, вівці, кози, олень, лося, норка, домашні і не домашні кішки, деякі види не домашніх жуйних тварин і багато які види інших приматів, відмінних від людини, які утримуються в зоопарках), і інших близько родинних видів, потенційно схильних до ТГЕ-інфекції. Антитіла виявляють PrP-Sc в фіксованій, обробленій тканині як показник наявності ТГЕ-інфекції і являють собою суміш чутливих реагентів для діагностики ТГЕ. Вказані реагенти на основі моноклональних антитіл до консервативних епітетів на PrP-Sc забезпечують специфічні, надійні і гнучкі засоби для точної діагностики ТГЕ. Застосування антитіл включають їх використання як реагентів для стандартизованого діагностичного тестування і порівняльних патологічних досліджень.

Наступним предметом даного винаходу є способи виявлення пріона або PrP-Sc як маркера ТГЕ, включаючи преклінічне виявлення інфікованих живих тварин і способи посмертного виявлення.

Іншим предметом даного винаходу є забезпечення неінвазивних діагностичних аналізів, заснованих на біопсії лімфоїдної тканини третьої повіки, і виявленні PrP-Sc *in situ* як практичний спосіб раннього виявлення PrP-Sc.

Ще один предмет відноситься до способів імуноаналізу, придатних для діагностичних досліджень і досліджень патогенезу ТГЕ у жуйних тварин і людей і придатних для виявлення, нагляду і контролю ТГЕ.

Інші цілі і переваги даного винаходу будуть легко зрозумілі з наступного опису.

У першому варіанті даний винахід охоплює моноклональні антитіла, які Специфічно зв'язуються з консервативним карбоксильним епітопом на білках-пріонах, ідентифікованих як Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser. Моноклональні антитіла зв'язуються з епітопом на PrP-білках в фіксованій або замороженій тканині, яка була оброблена для оголення прихованого епітета PrP-Sc і виключення відповідного епітопа PrP-C. З метою даного винаходу термін пріон або PrP-Sc визначають як білок, пов'язаний із захворюванням, який є маркером ТГЕ. Оскільки антитіла виявляють PrP-Sc як показник наявності ТГЕ-інфекції в фіксованій, обробленій тканині або в замороженій тканині, заздалегідь обробленій протеїназою K, щоб деградувати PrP-C, вони являють собою чутливий реагент для діагностики ТГЕ.

Антитіла згідно з даним винаходом отримували, як описано в прикладі 2 нижче. Коротко, синтезували пептид, що являє собою залишки білка вівці 217-233 (залишки білка бика 225-24J) Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala, і зв'язували його з активованим імідом малеїнової кислоти KLN для застосування як імуногену. Антисироватку і моноклональні антитіла від мишей, яким проводили інокуляцію, перевіряли на реактивність по відношенню до рекомбінантного PrP овець, щоб відібрати перехресно-реагуючі антитіла. Потім показали, що вказані антитіла реагують з PrP-Sc в фіксованій формаліном, гідратованій автоклавованій тканині овець, гібридного оленя і лося і великої рогатої худоби.

З метою даного винаходу моноклональними антитілами, які специфічно зв'язуються з консервативним епітопом PrP-Sc, що охоплюються даним винаходом, є антитіла, які специфічні по відношенню до епітопу продукту гена PrP, що містить пептид Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser, і виявляють PrP-C в замороженій необробленій тканині і PrP-Sc в фіксованій або замороженій обробленій тканині. Прикладом моноклональних антитіл, які зв'язуються з даним консервативним епітопом в фіксованій або нефіксованій обробленій тканині, є моноклональне антитіло F99/97.6.1. Ізотип даного антитіла являє собою IgG1.

Даний винахід також відноситься до способів імуноаналізу з використанням антитіл, включаючи імуногістохімічний аналіз і Вестерн-блоттинг. Антитіла придатні для виявлення PrP-Sc в фіксованій і нефіксованій тканині як показник наявності ТГЕ-інфекції.

У другому варіанті даний винахід відноситься до суміші моноклональних антитіл, що містить вищезазначене моноклональне антитіло в комбінації з другим моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з другим консервативним епітопом продукту гена PrP у овець, гібридного оленя і лося і великої рогатої худоби, визначеним як Ile-His-Phe-Gly. Вказані моноклональні антитіла детально описані в заявці на видачу патенту з реєстраційним №08/950271, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Вказаний епітоп далі визначили як епітоп, що містить амінокислоти 142-145 продукту гена PrP вівці, які ідентичні амінокислотам 142-145 продукту гена PrP оленячих тварин (гібридного оленя і лося Скелястих гір) і амінокислотам 150-153 продукту гена PrP бика. Антитіла володіють ще однією властивістю, що полягає в тому, що вони виявляють відкриті епітопи білка PrP-Sc в фіксованій або замороженій тканині, і таким чином вони придатні як реагент для діагностики ТГЕ у овець, кіз, великої рогатої худоби, гібридних оленів і лосів з ТГЕ природного походження. Присутність PrP-Sc свідчить про те, що тварини інфіковані скреїпі, енцефалопатією корів або хронічною виснажуючою хворобою.

Прикладом моноклональних антитіл, які зв'язуються з консервативним епітопом Ile-His-Phe-Gly білка PrP-

Sc в фіксованій або замороженій обробленій тканині жуйних тварин є моноклональне антитіло F89/160.1.5. Ізотип цього антитіла являє собою IgG1. Характер імуногістохімічного фарбування моноклонального антитіла F89/160.1.5 схожий з характером фарбування, описаним для головного мозку овець, заражених скреїп, з використанням поліклональної кролячої антисироватки до PrP вівці або хом'яка. Іншим прикладом моноклонального антитіла, яке специфічно зв'язується з епітопом, до якого направлене моноклональне антитіло F89/160.1.5, є моноклональне антитіло F89/193.1.5.

Повідомлялося про генетичну мінливість у кіз по амінокислотному залишку в епітопі, який впізнається моноклональними антитілами F89/160.1.5 і F89/193.1.5 (He на Met в кодоні 142) [W. Goldmann et al., Journal of General Virology 77: 2885-2891 (1996)], і повідомлялося про мутацію в гені вівці в кодоні 141 (Phe на Leu), яку фланкує епітоп [A. Bossers et al., Journal of General Virology 77: 2669-2673 (1996)]. Хоч ці зміни відбуваються тільки у невеликих субпопуляцій вказаних видів, існує імовірність, що дані зміни, або інші, ще не ідентифіковані зміни, можуть заважати скріпленню вказаних моноклональних антитіл з білком-пріоном, і важливе значення мають чутливі імуногістохімічні способи і способи преклінічного визначення для виявлення, нагляду і контролю ТГЕ, включаючи генетичні варіанти.

Несподівано автори даного винаходу виявили що комбінація (що позначається тут сумішшю моноклональних антитіл) антитіл до вказаних двох окремих епітопів, що не перекриваються, забезпечує оптимальне поєднання високої чутливості, визначеної специфічності і широкої реакційної здатності по відношенню до білка PrP, незважаючи на міжвидове і внутрішньовидове варіювання. Суміш моноклональних антитіл згідно з даним винаходом, мабуть, виявляє всі види і всі відомі варіанти, у яких зустрічається ТГЕ природного походження. Антитіла виявляють PrP-Sc в нефіксованій або фіксованій обробленій тканині як показник наявності ТГЕ-інфекції і являють собою суміш чутливих реагентів для діагностики ТГЕ. Вивчення послідовностей PrP, вміщених в GenBank (таблиця 1) показує, що суміш антитіл буде виявляти епітопи продукту гена PrP овець, великої рогатої худоби, людей, оленів, лосів, норки, домашніх кішок і 56 видів не домашніх жуйних тварин і приматів, відмінних від людини. Антитіла зв'язують епітопи, що не перехреснюються, в фіксованих формаліном тканинах, оскільки подвоєна концентрація будь-якого антитіла менш чутлива, ніж комбінування антитіл в рівній концентрації. Антитіла до кожного епітопу і суміш антитіл виявляють PrP-Sc в фіксованій або замороженій обробленій тканині як показник наявності ТГЕ-інфекції і являють собою чутливий реагент для діагностики ТГЕ. Зразки тканини, придатні для тестування на PrP-Sc включають лімфоїдну тканину, пов'язану з третьою повікою, тканину головного мозку, отриману при аутопсії, тканину, отриману при біопсії або аутопсії лімфатичного вузла, або тканину, отриману при біопсії або аутопсії селезінки. Моноклональне антитіло утворює комплекс антиген-антитіло, і пов'язане антитіло реєструють імунологічними способами, такими як твердофазний імуноферментний аналіз, Вестерн-блот-аналіз, дот-блот-аналіз, імунографія і імуноцитохімія.

Опис депонованої культури. Постійну лінію клітин (гібридома), яка продукує і секретує моноклональне антитіло F99/97.6.1, вмістили 6 квітня 1999р. на зберігання в Американську колекцію типів культур (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA, за умовами Будапештського договору, і привласнили інвентарний номер ATCC HB-12696. Постійну лінію клітин (гібридома), яка продукує і секретує моноклональне антитіло F89/160.1.5, депонували 24 вересня 1997р. в ATCC за умовами Будапештського договору, і привласнили інвентарний номер ATCC HB-12403. Постійну лінію клітин (гібридома), яка продукує і секретує моноклональне антитіло F89/193.1.5, депонували 25 травня 1999р. в ATCC за умовами Будапештського договору, і привласнили інвентарний номер PTA-114.

Таблиця 1

Види, в яких продукт гена PrP містить епітоп(и) Ile-His-Phe-Gly і/або Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser

Addax nasomaculatus	Gorilla gorilla
African dwarf goats	Hippotragus niger
Antilocapra Americana	Homo sapiens (людина), всі варіанти, що повідомлялися
Aotus trivirgatus	Hylobates lar
Ateles geoffroyi	Hylobates syndactylus
Ateles paniscus × ateles fusciceps	Macaca arctoides
Bison bonasus	Macaca fascicularis
Bos javanicus	Macaca fuscata
Bos primigenius	Macaca mulatta
Bos taurus (велика рогата худоба)	Macaca nemestrina
Budorcas taxicolor	Macaca sylvanus
Callicebus moloch	Mandrillus sphinx
Callithrix jacchus	Meriones unguiculatus
Camelus dromedaries	Mus musculus
Canis familiaris	Mustela spp (норка)
Capra hircus (коза),	Mustela putorius
обидва варіанти, що повідомлялися	Odocoileus hemionus hemionus
Capra ibex nubiana	(гібридний олень)

<i>Cebus apella</i>	<i>Odocoileus virginianus</i>
<i>Cercocebus aterrimus</i>	(білий хвостатий олень)
<i>Cercocebus torquatus atys</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
<i>Cercopithecus diana</i>	<i>Ovibos moschatus</i>
<i>Cercopithecus mona</i>	<i>Ovis aries</i> (домашні вівці),
<i>Cercopithecus neglectus</i>	всі, що повідомлялися
<i>Cercopithecus patas</i>	<i>Pan troglodytes</i>
<i>Gervus elaphus</i> spp (лось)	<i>Papio Hamadryas</i>
<i>Cervus nippon dybowskii</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
<i>Chlorocebus aethiops</i>	<i>Presbytis francoisi</i>
<i>Colobus guereza</i>	<i>Saimiri sciureus</i>
<i>Equus caballus</i>	<i>Sigmodon fulviventer</i>
<i>Equus przewalskii</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>
<i>Felis catus</i>	<i>Sus scrofa</i>
<i>Gazella subgutturosa</i>	<i>Theropithecus gelada</i>
<i>Giraffa camelopardalis</i>	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>
	<i>Trichosurus vulpecula</i>

Способи імуноаналізу з використанням антитіл також охоплюються даним винаходом. Коротко, щоб виявити PrP-Sc отримують зразок тканини від суб'єкта, якого має бути тестовано; тканину фіксують, наприклад, консервуванням в формаліні або параформальдегіді, як відомо в даній області. Потім зріз фіксованої тканини обробляють, щоб оголити прихований епітоп PrP-Sc і виключити відповідний епітоп PrP-клітинного білка, який експресується в тканинах нормальних тварин. Це зручно виконувати з допомогою (а) автоклавування гідратованого матеріалу, наприклад, автоклавування гідратованих зрізів у воді або буфері приблизно при 121°C протягом від 20 до 30 хвилин з подальшим охолодженням; (b) обробки 95-99% мурашиною кислотою протягом від 5 до 30 хвилин з подальшою стадією автоклавування гідратованого матеріалу або без вказаної стадії, або (c) розщеплення трипсином (наприклад, 0,1% трипсином протягом 20 хвилин при 37°C в Tris-HCl буфері, pH7,6). Забезпечують контакт фіксованої обробленої тканини з моноклональним антитілом або сумішшю моноклональних антитіл згідно з даним винаходом в кількості і в умовах, придатних для скріплення білка PrP-Sc, якщо він присутній в тканині. Як показано в прикладах, інкубація зразка тканини приблизно з 3-5мкг/мл будь-якого з моноклональних антитіл або з сумішшю приблизно 3-5мкг/мл кожного антитіла у відповідному буфері протягом 30 хвилин спричиняє скріплення антитіла з консервативним епітопом PrP-Sc. Пов'язане антитіло реєструють способами, відомими в даній області. В одному аспекті моноклональне антитіло, пов'язане зі зрізами тканини, виявляють при його контактуванні з міченим (ферментними, радіоактивними або флуоресцентними молекулами, що реєструються або молекулами біотину) реагентом, що реєструється проти імуноглобуліну миші (наприклад, IgG1) в таких умовах, щоб мічений реагент проти імуноглобуліну миші зв'язувався з моноклональним антитілом і потім міг бути виявлений по активності ферменту, радіоактивній або флуоресцентній мітці або по скріпленню біотинової мітки з молекулою авідину/стрептавідину, міченою ферментними, радіоактивними або флуоресцентними молекулами. У переважному варіанті реєстрацію виконують за допомогою послідовної інкубації реагенту проти імуноглобуліну миші, наприклад, біотинільованого антитіла проти IgG миші і стрептавідину, міченого пероксидазою хрому, з проміжними промивками в буфері, наприклад Tris-HCl-Твін 20. Додають індикаторний хромоген, такий як АЕС, щоб виявити пов'язане антитіло.

В альтернативному випадку заморожену тканину гомогенізують в детергенті і обробляють протеїназою К, щоб виключити смугу PrP-С з М.м. 35кД і виявити характерні складні смуги 28-32кД стійких до протеїнази К фрагментів PrP-Sc. Оброблені білки розділяють в поліакриламідних гелях і переносять на фільтри. Здійснюють контакт фільтра з моноклональним антитілом згідно з даним винаходом або із сумішшю моноклональних антитіл згідно з даним винаходом в кількості і в умовах, придатних для скріплення білка PrP-Sc в тому випадку, якщо він присутній в тканині. Антитіло або суміш антитіл виявляють, як описано вище, за винятком того, що переважною кінцевою стадією реєстрації є реєстрація за допомогою хемілюмінесцентного субстрату.

Як обговорювалося вище, антитіла згідно з даним винаходом придатні для діагностичних досліджень і досліджень патогенезу ТГЕ.

Наступні приклади призначені тільки для подальшої ілюстрації винаходу і не призначені для обмеження рамок винаходу, які визначені формулою винаходу.

Приклад 1

Наступний приклад описує детекційний аналіз PrP-Sc з використанням суміші згідно з даним винаходом в лімфоїдній тканині вівці.

Тестовані тварини. У двадцяти семи овець породи Суффолк або родинних чорномордих порід з стад, про які невідомо, чи контактували вони з вівцями, інфікованими скреїпі, брали зразки за допомогою біопсії лімфоїдної тканини мигальної перетинки. У сорока семи овець з стад, що зазнавали впливу скреїпі, зразки брали при аутопсії; збирали, як мінімум, головний мозок, ретрофарингеальний лімфатичний вузол і мигдалики. Всі тканини були негативні у відношенні PrP-Sc при імуногістохімічному аналізі, і ні в одній з них не виявили пошкоджень, характерних для скреїпі. У сорока п'яти овець брали зразки за життя і ще раз при аутопсії, або

зразки брали тільки під час забою після того, як спостерігали клінічні симптоми скреїпі. Як мінімум, збирали головний мозок і лімфоїдну тканину мигальної перетинки. Зразки головного мозку всіх 45 овець були позитивні по накопиченню PrP-Sc в головному мозку, і діагностовані, як заражені скреїпі, що було встановлено лабораторіями національної ветеринарної служби, Ames IA.

Коротко, лімфоїдну тканину мигальної перетинки і/або ретрофарингеального вузла отримували, використовуючи стандартні способи гістопатологічної обробки, за винятком того, що більшість тканин очищали мурашиною кислотою (99%, одна година) перед заливкою. Зрізи товщиною три мікрони вміщували на предметне скло. Зрізи кодували і передавали в три лабораторії для імунного фарбування. Всі лабораторії отримували суміш моноклональних антитіл F89/160.1.5 і F99/97.6.1 в кінцевій концентрації 0,5мг/мл кожного антитіла. Зразки також повторно тестували в U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Animal Disease Research Unit (USDA, ARS, ADRU). Зразки в ADRU і в лабораторії 1 аналізували, використовуючи автоматизований пристрій для імуофарбування Ventana Medical Systems, Inc. і реактиви, що рекомендуються виробником для детекції з пероксидазою хрому/AEC (ADRU) або детекції з лужною фосфатазою/Fast Red (лабораторія 1). У лабораторії 2 зрізи фарбували, використовуючи автоматизований пристрій для імуофарбування DAKO і комплект реактивів DAKO, і в лабораторії 3 використовували автоматизований пристрій для імуофарбування в капілярній щілині з реактивами, описаними раніше [J.M.Miller et al., Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6: 366-368 (1994)]. Результати зводили в таблиці в ADRU.

З 27 овець, про які не було відомо, чи зазнавали вони впливу скреїпі, 26 були оцінені негативно у всіх лабораторіях; один зразок оцінили позитивно в одній лабораторії (лабораторія 3). З 47 овець, що зазнавали впливу скреїпі, але не виявляючих ознак наявності PrP-Sc в головному мозку або лімфатичних вузлах з використанням аналізу за допомогою імуофарбування в ADRU, 42 були оцінені негативно у всіх трьох лабораторіях. П'ять зразків були оцінені позитивними в лабораторії 3. В 45 овець зі скреїпі, діагностованих на основі позитивного імуофарбування PrP-Sc в головному мозку, 44 були позитивними при повторному тестуванні в ADRU, 43 були позитивними в лабораторіях 2 і 3.

Загалом вказане дослідження показало, що суміш моноклонального антитіла F89/160.1.5 і моноклонального антитіла F99/97.6.1 виявляє PrP-Sc в лімфоїдній тканині овець в різних звичайних лабораторних умовах. Імуногістохімічний аналіз лімфоїдної тканини третьої повіки є, чутливим (93%) і специфічним (100%) діагностичним тестом для скреїпі овець. Інфіковані вівці можна ідентифікувати приблизно в першій третині інкубаційного періоду. Аналіз також придатний в дослідженнях генетично зумовленої чутливості, шляху передачі і патогенезу. Широка видова реактивність моноклональних антитіл F89/160.1.5 і F99/97.6.1 робить цю суміш реагентів придатною для імуногістохімічного аналізу імуноблот-аналізу нервової і не нервових тканин всіх видів, у яких зустрічається ТГЕ природного походження, і для нагляду за родинними видами, схильними до ТГЕ в умовах промислу і в зоологічних садах.

Приклад 2

Наступний приклад описує отримання і характеристику моноклональних антитіл, які специфічно зв'язуються з консервативним епітопом PrP-Sc у жуйних тварин або інших тварин і у людей.

Коротко, п'ять мишей імунізували синтетичним пептидом, що представляє амінокислоти 217-233 продукту гена PrP вівці (амінокислоти 225-241 продукту гена PrP бика), кон'югованим з KLH. Проводили скринінг антисироватки і надосадів гібридом за допомогою ELISA, використовуючи як антиген рекомбінантний гібридний білок PrP вівці, як описано в заявці з реєстраційним №08/950271. Лінія клітин 99/97 продукувала антитіла, реагуючі в ELISA, і була відібрана для двох раундів клонування методом лімітуючого розведення. Клітки гібридами двічі клонованої лінії (F99/97.6.1) переносили в систему отримання культури клітин штучних капілярів *in vitro*. Надосад культури тканини з концентрацією моноклонального антитіла F99/97.6.1. (IgG1) від 2 до 4мг/мл далі характеризували за допомогою картування епітопів, імуноблот-аналізом і імуногістохімічним аналізом.

Матеріали і способи

Одержання антигену і продукція моноклонального антитіла. Синтезували пептид NH₂-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln, що представляє залишки 225-241 продукту гена пріона бика (Hosiuchi et al., вище) і зв'язували з активованим імідом малеїнової кислоти гемоціаніном морського блюдця «замочна щілина» (KLH) (Pierce Chemical Company). Кожній з мишей BALB/c 6-тижневого віку підшкірно в два місця інокулювали всього 10мкг кон'югованого пептиду, емульгованого в 200мкл повного ад'юванта Фрейнда. Дві повторні інокуляції 10мкг кон'югованого пептиду в 200мкл неповного ад'юванта Фрейнда вводили з інтервалами в 14 днів. Сироватку, зібрану венепункцією хвостової вени, аналізували ELISA з використанням в якості антигену рекомбінантного PrP-С вівці (дивись нижче). За три дні до злиття клітин мишей імунізували внутрішньовенно 10мкг кон'югованого пептиду в фосфатно-сольовому буфері (PBS) без ад'юванту. Злиття клітин і клонування методом лімітуючого розведення виконували, слідуючи стандартним протоколам [W.M.Yokoyama, In: J.E.Coligan (ed.), Current Protocols in Immunology, Wiley Intersciences, New York, p.2.2.1-2.5.17 (1994)]. Проводили скринінг надосадів первинних і клонованих гібридом методом ELISA з рекомбінантним PrP-С вівці. Відібрали клон 6.1 лінії клітин F99/97 і перенесли в систему культури клітин штучних капілярів (CellMax, CellCo Inc.) для отримання *in vitro* надосаду, що містить моноклональні антитіла. Надосади збирали щодня і об'єднували. Ізотип важкого ланцюга ідентифікували ELISA, а концентрацію моноклональних антитіл визначали імунодифузією.

Одержання рекомбінантного PrP-С вівці в *Escherichia coli*. Генотипу ДНК виділяли з мононуклеарних клітин периферичної крові овець породи Суффолк. Відкриту рамку прочитання PrP ампліфікували з використанням фланкуючих праймерів [D.Westaway et al., Genes Devel. 8: 959-969 (1994)], модифікованих так, щоб вони включали сайти рестрикції EcoRI:

прямий праймер: 5'-ATCGAATTCAAGAAGCGACCAAAAC-3'

зворотний праймер: 5'-ATCGAATTCAGACACCACCACT-3'

Продукт ПЛР довжиною 700п.н. розщеплювали EcoRI, очищували в агарозних гелях і лігували у вектор

pMal-cRI. Трансформацію штаму DH5 E.coli виконували, слідуючи традиційним способам. Проводили скринінг трансформантів шляхом ПЛР мініпрепаратів колоній, використовуючи праймери для клонування. Вибрали один позитивний клон (shPrP-pMal-1) для крупномасштабно! експресії злитого білка. Злитий продукт ShPrP-MBP виділяли з лізатів бактерій афінною хроматографією на колонках з амілозною смолою і елюювали 10мМ мальтозою. Проводили скринінг фракцій за допомогою Вестерн-імуноблота, використовуючи кролячу антисироватку до PrP-пептиду NH₂-Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Asn-Gln-Trp-Asn-Lys-Pro-Ser-Lys-COOH (R2843) [K.I.O'Rourke et al., J.Gen. Virol. 75: 1511-1514(1994)].

Твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA). 2 планшета Immulon покривали 6,25мкг на лунку рекомбінантного злитого білка ShPrP-MBP в 50мкл 0,05М карбонатного буфера, pH9,6 протягом ночі при 4°C. Планшети блокували комерційно доступним блокуючим агентом на основі молока в розведенні 1:15 (KPL, Gaithersburg, MD) протягом однієї години. У кожній лунці інкубували 50мкл антисироватки або надосаду гібридом протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Планшети виявляли за допомогою антимишачого антитіла кози - пероксидази хрому і сульфонату 2,2'-азіноди[3-етилбензотіазоліну] [R.Fatzer et al., Zentralbl. Veterinarmed. A. 43: 23-29 (1996)] (ABTS) (KPL, Gaithersburg, MD). Оптичну щільність вимірювали при 405нм. Негативні контролю включали в себе сироватку неінокульованих мишей, надосади відповідних за ізотипом моноклональних антитіл невідповідної специфічності, або середовище культури тканини з концентрацією фетальної бичачої сироватки, доведеною до 15%. Лунки з позитивними контролюми інкубували з кролячою антисироваткою проти пептиду PrP (R2843) і виявляли за допомогою антикролячого антитіла кози - пероксидази хрому (HRPO) і ABTS. У позитивних лунках OD405 перевищувало два стандартних відхилення вище середнього значення для 4 лунок з негативними контролюми.

Визначення епітопа, що зв'язується моноклональним антитілом F99/97.6.1. Набір пептидів, що перекриваються з 6 амінокислот кожний, охоплюючий Val-Glu-Gm-Met-Qys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg, синтезували на мембранній підкладці, використовуючи традиційні способи, відомі фахівцям в даній області (Sigma-Genosys). Здатність моноклонального антитіла F99/197.6.1. зв'язувати індивідуальні пептиди визначали візуально після інкубації з антитілом проти IgG миші - пероксидазою хрому і хемілюмінесцентним субстратом і експозиції фільтрів з плівкою Kodak X-Omat.

Джерело і послідовність гена PrP жуйних травоядних тварин з ТГЕ природного походження. Тканини головного мозку 34 овець з гістопатологічними пошкодженнями скреїпи тестували у відношенні реактивності з моноклональним антитілом F99/97.6.1 за допомогою імуногістохімії. PrP-Sc виявили імуногістохімічно, використовуючи поліклональну антисироватку кролика проти PrP хом'яка, в 20 з вказаних образів, і за допомогою Вестерн-імуноблота в 6 з 20 [J.M.Miller, Diagn Invent. 5: 309-316 (1993)]. Три вівці без гістопатологічних пошкоджень скреїпи, в яких не виявлявся PrP-Sc при Вестерн-блот-аналізі, використали як негативні контролю. Вказані тканини були надані патологами колегій ветеринарів і діагностичними лабораторіями штату або персоналом інспекційної служби здоров'я тварин і рослин USDA. Зразки головного мозку 10 гібридних оленів (*Odocoileus hemionus hemionus*) і 4 лодів (*Cervus elaphus nelsoni*) з CWD природного походження були надані діагностичною лабораторією штату Колорадо і Відділенням живої природи штату Колорадо. Незабарвлені зрізи від 10 корів з BSE і 5 BSE-негативних корів були надані лабораторією патобіології лабораторій Національної ветеринарної служби USDA-APHIS, Ames, IA. Парафінові блоки для вказаних зрізів надані Dr. Gerald Wells, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, New Haw, Surrey, United Kingdom.

Для аналізу генотипу PrP були заморожені тканини головного мозку 12 з 34 скреїпи-позитивних овець, всіх 10 гібридних оленів з CWD і 42 уражених CWD лосів. Також були зразки крові 150 здорових гібридних «оленів» і 244 здорових лосів. Відкриту рамку прочитання гена PrP вівці ампліфікували в полімеразній ланцюговій реакції, як описано вище, і поліморфний район з кодонів 112-240 секвенували на обох нитках за допомогою автоматизованої термінації ниток міченими флуоресцентним барвником дидезоксинуклеотидами [Anim. Biotech. 7: 155-162 (1996)]. Ампліфікували від 100 до 800нг геномної ДНК гібридного оленя або лося, використовуючи видоспецифічні праймери:

прямий 5'CTGCAAGAAGCGACCAAAACC

зворотний 5'CACAGGAGGGGAGGAGAAGAGGAT

в стандартних умовах, за винятком того, що концентрація Mg⁺² була збільшена до 2,5мМ. Продукти ПЛР секвенували на обох нитках, використовуючи

прямий праймер 5'GGCTATCCACCTCAGGGAG

зворотний праймер 5'TCACACTTGCCCCCTCTTTGGT

які звичайно давали інформацію про послідовність в кодонах з 106 по 224.

Імуноблот-аналіз. PrP-Sc виділяли з головного мозку вівці з клінічними симптомами скреїпи диференціальним центрифугуванням з буфера з саркозілом, як описане Race et al, вище. Звичайно 0,3г головного мозку гомогенізували в 50мМ Трис-HCl, 5мМ MgCl₂, pH7,4, використовуючи обробку ультразвуком. Гомогенат доводили до концентрації РНКаз 80мкг/мл і ДНКаз 20мкг/мл і інкубували при 37°C протягом однієї години. Додавали рівний об'єм 20% (мас/об.) саркозілу і інкубували протягом 1,5 години при кімнатній температурі. Після центрифугування при 2000хг протягом 30 хвилин при 20°C надосад витягували і центрифугували при 200000хг протягом 2,5 годин при 20°C. Осаджений матеріал ресуспендували в 300мкл 50мМ Трис-HCl, pH7,4 при обробці ультразвуком. Концентрацію протеїнази К в суспензії доводили до 10мкг/мл протягом однієї години при 37°C, щоб гідролізувати PrP-С. Після додавання Pefabloc (Boehringer Mannheim), щоб зупинити дію ферменту, суспензію центрифугували при 200000хг протягом 1 години при 20°C. Осад кип'ятили в 300мкл SDS-буфера для зразків для імуноблот-аналізу. Пізні кількості розділяли в 15% поліакриламідних гелях і переносили на мембрани PVDF (Millipore). Мембрани обробляли 3мкг/мл F99/97.6.1, контрольним моноклональним антитілом схожого ізотипу або 3мкг/мл F99/97.6.1, заздалегідь абсорбованим з 100-кратним молярним надлишком пептиду Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala, щоб специфічно виключити реакційну здатність моноклонального антитіла. Пов'язане антитіло детектували за допомогою антитіла кози проти IgG1 миші, кон'югованого з пероксидазою хрому (Caltag Laboratories) і виявляли за

допомогою хемілюмінесцентного субстрату (ECL, Amersham). Фільтри експонували з плівкою (Amersham Hyperfilm) протягом від 20 до 120 хвилин.

Імуногістохімія. Головний мозок фіксували в 10% забуференому формаліні зануренням і заливтням в парафінові блоки. Один зріз з кожного блоку фарбували гематоксиліном і еозином для звичайного гістопатологічного аналізу. Додаткові зрізи тканини вміщували на оброблене силаном предметне скло для імуногістохімії. Зрізи депарафінували і гідратували. Зрізи інкубували в 99% мурашиній кислоті протягом 5 хвилин, потім промивали і нейтралізували 0,1М Трис-HCl, pH7,6. Зрізи обробляли теплом в автоклаві або нагрівнику під тиском при 121°C протягом 20 хвилин в модифікованому цитратному буфері, pH6,1 (буфер DAKO TR). Скло послідовно інкубували в буфері з перекисом водню, щоб блокувати ендogenous пероксидазу, із сумішшю моноклональних антитіл F89/160.1.5 і F99/97.6.1 по 3мкг/мл кожного в Трис-казеїновому розріджувачі (32 хвилини при 37°C), біотинільованим антитілом кози проти IgG миші (8 хвилин при 37°C), стрептавідином - пероксидазою хрому (8 хвилин при 37°C), АЕС/перекис водню (8 хвилин, 37°C) і потім протилежно фарбували гематоксиліном. Тканини вміщували у водне середовище для накладення покривного скла. Негативні контролю полягали в (1) заміні суміші моноклональних антитіл невідповідним моноклональним антитілом схожої концентрації того ж ізо типу (IgG1) і (2) інкубації суміші моноклональних антитіл з тканиною головного мозку і лімфоїдною тканиною не заражених скрепів овець, як показане гістопатологічним аналізом і Вестерн-блот-аналізом.

Послідовності генів гібридного оленя і лося. Ідентифікували три алелі послідовності PrP гібридного оленя. Алелі 138S2 (GenBank, інвентарний номер AF009180) і 138N1 (інвентарний номер U97331) кодують Ser і Asn в кодоні 138. Алель S1 (інвентарний номер AF009181) відрізняється від S2 мутацією, що мовчить. Виявлені два алелі гену PrP лося (GenBank AF016227, AF016228), що кодують заміну M→L в кодоні 132.

Результати

Картування епітопів і визначення послідовностей. Епітоп, який впізнається моноклональним антитілом F99/97.6.1, картували за допомогою панелі пептидів, що перекриваються. Виявлено, що для скріплення антитіла достатні залишки 220-225 (Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser). Вказана послідовність консервативна в розрахованих амінокислотних послідовностях алелей великої рогатої худоби, гібридних оленів, лосів, кіз, людей і овець, а також у 32 видів групи ризику у відношенні ТГЕ. Епітоп виявлений у випадку варіантного алеля *C.hircus* (коза) (GenBank X91999) з поліморфізмом в сайті скріплення F89/160.1.5, і варіантного алеля *O. aries* (вівці) з поліморфізмом в районі, безпосередньо попередньому епітопу для F89/160.1.5 [дані приведені в A. Bossers et al., Archives of Virology 144: 829-834(1999)].

Реактивність в імуноблотах по відношенню до PrP-Sc овець, заражених ТГЕ. Специфічність моноклонального антитіла F99/97.6.1 оцінювали Вестерн-блот-аналізом препаратів PrP-Sc від овець зі скрепів природного походження і від нормальних овець. Смуги пептидів з уявною молекулярною масою в межах 28-35кД виявляли в екстрактах головного мозку овець, уражених скрепів. Смуги не виявляли в екстрактах головного мозку нормальних овець або в тому випадку, коли використали відповідне за ізо типом контрольне моноклональне антитіло, або в тому випадку, коли проводили абсорбцію F99/97.6.1 за допомогою пептидів, що містять епітоп, з яким зв'язується вказане антитіло.

Імуногістохімія тканин нормальних і уражених ТГЕ жуйних тварин. Моноклональне антитіло F99/97.6.1 далі оцінювали відносно реактивності за допомогою імуногістохімії на фіксованій формаліном, заливтій в парафін тканині головного мозку, підготовленій звичайним способом для гістопатологічного дослідження. У всіх тварин, уражених ТГЕ, мав місце спонгіоз нейропілія, внутрішньонейронні вакуолі і гліоз у вибраних ядрах стовбура мозку і середнього мозку, пошкодження, що є діагностичними для ТГЕ. Для імуногістохімічного дослідження, як мінімум, відбирали середній мозок (на рівні рострального горбика) і довгастий мозок (на рівні засувки). Теплова обробка автоклавування була необхідна для того, щоб оголити прихований епітоп PrP-Sc, зв'язуючий моноклональне антитіло F99/97.6.1.

Виявлене позитивне фарбування в головному мозку овець зі скрепів природного походження, гібридних оленів і лосів з CWD і великої рогатої худоби з BSE. Реактивність була обмежена сірою речовиною в середньому мозку і стовбурі мозку, була сконцентрована в уражених ядрах і була присутнім в нейропілії і в нейронах і гліальних клітинах. Велика частина імунофарбування складалася з щільних гранул або бляшок, випадково розподілених в нейропілії сірої речовини. Часто PrP-Sc, агрегований поблизу ядер гліальних клітин і що нагромаджується у вигляді відгалужень навколо гліальних клітин, гістологічно ідентифікували як мікроглію (невеликі, від овальних до загострених гіперхроматичних ядер без розпізнаваної цитоплазми). Мало місце випадкове периваскулярне і субependимальне покриття білком PrP-Sc, що нагадує ніжки астрогліальних паростків. Реактивність нейронів полягала в крапковому імунофарбуванні в тілі нейронів або виразному покритті тіла нейрона білком PrP-Sc, або в межах мембран нейронів, або в межах перинейронних гліальних паростків. PrP-Sc-реактивністю володіли як нейрони без внутрішньонейронних вакуолів, так і нейрони з вакуолями. Не виявлено реактивності в головному мозку незаражених овець, оленів, лосів або великої рогатої худоби при імунофарбуванні з використанням моноклонального антитіла F99/97.6.1. або в головному мозку заражених скрепів овець або BSE-позитивної великої рогатої худоби при імунофарбуванні з використанням контрольного моноклонального антитіла відповідного ізо типу.

Зрозуміло, що вищезгаданий докладний опис приводиться тільки з метою ілюстрації, і що можуть бути здійснені модифікації і варіації винаходу, не відходячи від суті і не виходячи за рамки винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> O'Rourke, Katherine I.

<120> Моноклональні антитіла і суміш антитіл для виявлення білка-пріона як показника трансмісивних губчастих енцефалопатій

<130> O'Rourke

<140> 09/353,348

<141> 1999-07-15

<160> 11

<170> Патент, версія 2.1
 <210> 1
 <211> 6
 <212> Білок
 <213> Ovis aries
 <400> 1

Gln Tyr Gln Arg Glu Ser

1 5
 <210> 2
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Bos taurus
 <400> 2

Ile His Phe Gly

1
 <210> 3
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Ovis aries
 <400> 3

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
 1 5 10 15

Ala
 <210> 4
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Ovisaries
 <400> 4
 atcgaattca agaagcgaec aaaac 25
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Ovisaries
 <400> 5
 atcgaattca gacaccacca ct 22
 <210> 6
 <211> 15
 <212> Білок '
 <213> Mesocricetus auratus
 <400> 6

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

1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 26
 <212> Білок
 <213> Ovis aries
 <400> 7

Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr
 1 5 10 15

Tyr Gln Arg Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe
 20 25
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Odocoileus hemionus hemionus
 <400> 8
 ctgcaagaag cgaccaaac c 21
 <210> 9
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Odocoileus hemionus hemionus
 <400> 9
 cacaggaggg gaggagaaga ggat 24
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Odocoileus hemionus hemionus
 <400> 10
 ggctatccac ctcaggag 19

<210> 11
<211> 22
<212> ДНК
<213> *Odocoileus hemionus hemionus*
<400> 11
tcacacttgc cccctcttg gt 22