



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76115 (13) C2
(51) МПК (2006)
G01N 33/68
G01N 29/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) РАННЯ ДІАГНОСТИКА КОНФОРМАЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

(21) 2003021096
(22) 13.06.2001
(24) 17.07.2006
(86) PCT/GB01/02584, 13.06.2001
(31) 00114650.5
(32) 07.07.2000
(33) EP
(31) 00127892.8
(32) 20.12.2000
(33) EP
(31) 01102732.3
(32) 07.02.2001
(33) EP
(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.
(72) Сото Клаудіо, СН, Саборіо Габріелла, FR
(73) АППЛАЙД РЕЗЕЧ СІСТЕМЗ АРС ХОЛДІНГ Н.В., NL
(56) Caughey B. et al: "Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state" Chemistry & biology. England Dec 1995, vol. 2, no. 12, pages 807-817. EP 0391714 A, 1990-10-10 WO 98 16834 A, 1998-04-23 WO 97 16728 A, 1997-05-09
(57) 1. Спосіб діагностики або виявлення конформаційного захворювання, яке характеризується конформаційним перетворенням білка, що лежить в його основі, з непатогенного у патогенний конформер, шляхом аналізу зразка на маркер вказаного захворювання; зазначений спосіб включає в себе:
(i) контактування вказаного зразка з певною кількістю непатогенного конформера;
(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i); і
(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку вказаного патогенного конформера, де патогенний конформер є маркером наявності вказаного захворювання, причому стадія (i) включає в себе стадію (ia) інкубування вказаного зразка/непатогенного конформера, а стадії (ia) та (ii) утворюють цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii).
2. Спосіб за п. 1, де цикл повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

2

3. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де стадію (i) здійснюють у фізіологічних умовах.
4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де кількість непатогенного конформера на стадії (i) є надмірною кількістю.
5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де конформаційне захворювання являє собою трансмісивне конформаційне захворювання.
6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де конформаційне захворювання вибране з трансмісивної спонгіформної енцефалопатії і деменції Альцгеймера.
7. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, де зразок, що аналізується, піддають попередній обробці для вибіркового концентрування патогенного конформера у зразку.
8. Спосіб за п. 7, де патогенним конформером є PrP^{Sc}, а попередня обробка являє собою екстрагування зі зразка фракції, яка є нерозчинною у м'яких детергентах.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, де патогенним конформером є PrP^{Sc}, непатогенним конформером є PrP^C, а білком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.
10. Спосіб ідентифікації сполуки, яка модулює конформаційне перетворення білка, що лежить в основі захворювання, з непатогенного у патогенний конформер, що включає в себе:
(i) контактування певної кількості непатогенного конформера з певною кількістю патогенного конформера (1) у присутності вказаної сполуки і (2) за відсутності вказаної сполуки;
(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i), і
(iii) визначення кількості патогенного конформера (1) у присутності вказаної сполуки і (2) за відсутності вказаної сполуки, причому стадія (i) включає в себе стадію (ia) інкубування вказаного патогенного конформера/непатогенного конформера, а стадії (ia) та (ii) утворюють цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii).
11. Спосіб за п. 10, де цикл, який утворюється стадіями (ia) та (ii), повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).
12. Спосіб за п. 10, де патогенним конформером є PrP^{Sc}, непатогенним конформером є PrP^C, а біл-

(19) UA (11) 76115 (13) C2

ком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.

13. Спосіб виявлення наявності патогенної форми пріонного білка у зразку, що включає в себе:

(i) контактування вказаного зразка з певною кількістю непатогенного пріонного білка;

(ia) інкубування зразка/непатогенного пріонного білка;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; а потім

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку патогенного пріонного білка.

14. Спосіб за п. 13, де цикл, який утворюється стадіями (ia) та (ii), повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

15. Спосіб за п. 13, де патогенним конформером є PrP^{Sc} , непатогенним конформером є PrP^{C} , а білком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.

16. Спосіб діагностики хвороби Крейтцфельда-Якоба у пацієнта, що включає в себе взяття зразка у пацієнта:

(i) контактування зразка з певною кількістю білка PrP^{C} ;

(ia) інкубування зразка/білка PrP^{C} ;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; і потім

(iii) визначення наявності і/або кількості PrP^{Sc} у зразку.

17. Спосіб за п. 16, де цикл, який утворюється стадіями (ia) та (ii), повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

18. Спосіб за п. 16, де патогенним конформером є PrP^{Sc} , непатогенним конформером є PrP^{C} , а білком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.

19. Спосіб виявлення наявності патогенної форми β -амілоїдного білка у зразку, що включає в себе:

(i) контактування зразка з певною кількістю непатогенного β -амілоїдного білка;

(ia) інкубування зразка/непатогенного β -амілоїдного білка;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; і потім

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку патогенного β -амілоїдного білка.

20. Спосіб за п. 19, де цикл, який утворюється стадіями (ia) та (ii), повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

21. Спосіб за п. 19, де патогенним конформером є PrP^{Sc} , непатогенним конформером є PrP^{C} , а біл-

ком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.

22. Спосіб діагностики хвороби Альцгеймера у пацієнта, що включає в себе взяття зразка у пацієнта:

(i) контактування зразка з певною кількістю непатогенного β -амілоїдного білка;

(ia) інкубування зразка/непатогенного β -амілоїдного білка;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; і потім

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку патогенного β -амілоїдного білка.

23. Спосіб за п. 22, де цикл, який утворюється стадіями (ia) та (ii), повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

24. Спосіб за пп. 22, 23, де патогенним конформером є PrP^{Sc} , непатогенним конформером є PrP^{C} , а білком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.

25. Спосіб аналізу на виявлення маркера конформаційного захворювання, яке характеризується конформаційним перетворенням білка, що лежить в його основі, з непатогенного у патогенний конформер у зразку, де вказаний аналіз включає в себе наступні стадії:

(i) контактування вказаного зразка з певною кількістю непатогенного конформера;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i); і

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку вказаного патогенного конформера, причому патогенний конформер є маркером наявності вказаного захворювання, причому стадія (i) включає в себе стадію (ia) інкубування вказаного зразка/непатогенного конформера, а стадії (ia) та (ii) утворюють цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii).

26. Спосіб аналізу за п. 25, де цикл, який утворюється стадіями (ia) та (ii), повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

27. Спосіб аналізу за будь-яким з пп. 25, 26, де патогенним конформером є PrP^{Sc} , непатогенним конформером є PrP^{C} , а білком, що лежить в основі захворювання, є пріонний білок.

28. Діагностичний набір для застосування в аналізі за будь-яким з пп. 25-27, який включає в себе певну кількість непатогенного конформера, багатоямковий мікротитраційний планшет і багатоямковий ультразвуковий пристрій.

29. Апарат для застосування при діагностиці конформаційного захворювання за будь-яким з пп. 1-27, що включає в себе мікротитраційний планшет, багатоямковий ультразвуковий пристрій і надлишкову кількість непатогенного конформера.

Даний винахід відноситься до способу діагностики або виявлення конформаційних захворювань шляхом аналізу зразка на наявність маркера (тобто, патогенного конформера) вказаних захворювань; зазначений спосіб включає в себе використання циклічної ампліфікаційної системи для

підвищення рівнів патогенного конформера. Зокрема, вказані конформаційні захворювання можуть являти собою пріонні енцефалопатії.

Конформаційні захворювання являють собою групу розладів, що не мають очевидного зв'язку один з одним, але мають виражену подібність у

клінічних виявах, яка відображає їх спільні молекулярні механізми стимуляції та самоасоціації, з подальшим депонуванням і пошкодженням тканин.

Інтерес до структури виникає завдяки тому факту, що вказані різні захворювання викликаються конформаційним перетворенням білка, який лежить в їх основі, що звичайно приводить до його агрегації та депонування у тканинах. З медичної точки зору, проявлення вказаних конформаційних захворювань відображає даний молекулярний механізм, звичайно з повільним початком, що непомітно настає, коли перетворення спостерігається у нормальному білку, але з більш раптовим початком, коли воно спостерігається у нестабільному варіанті білка. Двома прикладами особливої важливості вказаних конформаційних захворювань є трансмісивні спонгіформні енцефалопатії і деменція Альцгеймера - захворювання, яке загрожує стати руйнівним для систем охорони здоров'я у розвинутих країнах [див. огляд Carrell et al., 1997].

Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (TSE), відомі також як пріонні захворювання, являють собою групу нейродегенеративних захворювань, які уражають людину і тварин. Хвороба Крейтцфельда-Якоба (CJD), куру, хвороба Герстманна-Штраусслера-Шейкера (GSS) і фатальне сімейне безсоння (FFI) у людини, а також скріп (свербець) і спонгіформна енцефалопатія великої рогатої худоби (BSE) у тварин являють собою деякі з захворювань TSE [Prusiner, 1991].

Незважаючи на те, що дані захворювання людини є відносно рідкісними, ризик можливої передачі BSE людині по харчовому ланцюгу береться до уваги органами управління охороною здоров'я і науковим співтовариством [Cousens et al., 1997, Bruce et al., 1997].

Дані захворювання відрізняються надто тривалим інкубаційним періодом, за яким слідує коротка і неминуче смертельна клінічна стадія хвороби [Roos et al., 1973]. На сьогоднішній день лікування не розроблене.

Ключовою характеристикою даного захворювання є утворення білка патологічної конфігурації, що називається PrP^{Sc}, який являє собою посттрансляційно модифіковану версію нормального білка, що називається PrP^C [Cohen and Prusiner, 1998]. Для розрізнення ізоформ PrP не було виявлено хімічних відмінностей [Stahl et al., 1993], і конверсія, як представляється, являє собою конформаційну зміну, в той час як α -спіральний вміст нормального білка зменшується, а кількість β -складчастої структури збільшується [Pan et al., 1993]. За структурними змінами слідують зміни біохімічних властивостей: PrP^C є розчинним у денатурантах, що не денатурують, PrP є нерозчинним; PrP легко розщеплюється протеазами, в той час як PrP^{Sc} є частково резистентним, що приводить до утворення N-термінально зрізаного фрагмента, відомого як форма "PrPres" [Baldwin et al., 1995; Cohen and Prusiner, 1998], "Prp 27-30" (27-30кДа) або "PK-резистентна" (резистентна до протеїнази K).

На сьогоднішній день точної діагностики TSE не існує [доповідь BOO3, 1998р., Budka et al., 1995, Weber et al., 1997]. Спроби розробити діагностичний тест для виявлення пріонних захворю-

вань ускладнюються очевидною відсутністю імунної відповіді на PrP^{Sc}. Клінічний діагноз CJD на сьогоднішній день базується на поєднанні підгострої прогресуючої деменції (менш ніж за 2 роки), міоклонусу та мультифокальної неврологічної дисфункції, пов'язаних з характерною періодичною електроенцефалограмою (ЕЕГ) [доповідь BOO3, 1998р., Weber et al., 1997]. Однак варіант CJD (vCJD), більшість ятрогенних форм CJD і до 40% спорадичних випадків не показують відхилень ЕЕГ [Steinhoff et al., 1996]. У середньому точність клінічної діагностики складає близько 60% для CJD і є високою мірою мінливою для інших зв'язаних з пріонами захворювань. Клінічна діагностика є більш точною тільки на пізніх стадіях захворювання, коли розвиваються чіткі симптоми [Weber et al., 1997].

Генетичний аналіз є придатним для діагностики спадкових пріонних захворювань, але останні представляють лише 15% всіх випадків. Методики візуалізації ЦНС є придатними тільки для виключення інших станів швидко прогресуючої деменції, завдяки структурним пошкодженням головного мозку [Weber et al., 1997]. Знахідки, зроблені за допомогою методик, що візуалізують головний мозок, шляхом комп'ютерної томографії (КТ) і методик ядерного магнітного резонансу (ЯМР), залежать, головним чином, від стадії захворювання. КТ є значно менш чутливою методикою, і на ранній стадії у 80% випадків атрофія не виявляється [Galvez and Cartier, 1983]. Крім атрофії, виявляються надінтенсивні сигнали ЯМР на базальних гангліях [Onofrj et al., 1993]. Як і зміни, що спостерігаються за допомогою КТ, дані зміни жодним чином не є специфічними.

Нещодавні дослідження дали можливість ідентифікувати декілька білків нейронів, астроцитів і глії, вміст яких підвищується при CJD [Jimi et al., 1992]. Рівні білка S-100, нейрон-специфічного ізоферменту і убіквітину значно підвищуються у цереброспінальній рідині (CSF) на ранній стадії захворювання, з підвищенням концентрацій у ході захворювання [Jimi et al., 1992]. Маркер загибелі нейронів, білок 14-3-3, був запропонований як специфічний і чутливий тест на спорадичну CJD [Hsich et al., 1996]. Однак він не підходить для діагностики vCJD і є значно менш специфічним при генетичних формах. Оскільки білок 14-3-3 може бути присутнім у CSF пацієнтів з іншими станами, даний тест не рекомендується BOO3 як загальний скринінг на CJD і залишається у резерві для підтвердження клінічного діагнозу [доповідь BOO3, 1998р.].

Більш успішна діагностика досягається за допомогою комбінації клінічних даних з біохімічними маркерами. Однак відповідно до оперативної діагностики, прийнятої на сьогоднішній день в Європейській системі спостереження за CJD, остаточний діагноз встановлюється тільки за результатами нейропатологічних досліджень і виявленням PrP^{Sc} за допомогою імуногістохімічних методик, гістоблотингу або вестерн-блотингу [Weber et al., 1997, Budka et al., 1995].

Утворення PrP^{Sc} являє собою не тільки найбільш вірогідну причину захворювання, але також і найбільш добре відомий маркер. Виявлення PrP^{Sc}

у тканинах і клітинах широко корелює з захворюванням і з наявністю інфективності TSE, а способи лікування, які інактивують або елімінують інфективність TSE, також елімінують PrP^{Sc} [Prusiner, 1991]. Ідентифікація PrP^{Sc} у тканинах людини або тварини вважається ключовою для діагностики TSE [доповідь ВООЗ, 1998р.]. Важливим обмеженням даного підходу є чутливість, оскільки кількості PrP^{Sc} є високими (достатніми для виявлення звичайними способами) тільки у ЦНС на пізніх стадіях захворювання. Однак було показано, що на ранніх стадіях захворювання має місце генералізований розподіл PrP^{Sc} (у низьких кількостях), особливо у лімфоретикулярній системі (Aguzzi, 1997). Дійсно, повідомляється про наявність PrP^{Sc} у тканині піднебінних мигдалин і апендиксі, одержаних у пацієнтів з vCJD [Hill et al., 1997]. Незважаючи на те, що невідомо, наскільки рано у ході захворювання можна використовувати біопсію мигдалин або апендиксу для діагностики vCJD, було показано, що у овець, генетично схильних до захворювання scrapie (свербець), PrP^{Sc} можна виявити у тонзиллярній тканині ще до появи симптомів і на ранніх стадіях інкубаційного періоду. Однак до цього часу PrP^{Sc} не був виявлений у вказаних тканинах у жодному випадку спорадичної CJD або GSS [Kawashima et al., 1997].

Нормальний білок експресується білими кров'яними клітинами і тромбоцитами, і, отже, можливо, що в уражених хворобою індивідуумів деякі клітини крові можуть містити PrP^{Sc} [Aguzzi, 1997]. Це дає можливість розроблення аналізу крові на CJD, але вимагає дослідження з набагато більш високою чутливістю, ніж чутливість методів дослідження, що існують на сьогоднішній день.

Припускають, що реплікація пріонів спостерігається, коли PrP^{Sc} в інокулюмі, що інфектує, специфічним чином взаємодіє з PrP^C хазяїна, каталізуючи його перетворення у патогенну форму білка (Cohen et al., 1994). Для того, щоб досягти концентрації PrP^{Sc}, достатньої для появи клінічних симптомів, вказаний процес продовжується протягом періоду часу від багатьох місяців до багатьох років.

Інфективна одиниця PrP^{Sc}, як вважають, являє собою олігомерну структуру з високим вмістом β-складчастої структури, яка конвертує нормальний білок шляхом включення його у зростаючий агрегат (Fig.1). Дану конверсію імітують *in vitro* за допомогою змішування очищеного PrP^C з 50-кратним молярним надлишком заздалегідь денатурованого PrP^{Sc} (Kocisko et al., 1994).

Описані до цього часу системи конверсії *in vitro* мають низьку ефективність, оскільки вони вимагають надлишку PrP^{Sc} і, отже, не придатні для діагностичних цілей, оскільки вони не можуть виявити кількості маркера, що не виявляються. Причиною низької ефективності є те, що кількість олігомерів PrP^{Sc} (одиниць, що конвертують) залишається фіксованою у ході дослідження. Одиниці, що конвертують, ростуть послідовно по кінцях, і в результаті вони стають більшими, але кількість їх не збільшується (Fig.1).

Заявники розробили спосіб діагностики або виявлення конформаційного захворювання, при якому захворювання характеризується конформа-

ційним перетворенням білка, що лежить в його основі між непатогенним і патогенним конформером, шляхом аналізу зразка на наявність маркера вказаного захворювання; зазначений спосіб включає в себе:

(i) контактування вказаного зразка з деякою кількістю непатогенного конформера;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i), і

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку вказаного патогенного конформера.

Загалом, патогенний конформер буде маркером наявності вказаного захворювання.

Переважаю стадія (i) включає в себе стадію (ia) інкубування вказаного зразка/непатогенного конформера.

Відповідно до переважного варіанту втілення даного винаходу, стадії (ia) і (ii) утворюють цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii). Більш переважно, цикли повторюються від 5 до 40 разів, і найбільш переважно - 5-20 разів.

Конформаційні захворювання, що підлягають виявленню або діагностиці, являють собою такі захворювання, які характеризуються конформаційним перетворенням білка, що лежить в їх основі. Даний "білок, що лежить в основі" являє собою білок, який здатний сприйняти непатогенне перетворення і патогенне перетворення. Прикладом подібного білка є пріонний білок, PrP. Ще одним прикладом подібного білка є білок, який має відношення до хвороби Альцгеймера, тобто, β-амілоїдний білок.

Конформаційні захворювання, що підлягають діагностиці або виявленню, являють собою переважно трансмісивні конформаційні захворювання, такі як TSE (як визначено у розділі "Передумови").

У випадку діагностики TSE і відповідно до переважного варіанту втілення даного винаходу, маркером даного захворювання, а також патогенним конформером є PrP^{Sc}, в той час як непатогенним конформером білка, що представляє інтерес, є PrP^C.

Кількість непатогенного конформера, яка використовується на стадії (i) (i, необов'язково, на стадії (ib)), це звичайно відома кількість, хоча це і необов'язково у випадку, якщо треба просто встановити наявність або відсутність патогенного конформера.

Переважаю, щоб кількість непатогенного конформера, яка використовується на стадії (i) (i, необов'язково, на стадії (ib)), була надмірною кількістю. Загалом, вихідне співвідношення непатогенного конформера і патогенного конформера (якщо він присутній у зразку) буде більше 100:1, переважно, більше 1000:1, і найбільш переважно, більше 100000:1.

Ще в одному переважному варіанті втілення даного винаходу непатогенний конформер на стадії (i) присутній у гомогенаті головного мозку здорового суб'єкта і/або може бути доданий до нього, перед здійсненням стадії (i); у цьому випадку, отже, гомогенат головного мозку, який містить (переважно, відомий) надлишок непатогенного конформера, додають на стадії (i). Переважаю, щоб гомогенат головного мозку здорового суб'єкта мав

таке ж видове походження, як і у зразка, що аналізується (наприклад, гомогенат головного мозку людини для людського зразка, гомогенат головного мозку щура для щурячого зразка, який підлягає аналізу). Більш переважно, щоб непатогенний конформер був присутнім у конкретній фракції гомогенату головного мозку, наприклад, у жирових масах з гомогенату головного мозку. Одержання даних фракцій можна здійснювати, наприклад, як [описано у Sargiacomo M. et al., 1993].

Таким чином, даний винахід відноситься також до способу або аналізу, як описано у даному документі, при якому тканину або фракцію тканини додають до непатогенного конформера на стадії (i). Переважно, щоб тканина являла собою тканину головного мозку або одержаний з нього гомогенат або фракцію від здорового суб'єкта (тобто від такого суб'єкта, у якого немає патогенного конформера).

Повідомляється [Kocisko et al., 1994], що менш глікозиловані форми PrP^C переважно перетворюються у форму PrP^{Sc}. Зокрема, PrP^C, на який впливали специфічною фосфатидилінозитол-фосфоліпазою C, звичайно більш ефективно перетворювався у патогенну форму, ніж повний, більш інтенсивно глікозилований, PrP^C. Таким чином, ще один варіант втілення даного винаходу відноситься до способу або аналізу, як описано у даному документі, при якому непатогенним конформером є PrP^C, який має знижений рівень глікозилювання (зокрема, N-пов'язаного глікозилювання) у порівнянні з PrP^C дикого типу. Переважно, PrP^C обробляють, щоб видалити деяку, всю або значну кількість глікозилювання перед його використанням як непатогенного конформера у способах і аналізах, описаних у даному документі; і, більш переважно, непатогенний конформер являє собою PrP^C, який практично неглікозилований.

У випадку діагностики TSE, якщо у зразку присутні агрегати патогенної форми, під час стадії (i) вони будуть індукувати конверсію PrP^C → PrP^{Sc}, а під час стадії (ii) вказані агрегати будуть розпадатися на більш маленькі, але інфективні одиниці, кожна з яких все ще здатна індукувати конверсію іншого PrP^C. Дана методика у даному документі називається "циклічною ампліфікацією" і представлена на Фіг.2. Дана система забезпечує експоненційне збільшення кількості PrP^{Sc}, в кінцевому результаті присутнього у зразку, яке можна легко виявити. Відповідно до ще одного переважного варіанту втілення даного винаходу, можливим є, отже, розрахунок кількості PrP^{Sc}, що початково є у зразку, виходячи з відомої кількості PrP^C, визначаючи кількість PrP^{Sc}, що є у зразку до кінця аналізу і враховуючи кількість виконаних циклів.

Навпаки, якщо у зразку немає PrP^{Sc} (як такого або у формі агрегатів), молекула PrP^C не перетворюється в PrP^{Sc}, і до кінця аналізу маркер буде відсутнім (у зразку не буде виявлений патогенний конформер).

Було показано, що інфективною одиницею PrP^{Sc} є олігомер з високим вмістом β-структури, який може перетворюватися у нормальний білок шляхом інтеграції його у зростаючий агрегат, де він набуває властивостей, притаманних патологічній формі (резистентність до протеаз і нерозчин-

ність) [Jarrett and Lansbury, Jr., 1993, Caughey et al., 1997]. Після інкубування двох форм PrP, олігомерні види збільшують свій розмір за рахунок залучення і трансформування молекул PrP^C. Даний процес має низьку ефективність, оскільки він залежить від фіксованої кількості олігомерів, які ростуть по кінцях. Кількість одиниць, що конвертують, зростає у ході реакції, протягом якої вони тільки стають більші за розміром. Припускають, що даний процес являє собою те, що відбувається в організмі тварини або людини після інфікування; процес, який, як відомо, займає місяці або навіть декілька років. У даному винаході заявники описують процедуру руйнування олігомерів на більш дрібні молекули, кожна з яких потім здатна конвертувати PrP^C.

Таким чином, дану систему безпосередньо використовують для діагностики конформаційних захворювань, і, зокрема, трансмісивних конформаційних захворювань, таких як TSE, шляхом ампліфікації кількостей PrP^{Sc} у різних тканинах або біологічних рідинах, які не виявляються іншими методами. Дана система може дозволити раннє виявлення людей, що входять до групи ризику розвитку TSE, і могла б бути також досить корисною для біохімічного контролювання ефективності лікарських засобів для лікування TSE у ході клінічних випробувань.

Відповідно до переважного варіанту втілення даного винаходу, зразок, що підлягає аналізу, проходить стадію "попередньої обробки", метою якої є "вибірне концентрування" у зразку патогенного конформера, який необхідно виявити. У випадку TSE, як повідомляється, і PrP^C, і PrP^{Sc} розташовуються в особливій ділянці плазматичної мембрани, яка є резистентною до обробки м'якими детергентами (такими як крижаний тритон X-100), завдяки відносно високому вмісту холестерину та глікоспінголіпідів [M. Vey et al., 1996]. Вказані мембранні домени називають жировими масами або стійкими до детергентів мембранами (DRM) або кавеола-подібними доменами (CLD), і вони мають високий вміст сигнальних білків, рецепторів і GPI-якірних білків. Заявники підтвердили, що 100% PrP^C у головному мозку знаходяться у даній фракції, яка містить <2% всіх білків (див. приклад 6 і Фіг.7). Таким чином, проста стадія виділення жирових мас зі зразка дозволяє здійснити виражене збагачення вмісту PrP^C. Подібні результати були одержані заявником відносно виділення жирових мас з гомогенату головного мозку при scrape, з яких був одержаний PrP^{Sc}.

Таким чином, один варіант втілення даного винаходу включає в себе стадію, під час якої зразок, що підлягає аналізу, проходить стадію попередньої обробки для вибірного концентрування у зразку патогенного конформера. Переважно, щоб патогенним конформером був PrP^{Sc}, попередня обробка являє собою екстрагування зі зразка фракції, яка є нерозчинною у м'яких детергентах.

Стадії (i) і (ia) переважно виконують у фізіологічних умовах (pH, температура і концентрація іонів) і, більш переважно, щоб до розчину також додавалися інгібітори протеаз і детергенти. Умови потрібно вибирати таким чином, щоб дозволити будь-якому патогенному конформеру, якщо він є у

зразку, конвертувати непатогенний конформер у патогенний конформер, утворюючи, таким чином, агрегат або олігомер патогенних конформерів. Відповідні фізіологічні умови легко визначить фахівець.

Тривалість інкубації у часі буде такою, щоб дозволити деякій кількості, сумарній кількості або значній частині непатогенного конформера перетворитися у патогенний конформер, якщо припустити, що у зразку є деяка кількість патогенного конформера. Фахівцеві легко визначити вказаний час. Переважно, щоб кожна інкубація складала від 1 хвилини до 4 годин, найбільш переважно - від 30 хвилин до 1 години, і, особливо переважно - приблизно 60 хвилин.

Стадія інкубації (ia) може також включати в себе додаткову стадію (ib), яка включає в себе додавання додаткової кількості непатогенного конформера.

Для дезагрегування агрегатів під час стадії (ii) способу відповідно до винаходу можна використовувати різні способи. Вони включають в себе наступне: обробку розчинниками (такими як додецилсульфат натрію, диметилсульфоксид, ацетонітрил, гуанідин, сечовина, трифторетанол, розбавлена трифтороцтова кислота, розбавлена мурашина кислота і т.п.), модифікацію фізико-хімічних властивостей розчину, таких як pH, температура, концентрація іонів, діелектрична постійна, і фізичні методи, такі як обробка ультразвуком, опромінення лазером, заморожування/відтавання, французький прес, автоклавування, високий тиск, перемішування, м'яка гомогенізація, інші види опромінення і т.п. Відповідно до даного винаходу, обробка ультразвуком є переважним способом.

Дезагрегацію можна здійснювати протягом такого часу, за який відбувається дезагрегація деякої кількості, всієї кількості або значної частини агрегатів, які утворилися протягом стадії (ii). Немає необхідності у дезагрегації всіх агрегатів на будь-якій стадії дезагрегації. При такому способі кількість одиниць, що конвертують, збільшується на кожній стадії дезагрегації.

Час дезагрегації легко визначить фахівець, і він може залежати від способу дезагрегації, що використовується. Переважно, дезагрегацію здійснюють протягом періоду часу від 1 секунди до 60 хвилин, найбільш переважно - від 5 секунд до 30 хвилин, і, особливо переважно - від 5 секунд до 10 хвилин. Якщо дезагрегацію здійснюють за допомогою ультразвукової обробки, то вона продовжується переважно від 5 секунд до 5 хвилин, і найбільш переважно - від 5 до 30 секунд.

Обробку ультразвуком застосовували раніше як частину деяких способів очищення PrP з метою підвищення розчинності великих агрегатів, але її ніколи не описували як спосіб ампліфікації конверсії PrP in vitro.

Застосування традиційного ультразвукового пристрою з одним зондом стикається з проблемою обробки великої кількості зразків одночасно, як цього вимагає діагностичний тест. У продажу є ультразвукові пристрої з форматом 96-ямкових мікротитраційних планшетів, які забезпечують ультразвукову обробку всіх ямок в один і той же час і можуть програмуватися на автоматичну роботу.

Вказані ультразвукові пристрої можна легко адаптувати для використання у діагностичному способі відповідно до винаходу.

Таким чином, один варіант втілення даного винаходу відноситься до застосування на стадії (ii) багатоямкового ультразвукового пристрою.

Виявлення новоконвертованого патогенного конформера, наприклад PrP^{Sc}, (iii) після процедури циклічної ампліфікації, описаної на стадіях (i)-(ii), можна здійснювати відповідно до будь-якого з відомих способів. Специфічне виявлення PrP^{Sc} звичайно (але не завжди, див. нижче) відбувається на першій стадії розділення двох ізоформ PrP (нормального білка і патогенного білка). Розділення здійснюють на основі своєрідних біохімічних властивостей PrP^{Sc}, які відрізняють його від більшості нормальних білків організму, а саме: PrP^{Sc} є частково стійким до обробки протеазами, і він не розчиняється навіть у присутності детергентів, що не денатрують. Отже, першою стадією після процедури ампліфікації звичайно є видалення або відділення PrP^C зі зразка - за допомогою обробки протеазами або за допомогою центрифугування - для відділення розчинного білка (PrP^C) від нерозчинного (PrP^{Sc}). Після цього виявлення PrP^{Sc} можна здійснювати, крім інших, будь-яким з наступних способів:

A) Імуноблотингом після SDS-PAGE. Це здійснюють за допомогою звичайної процедури, добре відомої фахівцям, і з використанням деяких з багатьох комерційно доступних анти-PrP-антитіл.

B) Аналізом ELISA. Твердофазове виявлення можна здійснювати як за допомогою простого аналізу, при якому зразки вміщують на планшет, після чого виявляють кількість PrP^{Sc} з використанням анти-PrP-антитіл або, більш переважно, за допомогою сандвіча ELISA, при якому планшет спочатку покривають анти-PrP-антитілом, яке специфічним чином захоплює PrP зі зразка, який потім виявляють, використовуючи друге анти-PrP-антитіло. Обидві форми ELISA можна також використовувати з міченими (радіоактивність, флуоресценція, біотин і т.п.) анти-PrP-антитілами для подальшого підвищення чутливості виявлення.

C) Радіоактивними дослідженнями. Нормальний PrP^C, що використовується як субстрат для процедури ампліфікації, можна позначити радіоактивними ізотопами (3H, 14C, 35S, 125I і т.п.) перед початком процедури, і після видалення неконвертованого PrP^C можна кількісно визначити радіоактивність новоконвертованого PrP^{Sc}. Дана процедура є більш кількісною і не розрахована на використання антитіл.

D) Флуоресцентними аналізами. Нормальний PrP^C, що використовується як субстрат для процедури ампліфікації, можна позначити флуоресцентними зондами перед початком процедури, і після видалення неконвертованого PrP^C можна кількісно визначити флуоресценцію новоконвертованого PrP^{Sc}. Можливо, що флуоресцентний аналіз може не вимагати видалення неконвертованого PrP, оскільки флуоресцентні властивості PrP^C і PrP^{Sc} можуть бути різними внаслідок виразної конформації двох вказаних ізоформ.

E) Агрегаційними аналізами. Добре відомо, що PrP^{Sc} (але не PrP^C) здатний агрегувати, утворюючи

амілоїдні волокна або структури типу паличок. Отже, виявлення PrP^{Sc} можна було б здійснити за допомогою способів, що використовуються для кількісного визначення утворення даних типів агрегатів, включаючи електронну мікроскопію, забарвлення специфічними барвниками (Конго червоним, тіофлавіном S і T і т.п.) та нефелометричними аналізами.

Агрегаційні аналізи не вимагають стадії розділення двох ізоформ, оскільки нормальний PrP^C не агрегує.

F) Структурними аналізами. Найбільш важливою відмінністю між нормальним і патогенним PrP є їх вторинна і третинна структури. Отже, можна використовувати способи, які дозволяють оцінити структуру білків, включаючи ЯМР, циркулярний дихроїзм, трансформовану за Фур'є інфрачервону спектроскопію, спектроскопію комбінаційного розсіювання, внутрішню флуоресценцію, УФ-поглинання і т.п.

Моноклональним антитілом, що найчастіше використовується, проти PrP є "3F4" [Kascsak et al., 1987], яке одержане у мишей, імунізованих 262K PrPres хом'яка (резистентним до протеаз конформером). Вказане антитіло також здатне розпізнавати непатогенний конформер з головного мозку хом'яка і людини, але не великої рогатої худоби, миші, щура, вівці або кролика; воно також здатне зв'язуватися з патогенним конформером людини, але тільки після денатурації вказаного білка.

Подібні антитіла можна позначити, щоб забезпечити легке виявлення маркера. Наприклад, деякі вчені використовують часові вимірювання флуоресценції з використанням міченого європейського антитіла 3F4 [Safar et al., 1998].

Описані вище способи виявлення можна використовувати для виявлення інших патогенних конформерів, наприклад патогенних форм β-амілоїдного білка, і навпаки.

В альтернативному варіанті втілення даного винаходу доданий у надмірній кількості непатогенний конформер може бути позначений і може піддаватися виявленню, таким чином, що кількість неагрегованого конформера до кінця дослідження дозволить визначити кількість патогенного конформера, який початково був присутнім у зразку.

Відповідно до ще одного альтернативного варіанту втілення даного винаходу, патогенний конформер (маркер) можна було б виявляти за допомогою антитіла, направлено проти нього.

У більш широкому аспекті, можна додавати мітку або фрагмент, що мітить, до патогенного конформера, непатогенного конформера або до антитіла проти одного з конформерів, в залежності від роду аналізу, що виконується.

Іншою метою даного винаходу є аналіз на наявність маркера конформаційного захворювання, яке характеризується конформаційним перетворенням білка, що лежить в його основі, з патогенного у патогенний конформер, у зразку; вказаний аналіз включає в себе наступні стадії:

(i) контактування вказаного зразка з деякою кількістю непатогенного конформера;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i), і

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку вказаного патогенного конформера. Загалом, патогенний конформер буде являти собою маркер наявності вказаного захворювання.

Переважно, щоб стадія (i) включала в себе стадію (ia), під час якої відбувається інкубування вказаного зразка/непатогенного конформера.

Відповідно до переважного варіанту втілення даного винаходу, стадії (ia) і (ii) утворюють цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii). Більш переважно, якщо цикли повторюються від 5 до 40 разів, і найбільш переважно - 5-20 разів.

Ще однією метою даного винаходу є діагностичний набір для застосування в описаному аналізі, який включає в себе певну кількість непатогенного конформера і, необов'язково, додатково мікротитраційний планшет і багатоямковий ультразвуковий пристрій.

З використанням способу відповідно до винаходу можливим є виявлення від 1 до 10 фг патогенного конформера, який початково присутній у зразку, що еквівалентно від 3 до 30×10⁻²⁰ моль.

Зразок звичайно буде являти собою біологічний зразок або тканину, і будь-який вказаний біологічний зразок або тканину можна дослідити за допомогою способу відповідно до винаходу. У випадку тканини, аналіз і спосіб відповідно до винаходу можна виконувати на гомогенатах або безпосередньо на зразках *ex vivo*. Вказані способи і аналізи звичайно будуть виконуватися на зразках *ex vivo* або *in vitro*. Переважно, коли зразок являє собою біологічну рідину, таку як кров, лімфа, сеча або молоко; тканину головного мозку, спинний мозок, тонзиллярну тканину або тканину апендикса; зразок, одержаний з крові, такий як гемолізовані еритроцити або препарати лейкоцитарної плівки; або препарат плазматичних мембран, такий як жирова маса, стійкі до детергентів мембрани або кавеола-подібні домени. Альтернативно, зразок може являти собою композицію, що включає в себе сполуку (особливо білок), одержану у людини або тварини, таку як гормон росту або тканинний екстракт, такий як екстракт гіпофізу. Така композиція зразка може бути контамінована патогенним конформером.

Зразок також може включати в себе харчовий продукт або напій, або частину харчового продукту або напою (призначених для споживання людиною або тваринами), з метою встановлення наявності або відсутності патогенного конформера у даному продукті або напої.

Переважно, щоб непатогенний конформер, доданий на стадії (i), був того ж виду, що і сам зразок. Він може бути одержаний, наприклад, зі здорової (тобто, непатогенної) форми (наприклад, тканини) біологічного зразка, що підлягає аналізу. Альтернативно, непатогенний конформер може бути одержаний синтетичним або рекомбінантним шляхом, з використанням засобів, відомих фахівцям.

Потрібно розуміти, однак, що непатогенний конформер необов'язково повинен бути у чистій або навіть практично чистій формі. У більшості випадків непатогенний конформер буде у формі гомогенату тканини або його фракції, які містять

вказаний непатогенний конформер. Переважні приклади включають в себе гомогенати головного мозку і одержані з нього фракції, наприклад жирові маси.

Переважно, зразок і/або непатогенний конформер будуть походити від людини або домашньої тварини, наприклад, корови, вівці, кози або kota.

Іншою метою даного винаходу є створення способу ідентифікації сполуки, яка модулює конформаційне перетворення білка, який лежить в основі захворювання, з непатогенного у патогенний конформер, що включає в себе:

(i) контактування деякої кількості непатогенного конформера з деякою кількістю патогенного конформера у присутності або у відсутності вказаної сполуки;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i);

(iii) визначення кількості патогенного конформера у присутності або за відсутності вказаної сполуки.

Якщо бажано, стадія (i) може включати в себе стадію (ia), під час якої відбувається інкубування вказаного зразка/непатогенного конформера, і цикл, який здійснюють між стадіями (ia) і (ii), як описано вище для способів і аналізів відповідно до винаходу, і навпаки.

Якщо кількість патогенного конформера, виміряна у присутності вказаної сполуки, більше, ніж кількість, виміряна за її відсутності, це означає, що дана сполука являє собою фактор, який "каталізує" конформаційне перетворення; якщо вказана кількість менше, це означає, що дана сполука являє собою фактор, який інгібує вказане перетворення.

Відповідно до описаного вище способу, "ідентифікацію" потрібно також інтерпретувати як "скринінг" ряду сполук.

"Мітка" або "частина, що мітить" може являти собою будь-яку сполуку, яка застосовується як засіб виявлення білка. Мітка або частина, що мітить, може бути приєднана до білка за допомогою іонних або ковалентних взаємодій, водневого зв'язку, електростатичних взаємодій або інтеркаляції. Приклади міток або частин, що мітять, включають в себе - без обмеження - кон'югати з флуоресцентними фарбами, біотин, дигоксигенін, радіонуклеотиди, хемілюмінесцентні речовини, ферменти і рецептори, таким чином, що виявлення міченого білка відбувається шляхом флуоресценції, кон'югації зі стрептавідином і/або авідином, кількісного визначення радіоактивності або хемілюмінесценції, каталітичних і/або ліганд-рецепторних взаємодій. Переважною міткою є флуоресцентна або фосфоресцентна мітка.

Термін "конформаційні захворювання" відноситься до групи захворювань, що виникають внаслідок поширення аберантного конформаційного перетворення білка, який лежить в їх основі, що приводить до агрегації білка і його депонування у тканинах. Вказані захворювання можуть також передаватися за допомогою індукованої конформаційної зміни, розповсюджуватися від патогенного конформера до його нормального або непатогенного конформера, і в цьому випадку їх у даному документі називають "трансмисивними конформа-

ційними захворюваннями". Прикладами вказаних видів захворювань є пріонні енцефалопатії, включаючи спонгіформну енцефалопатію великої рогатої худоби (BSE) та її людський еквівалент, хворобу Крейтцфельда-Якоба (CJD), при яких білком, що лежить в їх основі, є PrP.

Термін "спорадична CJD", скорочено "sCJD", відноситься до найбільш поширеного вияву хвороби Крейтцфельда-Якоба (CJD). Дане захворювання спостерігається спонтанно у індивідуумів середнього віку приблизно 60 років, з частотою 1 випадок на мільйон людей на рік у всьому світі.

Термін "ятрогенна CJD", скорочено "iCJD", відноситься до захворювання, що викликається випадковим інфікуванням людей людськими пріонами. Найбільш помітним прикладом такого захворювання є випадкове інфікування дітей людськими пріонами з контамінованих препаратів людського гормону росту.

Термін "сімейна CJD" відноситься до CJD, яка рідко спостерігається у сім'ях і неминуче викликається мутаціями гена людського пріонного білка. Захворювання виникає внаслідок аутосомно-домінантного порушення. Члени сім'ї, які успадкували вказані мутації, вмирають від CJD.

Термін "хвороба Гертсманна-Штрасслера-Шейнкера", скорочено "GSS", відноситься до форми спадкового пріонного захворювання людини. Вказане захворювання спостерігається внаслідок аутосомно-домінантного порушення. Члени сім'ї, які успадкували мутантний ген, вмирають від GSS.

Термін "пріон" буде означати трансмісивну частинку, яка, як відомо, викликає групу вказаних трансмісивних конформаційних захворювань (спонгіформні енцефалопатії) у людей і тварин. Термін "пріон" являє собою скорочення слів "білок" та "інфекція", а частинки складені переважно, якщо не виключно, з молекул PrP^{Sc}.

Пріони відрізняються від бактерій, вірусів і віроїдів. Відомі пріони включають в себе такі пріони, які інфікують тварин, викликаючи sсгаріе (свербець), трансмісивне дегенеративне захворювання нервової системи овець і кіз, а також спонгіформну енцефалопатію великої рогатої худоби (BSE) або коров'ячий сказ і спонгіформні енцефалопатії котів. Відомі наступні чотири пріонні захворювання, що вражають людину: (1) куру, (2) хвороба Крейтцфельда-Якоба (CJD), (3) хвороба Гертсманна-Штрасслера-Шейнкера (GSS) і (4) фатальне сімейне безсоння (FFI). Термін пріон, що використовується у даному документі, включає в себе всі форми пріонів, які викликають всі або будь-яке з вказаних захворювань або інші захворювання у будь-яких тварин і, зокрема, у людей та сільськогосподарських тварин.

Термини "ген PrP" і "ген пріонного білка" використовуються у даному документі взаємозамінним чином для опису генетичного матеріалу, який експресує пріонні білки та поліморфізми, а також мутації, такі, які перераховані у даному документі під підзаголовком "Патогенні мутації та поліморфізми". Ген PrP може бути від будь-якої тварини, включаючи "хазяїна" та "експериментальних" тварин, описаних у даному документі, і являти собою будь-які і всі його поліморфізми та мутації; визна-

но, що вказані терміни включають в себе гени, які не є геном PrP, і які ще мають бути відкриті.

Термін "ген PrP" відноситься, головним чином, до будь-якого гена будь-якого виду, який кодує будь-яку форму амінокислотних послідовностей PrP, включаючи будь-який пріонний білок. Деякі загальновідомі послідовності PrP [описані у роботі Gabriel et al., 1992], включені у даний документ як посилання для розкриття і опису вказаних послідовностей.

Абревіатури, що використовуються у даному документі, включають в себе наступні:

ЦНС (CNS) - центральна нервова система;

BSE - спонгіформна енцефалопатія великої рогатої худоби;

CJD - хвороба Крейтцфельда-Якоба;

FFI - фатальне сімейне безсоння;
GSS - хвороба Гертсманна-Штраасслера-Шейнкера;

PrP - пріонний білок;

PrP^C - нормальний, непатогенний конформер PrP;

PrP^{Sc} - патогенна або "scrapie" - ізоформа PrP (яка також є маркером пріонних захворювань).

Патогенні мутації та поліморфізми

Існує ряд відомих патогенних мутацій у гені людського PrP. Крім того, існує відомий поліморфізм у генах PrP людини, вівці та великої рогатої худоби.

Наступне являє собою необмежувачий перелік вказаних мутацій і поліморфізмів:

Таблиця мутацій

| Патогенні людські мутації | Людський поліморфізм | Поліморфізм вівці | Поліморфізм великої рогатої худоби |
|---|--|--|------------------------------------|
| Вставка 2 октаповторень Вставка 4 октаповторень Вставка 5 октаповторень Вставка 6 октаповторень Вставка 7 октаповторень Вставка 8 октаповторень Вставка 9 октаповторень Кодон 102 Pro-Leu Кодон 105 Pro-Leu Кодон 117 Ala-Val Кодон 145 стоп Кодон 178 Asp-Asn Кодон 180 Val-Ile Кодон 198 Phe-Ser Кодон 200 Glu-Lys Кодон 210 Val-Ile Кодон 217 Asn-Arg Кодон 232 Met-Ala | Кодон 129 Met/Val Кодон 219 Glu/Lys | Кодон 171 Arg/Glu (одон 136 Ala/Val | 5 або 6 октаповторень |

Нормальну амінокислотну послідовність, яка спостерігається у переважної більшості індивідуумів, називають послідовністю PrP дикого типу. Вказана послідовність дикого типу зазнає певних характерних поліморфних змін. У випадку людського PrP, дві поліморфні амінокислоти спостерігаються за залишками 129 (Met/Val) і 219 (Glu/Lys). PrP вівці має два амінокислотних поліморфізми за залишками 171 і 136, у той час як PrP великої рогатої худоби має п'ять або шість повторів послідовності з восьми амінокислот в амінокінцевій ділянці зрілого пріонного білка. Незважаючи на те, що самі по собі дані поліморфізми не є патогенними, вони, як представляється, впливають на пріонні захворювання. Були ідентифіковані певні мутації гена людського PrP, відмінні від вказаних нормальних варіацій пріонних білків дикого типу, які змінюють специфічні амінокислотні залишки PrP або кількість октаповторень, і які відрізняються від спадкових людських пріонних захворювань.

З метою подальшого осмислення приведеної вище карти, яка демонструє мутації і поліморфізми, можна звернутися до опублікованих послідовностей генів PrP. Наприклад, [розкриті і опубліковані у Gabriel et al., 1992], гени PrP курки, великої рогатої худоби, вівці, щура і мишей. Послідовність

гена PrP сірійського хом'яка [опублікована Goldmann et al., 1990]. Послідовність гена PrP у великої рогатої худоби [опублікована Goldmann et al., 1991]. Послідовність гена PrP курки [опублікована Harris et al., 1991]. Послідовність гена PrP норки [опублікована Kretschmar et al., 1992]. Послідовність гена PrP людини [опублікована Kretschmar et al., 1986]. Послідовність гена PrP миші [опублікована Locht et al., 1986]. Послідовність гена PrP вівці [опублікована Westaway et al., 1994]. Дані публікації включені у даний документ як посилання для розкриття і опису гена PrP і амінокислотної послідовності PrP.

Даний винахід відноситься також до способу виявлення наявності патогенної форми пріонного білка у зразку (переважно у зразку крові або головного мозку), що включає в себе:

(i) контактування зразка з деякою кількістю непатогенного пріонного білка;

(ia) інкубування зразка/непатогенного пріонного білка;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; а потім

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку патогенного пріонного білка.

Ще один варіант втілення даного винаходу відноситься до способу діагностики CJD у пацієнта, що включає в себе:

взяття зразка (переважно зразка крові або головного мозку) у пацієнта;

(i) контактування зразка з деякою кількістю білка PrP^C;

(ia) інкубування зразка/білка PrP^C;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; а потім

(iii) визначення наявності і/або кількості PrP^{Sc} у зразку.

Даний винахід відноситься також до способу виявлення наявності патогенної форми β-амілоїдного білка у зразку (переважно у зразку крові або головного мозку), що включає в себе:

(i) контактування зразка з деякою кількістю не-патогенного β-амілоїдного білка;

(ia) інкубування зразка/непатогенного β-амілоїдного білка;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; а потім

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку патогенного β-амілоїдного білка.

Ще один варіант втілення даного винаходу відноситься до способу діагностики хвороби Альцгеймера у пацієнта, що включає в себе:

взяття зразка (переважно зразка крові або головного мозку) у пацієнта;

(i) контактування зразка з деякою кількістю не-патогенного β-амілоїдного білка;

(ia) інкубування зразка/непатогенного β-амілоїдного білка;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються під час стадії (ia);

повторення стадій (ia)-(ii) два або більше разів; а потім

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку патогенного β-амілоїдного білка.

Даний винахід відноситься також до апарату для застосування у способах, описаних вище, особливо, до апарату, що включає в себе мікروتриційний планшет, багатоямковий ультразвуковий пристрій та деяку кількість непатогенного конформера.

Ще один варіант втілення даного винаходу відноситься до способу діагностичного виявлення конформаційного захворювання, яке характеризується конформаційним перетворенням білка, що лежить в його основі, з непатогенного у патогенний конформер, шляхом аналізу зразка на наявність маркера вказаного захворювання; зазначений спосіб включає в себе:

(i) контактування вказаного зразка з відомою кількістю непатогенного конформера;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i), і

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку вказаного патогенного конформера.

Переважно, якщо стадії (i) і (ii) утворюють цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii), найбільш переважно, якщо стадії (i) і (ii) утворюють цикл, який повторюється від 5 до 40 разів до виконання стадії (iii).

Даний винахід відноситься також до аналізу на наявність маркера конформаційного захворювання, яке характеризується конформаційним перетворенням білка, що лежить в його основі, з непатогенного у патогенний конформер у зразку, при цьому вказаний аналіз включає в себе наступні стадії:

(i) контактування вказаного зразка з відомою кількістю непатогенного конформера;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i), і

(iii) визначення наявності і/або кількості у зразку вказаного патогенного конформера. Переважно, щоб стадії (i) і (ii) утворили цикл, який повторюється щонайменше двічі до виконання стадії (iii).

Даний винахід відноситься також до способу ідентифікації сполуки, яка модулює конформаційне перетворення білка, який лежить в основі захворювання, з непатогенного у патогенний конформер, що включає в себе:

(i) контактування відомої кількості непатогенного конформера з відомою кількістю патогенного конформера у присутності або за відсутності вказаної сполуки;

(ii) дезагрегацію будь-яких агрегатів, що утворюються в кінцевому результаті під час стадії (i);

(iii) визначення кількості патогенного конформера у присутності або за відсутності вказаної сполуки.

Даний винахід описаний з посиланнями на конкретні варіанти втілення даного винаходу, але зміст опису включає в себе всі модифікації та заміни, які можуть бути зроблені фахівцем, без відступу від значення і мети формули винаходу.

Даний винахід далі буде описаний з використанням наступних прикладів, які не повинні тлумачитися як такі, що обмежують яким-небудь чином даний винахід. У прикладах будуть зустрічатися посилання на фігури, описані нижче у даному документі.

Фіг.1. Схематичне зображення перетворення PrP^C PrP^{Sc}.

Інфективною одиницею PrP^{Sc} є олігомер з високим вмістом β-складчастої структури, який конвертує PrP^C шляхом включення його у зростаючий агрегат, де він набуває властивостей, пов'язаних з PrP^{Sc}.

Фіг.2. Діаграма, що зображує процедуру циклічної ампліфікації. Система базується на циклах інкубування PrP^{Sc} у присутності надлишку PrP^C, з подальшими циклами ультразвукового впливу. Під час періодів інкубування олігомерний PrP збільшується у розмірах за рахунок включення PrP у зростаючий агрегат, а під час ультразвукового впливу агрегати руйнують, щоб збільшити кількість одиниць, що конвертують. На представленій Фіг. показано два цикли ультразвукового впливу/інкубування.

Фіг.3. Ампліфікація PrP^{Sc} за допомогою циклів ультразвукового впливу. Невелику кількість гомогенату ураженого scrapie головного мозку, що міс-

тив PrP^{Sc}, інкубували з гомогенатом головного мозку здорового щура (смуга 1, контрольний дослід) або з гомогенатом головного мозку здорового хом'яка (смуга 2 і 3). Останній зразок розділяли на дві групи, одну з яких піддавали п'яти циклам інкубування/ультразвукового впливу (смуга 3). Половину вказаних зразків завантажували безпосередньо у гель та забарвлювали на спільний білок барвником кумасі (панель А). Іншу половину обробляли РК і піддавали імуноблотингу з використанням анти-PrP-антитіла 3F4 (панель В). Панель С показує деякі контролі, в яких гомогенат здорового головного мозку інкубували окремо (смуги 1 і 2) або у присутності розбавленого гомогенату ураженого ссгаріє головного мозку (смуги 3 і 4). Половину зразків (смуги 2 і 4) піддавали 5 циклам ультразвукового впливу/інкубування. Смуги 2, 3 і 4 обробляли протеїназою К.

Фіг.4. Чутливість системи циклічної ампліфікації. Вивчали мінімальну концентрацію PrP^{Sc}, яка може бути виявлена після ампліфікації, за допомогою серійних розведень гомогенату ураженого ссгаріє головного мозку, та інкубування його з гомогенатом головного мозку здорового хом'яка з циклами ультразвукової обробки або без них. Панель А показує контрольний дослід, в якому уражений ссгаріє головний мозок хом'яка піддавали серійному розведенню у гомогенаті головного мозку щура. Панель В відповідає експерименту, в якому серійне розведення ураженого ссгаріє головного мозку хом'яка інкубували з головним мозком здорового хом'яка і піддавали 5 циклам інкубування/ультразвукового впливу. Денситометрична оцінка імуноблотів в А і В показана на панелі С. Розведення, які проводили, вважаючи вихідним матеріалом головний мозок, були наступними: 100 (смуга 1), 200 (смуга 2), 400 (смуга 3), 800 (смуга 4), 1600 (смуга 5) і 3200 (смуга 6).

Фіг.5. Залежність сигналу PrPres від кількості циклів ампліфікації. Розбавлений гомогенат ураженого ссгаріє головного мозку інкубували з надлишком гомогенату головного мозку здорового хом'яка. Зразки піддавали 0, 5, 10, 20 або 40 циклам, та оцінювали сигнал PrPres за допомогою імуноблотингу.

Фіг.6. Ампліфікація PrP^{Sc} у зразках крові. У гепаринізовану кров щура вміщували гомогенат ураженого ссгаріє головного мозку хом'яка до досягнення кінцевого розведення 10:1. Вказану суміш інкубували протягом 15хв. при кімнатній температурі. Даний матеріал піддавали 10-кратному серійному розведенню, використовуючи гепаринізовану кров щура. Зразки піддавали 11 циклам інкубування/ультразвукового впливу, і оцінювали сигнал PrPres за допомогою імуноблотингу.

Фіг.7. Пріонний білок присутній у жирових масах. Жирові маси (що також називаються стійкою до детергентів мембранною фракцією або DRM) виділяли, використовуючи раніше описані протоколи. Сто мг тканини головного мозку гомогенізували у 1мл PBS, що містив 1% тритону X-100 і їх повного коктейлю інгібіторів протеаз (Boehringer). Тканину гомогенізували за допомогою 10 пасажів через голку для шприца 22G та інкубували протягом 30 хвилин при 4°C на ротаційній мішалці. Зразок розбавляли 1:2 у 60% сахарозі та вміщували

на дно центрифужової пробірки. На зразок обережно нашаровували 7 мл 35% сахарози. На градієнт нашаровували 1,5мл 15% сахарози. Пробірку центрифугували при 150000g протягом 18год. при 4°C. Жирові маси спливали на поверхні поділу 15%-35% сахарози (панель А). Різні фракції збирали і аналізували на спільний білок з забарвлюванням нітратом срібла (панель В) та піддавали імуноблотингу для виявлення PrP (панель С). Для видалення сахарози зі зразка фракцію жирових мас виділяли, промивали у PBS і центрифугували при 28000об./хв. протягом 1год. при 4°C. Центрифужовий осад промивали і ресуспендували у PBS, що містив 0,5% тритону X-100, 0,5% SDS та інгібітори протеаз. Весь PrP^C локалізувався у даній фракції (панель D).

Фіг.8. Фактори, необхідні для ампліфікації, присутні у жирових масах.

Жирові маси виділяли з головного мозку здорового хом'яка, як описано на Фіг.2, і змішували з розбавленим у 700 разів PrP^{Sc} високого очищення з ураженого ссгаріє головного мозку хом'яка. Зразки заморожували (смуга 3) або ампліфікували протягом 20 год. (смуга 4). Смуги 1 і 2 представляють ті ж процедури, але з використанням для ампліфікації тотального гомогенату головного мозку.

Фіг.9. Пресимптоматичне виявлення PrP^{Sc} у головному мозку хом'яка. Хом'якам інтрацеребрально (і/ц) інокулювали фізіологічний розчин (контрольна група) або розбавлений у 100 разів гомогенат ураженого ссгаріє головного мозку. Щотижня по 4 хом'яка з кожної групи умертвляли, а головний мозок діставали і гомогенізували. Половину зразків негайно заморожували (білі стовпчики), а іншу половину піддавали 20 циклам інкубування/ультразвукового впливу (чорні стовпчики). Всі зразки обробляли РК і піддавали імуноблотингу. Інтенсивність смуг оцінювали за допомогою денситометрії. Кожний стовпчик представляє середню величину для зразків від 4 тварин. У контрольних зразках головного мозку виявлення не було, як без ампліфікації, так і з ампліфікацією, і дані результати не показані на Фіг.

Фіг.10. Ампліфікація людського PrP^{Sc}. Проводилися дослідження з використанням зразків головного мозку від 11 різних підтверджених випадків спорадичної CJD, а також від 5 випадків сімейної CJD і 4 підібраних за віком контролів, які включали в себе пацієнтів, що страждали іншими неврологічними розладами. Головний мозок гомогенізували і піддавали 20 циклам ампліфікації. Репрезентативні результати контролю (А) і трьох різних випадків спорадичної CJD (В) (1, 2, 3) представлені на Фіг.

Фіг.11. Виявлення PrP^{Sc} у крові після одержання гемолізованих еритроцитів. Гемолізовані еритроцити з 0,5мл гепаринізованої крові здорових (С) і уражених ссгаріє хом'яків (Sc) одержували як описано у даному тексті. Половину зразків не піддавали ампліфікації, а іншу половину змішували з гомогенатом нормального головного мозку хом'яка і піддавали 20 циклам ампліфікації. Всі зразки потім обробляли РК і аналізували за допомогою імуноблотингу. Один репрезентативний експеримент показаний на Фіг.

Фіг.12. Виявлення PrP^{Sc} у крові після екстракції саркозілом. 0,5мл гепаринізованої крові здорових

(C) і уражених ссаріє хом'яків (Sc) піддавали екстракції саркозилом як описано у даному тексті. Половину зразків не піддавали ампліфікації, а іншу половину змішували з гомогенатом нормального головного мозку хом'яка і піддавали 20 циклам ампліфікації. Всі зразки потім обробляли РК і аналізували за допомогою імуноблотингу. Один репрезентативний зразок від контрольних тварин і два від уражених ссаріє тварин показані на Фіг.

Фіг.13. Виявлення PrP^{Sc} у крові після виділення жирних мас. Жирні маси екстрагували, як описано у тексті, з 0,5мл гепаринізованої крові здорових (C) і уражених ссаріє хом'яків (Sc). Половину зразків не піддавали ампліфікації, а іншу половину змішували з гомогенатом нормального головного мозку хом'яка і піддавали 20 циклам ампліфікації. Всі зразки потім обробляли РК і аналізували за допомогою імуноблотингу. Один репрезентативний зразок від контрольних тварин і два від уражених ссаріє тварин показані на Фіг.

Фіг.14. Виявлення PrP^{Sc} у крові після одержання лейкоцитних плівки. Фракцію лейкоцитної плівки крові відділяли центрифугуванням з 0,5мл гепаринізованої крові здорових (C) і уражених ссаріє хом'яків (Sc). Половину зразків не піддавали ампліфікації, а іншу половину змішували з гомогенатом нормального головного мозку хом'яка і піддавали 20 циклам ампліфікації. Всі зразки потім обробляли РК і аналізували за допомогою імуноблотингу. Один репрезентативний експеримент показаний на Фіг.

ПРИКЛАД 1

Ампліфікація резистентного до РК PrP за допомогою циклічної конверсії *in vitro*

Гомогенат головного мозку хом'яка, який дістали з уражених ссаріє тварин, розбавляли доти, доки сигнал PrP^{Sc} ледве виявлявся імуноблотингом після обробки протеїназою K (РК) (Фіг.3В, смуга 1). Обробка РК проводилася звичайним способом для розрізнення нормальних і патологічних форм PrP, які відрізняються за своєю чутливістю до розщеплення під дією протеаз (PrP^{Sc} є частково резистентним, а PrP^C розщеплюється) (Prusiner, 1991). Форма PrP, яка є резистентною до впливу РК, буде далі називатися PrPres. Інкубування зразка розбавленого гомогенату ураженого ссаріє головного мозку з гомогенатом головного мозку здорового хом'яка, що містив надлишок PrP^C, приводило до зростання сигналу PrPres (Фіг.3В, смуга 2).

Це дозволяє припустити, що інкубування двох гомогенатів головного мозку приводить до конверсії PrP^C у PrP^{Sc}. Коли зразки інкубували у тих же умовах, але піддавали п'яти циклам інкубування/ультразвукового впливу, кількість PrPres різко збільшувалася (Фіг.3В, смуга 3). Денситометричний аналіз імуноблоту показує, що сигнал PrPres зростає у 84 рази в результаті циклічної ампліфікації, у порівнянні з сигналом PrPres, що присутній у розбавленому гомогенаті ураженого ссаріє головного мозку (смуга 1).

Конверсія залежить від наявності PrP^{Sc}, оскільки PrPres не спостерігався, коли нормальні гомогенати головного мозку інкубували окремо у тих же умовах, як з ультразвуковим впливом, так і без нього (Фіг.3С, смуга 2). Для усунення артефактів

перетворення, кількість спільного білка, завантаженого у гель, підтримували на постійному рівні (Фіг.3А) додаванням гомогенату головного мозку щура до розбавленого зразка ураженого ссаріє головного мозку, користуючись тим, що PrP щура не виявляється антитілом, яке використовується для імуноблотингу.

ПРИКЛАД 2

Чутливість виявлення за допомогою циклічної ампліфікації

Для оцінки мінімальної концентрації PrP^{Sc}, яка може бути виявлена після ампліфікації, гомогенат ураженого ссаріє головного мозку піддавали серійному розведенню безпосередньо у гомогенаті головного мозку здорового хом'яка. Без інкубування сигнал PrPres прогресивно зменшувався доти, доки не ставав таким, що абсолютно не виявляється при 800-кратному розведенні (Фіг.4А, С). Навпаки, коли те ж розведення інкубували з гомогенатом головного мозку здорового хом'яка і піддавали 5 циклам інкубування/ультразвукового впливу, межа виявлення PrPres різко знижувалася. Дійсно, чіткий сигнал легко виявлявся навіть при 3200-кратному розведенні (Фіг.4В, С).

ПРИКЛАД 3

Експонентне зростання PrPres зі збільшенням кількості циклів

Для того щоб з'ясувати, чи залежить інтенсивність сигналу PrPres після циклічної ампліфікації від кількості виконаних циклів інкубування/ультразвукового впливу, розбавлений гомогенат ураженого ссаріє головного мозку інкубували з надлишком гомогенату головного мозку здорового хом'яка. Зразки піддавали 0, 5, 10, 20 або 40 циклам, а сигнал PrPres оцінювали за допомогою імуноблотингу. Рівні PrPres зростали по експоненті в залежності від кількості циклів інкубування/ультразвукового впливу (Фіг.5). Даний результат наводить на думку про те, що збільшення кількості циклів могло б додатково зменшити межі виявлення.

ПРИКЛАД 4

Експерименти з ультразвуковим впливом на зразки крові з навантаженням PrP^{Sc}

Гепаринізовану кров щура навантажували гомогенатом ураженого ссаріє головного мозку хом'яка до досягнення кінцевого розведення 10:1. Дану суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 15хв.

З даного матеріалу робили 10-кратне серійне розведення з використанням гепаринізованої крові щура. 50мкл кожного розведення центрифугували при 3000об/хв протягом 10хв. Плазму відділяли від центрифугового осаду. 10мкл плазми змішували з 50мкл гомогенату головного мозку здорового хом'яка, що містив субстрат PrP^C для реакції конверсії. Зразки піддавали 11 циклам інкубування/ультразвукового впливу. Як контроль, ті ж зразки змішували з 50мкл гомогенату головного мозку здорову хом'яка і зберігали при -20°C аж до використання. 15мкл оброблених ультразвуком і контрольних зразків розщеплювали протеїназою K, відділяли за допомогою SDS-PAGE і аналізували за допомогою вестерн-блотингу, а PrP^{Sc} виявляли як описано у розділі "Методи".

Результати представлені на Фіг.6. Дані результати показують чітке підвищення виявлення білка після процедури ампліфікації, що особливо очевидно при низькій концентрації PrP^{Sc} (наприклад, у розведенні 1280). Якщо порівняти дані результати з результатами, одержаними на тканинах інфікованого головного мозку, то можна одержати підтвердження того, що процес ампліфікації подібним чином працює у випадку крові.

ПРИКЛАД 5

Циклічна ампліфікація з високою пропускнуною спроможністю

Застосування традиційного ультразвукового пристрою з одним зондом стикається з проблемою обробки великої кількості зразків одночасно, як того вимагає діагностичний тест. Заявники адаптували систему циклічної ампліфікації до ультразвукового пристрою з форматом 96-ямкового мікروتитраційного планшету (Misonix 431MP - 20кГц), який забезпечує ультразвукову обробку всіх ямок в один і той же час і може програмуватися на автоматичну роботу. Дане вдосконалення не тільки скорочує час обробки, але також запобігає втраті матеріалу у порівнянні з використанням одного зонду. Перехресна контамінація усувається, оскільки немає прямого занурення зонду у зразок. Остання обставина є істотною при аналізі інфікованих зразків і зводить до мінімуму псевдопозитивні результати. Двадцять циклів 1 год. інкубування з подальшим ультразвуковим імпульсним впливом від 15 сек. до 30сек. приводили до достовірної ампліфікації сигналу PrPres, подібного до одержаного раніше при використанні традиційного ультразвукового пристрою.

ПРИКЛАД 6

Фактори, необхідні для ампліфікації, знаходяться у резистентній до детергентів мембранній фракції

Субклітинна локалізація конверсії PrP у патогенезі захворювання ще не з'ясована. Однак повідомлялося, що як PrP^C, так і PrP^{Sc} розташовуються в особливій ділянці плазматичної мембрани, яка є резистентною до впливу м'якими детергентами внаслідок відносно високого вмісту холестерину та глікофінголідів [Vey et al., 1996; Hamey et al., 1995]. Вказані мембранні домени називають жировими масами або стійкими до детергентів мембранами (DRM), і вони містять велику кількість сигнальних білків, рецепторів і GPI-якірних білків. Заявники підтвердили, що 100% PrP^C у головному мозку прив'язані до даної фракції, яка містить <2% спільного білка (Фіг.7). Таким чином, проста стадія виділення жирової маси дозволяє різко збільшити вміст PrP^C. Подібні результати були одержані при виділенні жирових мас з гомогенату ураженого scrapie головного мозку, в якому PrP^{Sc} виділяли з жирових мас.

Для того щоб оцінити, чи містяться фактори, необхідні для ампліфікації PrP, в жирових масах, заявники виділяли їх з головного мозку здорових тварин і додавали надзвичайно малі кількості PrP^{Sc} високої чистоти, екстрагованого з головного мозку хворих тваринних. Ампліфікація у жирових масах була еквівалентною ампліфікації, одержаній з тотальним екстрактом головного мозку (Фіг.8), оскільки кількість PrPres, що утворився після амплі-

фікації, була подібною за обох умов. Даний результат вказує, що всі елементи, які потрібні для конверсії і ампліфікації PrP (включаючи так званий "фактор X"; (Telling et al., 1995)), містяться у цьому спеціалізованому мембранному домені. Отже, ідентифікація і виділення факторів, необхідних для конверсії PrP, повинна бути можливою за допомогою подальшого відділення білків від жирових мас і моніторингу їх активності за допомогою циклічної ампліфікації. Крім цього, жирові маси являють собою можливу заміну для застосування тотального гомогенату головного мозку у процедурі циклічної ампліфікації, як джерела субстрату PrP та інших ендогенних факторів, що беруть участь у конверсії.

ПРИКЛАД 7

Пресимптоматична діагностика у експериментальних тварин Для вивчення пресимптоматичної діагностики у хом'яків, експериментально інфікованих scrapie, заявники зробили скринінг 88 зразків головного мозку на різних стадіях доклінічної фази, половину з яких складали неінфіковані контролі. Головний мозок відбирали кожний тиждень (по 4 з кожної групи) і піддавали 20 циклам ампліфікації. Результати показали, що даний спосіб здатний виявляти патологічний білок у головному мозку навіть на другому тижні після інкуляції, задовго до того як у тварин з'являються будь-які симптоми (Фіг.9). Без циклічної ампліфікації PrP^{Sc} виявляли у головному мозку на шостому тижні після зараження, тільки за 4 тижні до появи клінічної картини захворювання. У жодній з контрольних тварин, які не були заражені scrapie, ампліфікації не виявили.

ПРИКЛАД 8

Застосування циклічної ампліфікації до зразків головного мозку людини Для аналізу можливості застосування процедури циклічної ампліфікації до зразків головного мозку людини (трупів), ураженої хворобою Крейтцфельда-Якоба (CJD), заявники інкубували гомогенати головного мозку від декількох пацієнтів з CJD (або від нормальних контролів) з гомогенатом головного мозку здорової людини та здійснювали процедуру циклічної ампліфікації. Результати показують, що відбувається достовірна ампліфікація у зразках головного мозку, що аналізуються, при спорадичній CJD, але у жодному з 4 контрольних зразків ампліфікація не відбувається (Фіг.10). Цікаво, що ампліфікація була одержана тільки у зразках, які, як було показано, були заражені і, таким чином, здатні конвертувати немутований PrP^C, у той час як це не відбувалося, коли мутантний білок був не здатний конвертувати білок дикого типу. Ці дані підтверджують висновок про те, що даний метод працює у зразках, одержаних у людини, так само, як це було показано раніше для зразків тваринного походження.

ПРИКЛАД 9

Діагностика по крові за допомогою циклічної ампліфікації

Дослідження інфективності припускають, що принаймні у експериментальних тварин, PrP^{Sc} присутній у крові у тварин на пізній стадії захворювання [Brown et al., 2001]. З метою здійснення виявлення PrP^{Sc} у крові за допомогою циклічної ампліфікації, заявники віддали перевагу спочатку

вибірково сконцентрувати зразок по білку, що підлягає виявленню, та усунути велику кількість наявних білків крові, таких як альбумін або гемоглобін. Наступні чотири різні протоколи, як було показано, були ефективними для досягнення вказаної мети.

1. Одержання тіней еритроцитів

Гепаринізовану кров хом'яка центрифугували при 2500об./хв. при 4°C. Плазму і клітинну фракцію розділяли та заморожували і зберігали при -80°C до використання. 0,5мл фракції клітин крові промивали 3 рази в 12-15 об'ємах свіжого холодного PBS, pH7,6. Клітини ресуспендували в 12-15 об'ємах 20мОСМ буфера фосфату натрію, pH7,6, і злегка перемішували протягом 20хв. на льоду, потім центрифугували при 30000об./хв. протягом 10хв. при 4°C. Надосад видаляли, осад промивали 3 рази 20мОСМ буфером фосфату натрію. Кінцевий осад ресуспендували у PBS, що містив 0,5% тритону X-100, 0,5% SDS та інгібітори протеаз. 15мкл одержаної суспензії перемішували об./об. з 10% гомогенатом головного мозку здорового хом'яка і піддавали 20 циклам інкубування/ультразвукового впливу. По 20мкл оброблених ультразвуком і контрольних зразків розщеплювали протеїназою K, розділяли за допомогою SDS-PAGE і аналізували за допомогою вестерн-блотингу, а PrP^{Sc} виявляли як описано у розділі "Методи". Результати показують виявлення PrP^{Sc} після процедури ампліфікації у зразках крові інфікованих тварин (Фіг.11). У зразках крові неінфікованих тварин після ампліфікації сигналу не спостерігалось. Без ампліфікації неможливо виявити присутність PrP^{Sc} (Фіг.11).

2. Екстракція саркозиллом

Гепаринізовану кров хом'яка центрифугували при 2500об./хв. при 4°C. 0,5мл фракції клітин крові розбавляли (об./об.) 20% саркозиллом та інкубували протягом 30 хвилин. Зразок центрифугували на ультрацентрифузі Beckman TL100 при 85000об./хв. протягом 2год. при 4°C. Осад промивали і ресуспендували у PBS, що містив 0,5% тритону X-100, 0,5% SDS та інгібітори протеаз. 15мкл одержаної суспензії перемішували об./об. з 10% гомогенатом головного мозку здорового хом'яка і піддавали 20 циклам інкубування/ультразвукового впливу. По 20мкл оброблених ультразвуком і контрольних зразків розщеплювали протеїназою K, розділяли за допомогою SDS-PAGE і аналізували за допомогою вестерн-блотингу, а PrP^{Sc} виявляли як описано у розділі "Методи". Результати показують виявлення PrP^{Sc} після процедури ампліфікації у зразках крові від інфікованих тварин (Фіг.12). У зразках крові від неінфікованих тварин після ампліфікації сигналу не спостерігалось. Без ампліфікації неможливо виявити присутність PrP^{Sc} (Фіг.12).

3. Екстракція жирових мас

Гепаринізовану кров хом'яка центрифугували при 2500об./хв. при 4°C. 0,5мл фракції клітин крові розбавляли (об./об.) PBS з 1% тритоном X-100 та інкубували протягом 30 хвилин при 4°C. Зразок розбавляли 1:2 60% сахарозою і вміщували на дно центрифужової пробірки. На зразок обережно нашаровували 7 мл 35% сахарози. На градієнт нашаровували 1,5мл 15% сахарози. Пробірку центрифугували при 150000об./хв. протягом 18год.

при 4°C. Жирові маси виділяли, промивали у PBS і центрифугували при 28000об./хв. протягом 1год. при 4°C. Осад промивали і ресуспендували у PBS, що містив 0,5% тритону X-100, 0,5% SDS та інгібітори протеаз. 15мкл одержаної суспензії перемішували об./об. з 10% гомогенатом головного мозку здорового хом'яка і піддавали 20 циклам інкубування/ультразвукового впливу. По 20мкл оброблених ультразвуком і контрольних зразків розщеплювали протеїназою K, розділяли за допомогою SDS-PAGE і аналізували за допомогою вестерн-блотингу, а PrP^{Sc} виявляли як описано у розділі "Методи". Результати показують виявлення PrP^{Sc} після процедури ампліфікації у зразках крові від інфікованих тварин (Фіг.13). У зразках крові від неінфікованих тварин після ампліфікації сигналу не спостерігалось. Без ампліфікації неможливо виявити присутність PrP^{Sc} (Фіг.13).

4. Одержання лейкоцитарної плівки

Гепаринізовану кров хом'яка центрифугували при 1500об./хв. при 4°C протягом 10хв. Лейкоцитарну плівку обережно виділяли за допомогою стандартних процедур і зберігали при -80°C до використання. Заморожену лейкоцитарну плівку ресуспендували у PBS, що містив 0,5% тритону X-100, 0,5% SDS та інгібітори протеаз. 15мкл одержаної суспензії перемішували об./об. з 10% гомогенатом головного мозку здорового хом'яка і піддавали 20 циклам інкубування/ультразвукового впливу. По 20мкл оброблених ультразвуком і контрольних зразків розщеплювали протеїназою K, розділяли за допомогою SDS-PAGE і аналізували за допомогою вестерн-блотингу, а PrP^{Sc} виявляли як описано у розділі "Методи". Результати показують виявлення PrP^{Sc} після процедури ампліфікації у зразках крові інфікованих тварин (Фіг.14). У зразках крові неінфікованих тварин після ампліфікації сигналу не спостерігалось. Без ампліфікації неможливо виявити присутність PrP^{Sc} (Фіг.14).

МЕТОДИ

Одержання гомогенатів головного мозку.

Головний мозок сірійських золотистих хом'яків, здорових або інфікованих адаптованим штамом scarpie 263K, одержували після декапітації і негайно заморожували у сухому льоді та зберігали при -80°C до використання. Головний мозок гомогенізували у PBS з 10% інгібіторів протеаз (мас./об.). Додавали детергенти (0,5% тритону X-100, 0,05% SDS) і освітлювали центрифугуванням на малих швидкостях (10000об./хв.) протягом 1хв.

Одержання зразків і циклічної ампліфікації.

Безпосередньо у гомогенаті здорового головного мозку робили серійне розведення гомогенату ураженого scarpie головного мозку. По 30мкл одержаних розведень інкубували при 37°C при перемішуванні. Кожну годину здійснювали цикл ультразвукового впливу (5 імпульсів по 1сек. кожний) з використанням ультразвукового мікропристрою з голкою, зануреною у зразок. Вказані цикли повторювали декілька разів (5-20).

Виявлення PrP^{Sc}.

Зразки розщеплювали за допомогою PK у концентрації 100мкг/мл протягом 90хв. при 37°C. Реакцію зупиняли 50мМ PMSF. Зразки розділяли за допомогою SDS-PAGE (в умовах, що денатурують) і піддавали електроблотингу через нітроцелюлоз-

ну мембрану в CAPS або трис-гліциновому трансферному буфері з 10% метанолом протягом 45хв. при 400мА. Оборотно забарвлювання спільного білка здійснювали перед блокуванням мембрани 5% знежиреним молоком. Після цього мембрану інкубували протягом 2год. з моноклональним антитілом 3F4 (1:50000). Промивали чотири рази по 5хв. PBS, 0,3% твіну 20, перед інкубуванням з повторним антимишачим антитілом, міченим пероксидазою хрому (1:5000) протягом 1год. Після промивання реактивність у мембрані розробляли за допомогою набору для хемолюмінесценції ECL (Amersham), відповідно до інструкцій виробника.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

Aguzzi A. (1997). Neuro-immune connection in the spread of prions in the body? *Lancet* 349, 742-744.

Baldwin M.A., Cohen F.E., and Prusiner S.B. (1995). Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations. *J. Biol. Chem.* 270, 19197-19200.

Baslet et al., *Cell* 46: 417-428 (1986)

Brown P., Cervenakova L., and Diringer H. (2001). Blood infectivity and the prospects for a diagnostic screening test in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Lab. Clin. Invest.* 137, 5-13.

Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., and Suttie A. (1997). Transmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498-501.

Budka H., Aguzzi A., Brown P., Brucher J.M., Bugiani O., Gullotta F., Haltia M., Hauw J.J., Ironside J.W., Jellinger K., Kretzschmar H.A., Lantos P.L., Masullo C., Schlote W., Tateishi J., and Weller R.O. (1995). Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (Prion diseases). *Brain Pathol.* 5, 459-466.

Carrell R.W., Lomas D.A. (1997). Conformational diseases. *Lancet*, 350, 134-138.

Caughey B., Raymond G.J., Kocisko D.A., and Lansbury P. T., Jr. (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.* 71, 4107-4110.

Cohen F.E., Pan K.M., Huang Z., Baldwin M., Fletterick R.J., and Prusiner S.B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science* 264, 530-531.

Cohen F.E. and Prusiner S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 61, 793-819.

Cousens S.N., Vynnycky E., Zeidler M., Will R.G., and Smith R.G. (1997). Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 385, 197-198.

Gabriel et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9097-9101 (1992).

Galvez S. and Cartier L. (1983). Computed tomography findings in 15 cases of Creutzfeldt-Jakob disease with histological verification. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 47, 1244.

Goldmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2476-2480 (1990).

Goldmann et al., *J. Gen. Virol.* 72:201-204 (1991).

Harmey J.H., Doyle D., Brown V., and Rogers M.S. (1995). The cellular isoform of the prion protein, PrP^C, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 753-759.

Harris et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7664-7668 (1991).

Hill A.F., Zeidler M., Ironside J.W., and Collinge J. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 349, 99-100.

Hsich G., Kenney K., Gibbs C.J., Jr., Lee K.H., and Harrington M.G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Eng. J. Med.* 335, 924.

Jarrett J.T. and Lansbury P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.

Jimi T., Wakayama Y., Shibuya S., and et al. (1992). High levels of nervous system specific protein in the cerebrospinal fluid in patients with early stage Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin. Chim. Acta* 211, 37.

Kawashima T., Furukawa H., Doh-ura K., and Iwaki T. (1997). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 350, 68-69.

Kascsak R.J., Rubenstein R., Merz P.A., Tonna-DeMasi M., Fersko R., Carp R.I., Wisniewski H.M., Diringer H., (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61, 3688-3693.

Kocisko D.A., Come J.H., Priola S.A., Chesebro B., Raymond G.J., Lansbury P.T., and Caughey B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474.

Kocisko D.A., Priola S.A., Raymond G.J., Chesebro B., Lansbury P.T., Jr., and Caughey B. (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3923-3927.

Kretzschmar et al., *DNA* 5:315-324 (1986).

Kretzschmar et al., *J. Gen. Virol.* 73:2757-2761 (1992).

Locht et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6372-6376 (1986).

Onofri M., Fulgente T., Gambi D., and Macchi G. (1993). Early MRI findings in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol.* 240, 423.

Pan K.M., Baldwin M., Njuyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., and Prusiner S.B. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of scrapie prion proteins. *Proc Natl. Acad. Sci. (USA)* 90, 10962-10966.

Prusiner S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.

Roos R., Gajdusek D.C., and Gibbs C.J., Jr. (1973). The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 96, 1-20.

Saborio G.P., Soto C., Kascsak R.J., Levy E., Kascsak R., Harris D.A., and Frangione B. (1999). Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 470-475.

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

Sargiacomo M., Sudol M., Tang Z., Lisanti M.P. (1993). Signal transducing molecules and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells., *J Cell Biol.* Aug; 122(4):789-807.

Stahl N., Baldwin M.A., Teplow D.B., Hood L., Gibson B.W., Burlingame A.L., and Prusiner S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochem.* 32, 1991-2002.

Steinhoff B.J., Racker S., Herrendorf G., and et al. (1996). Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 53, 162.

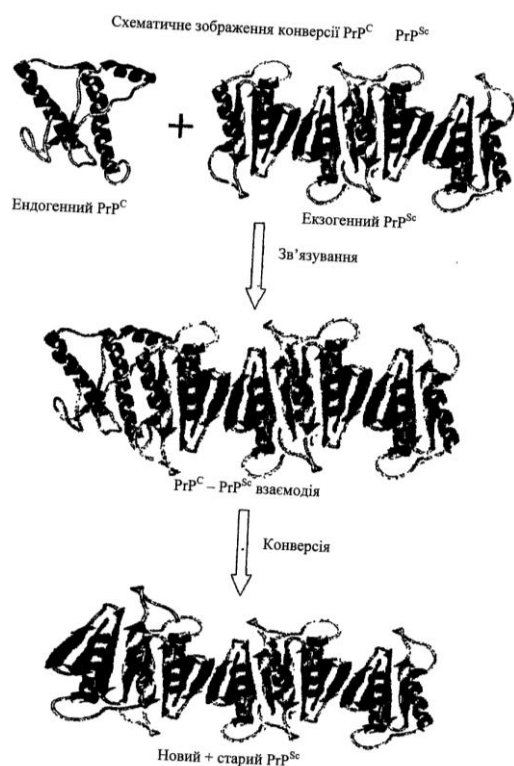
Telling G.C., Scott M., Mastrianni J., Gabizon R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J., and Prusiner S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.

Martin Vey et al. (1996) *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14945-9.

Weber T., Otto M., Bodemer M., and Zerr I. (1997). Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease and related human spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.* 51, 381-387.

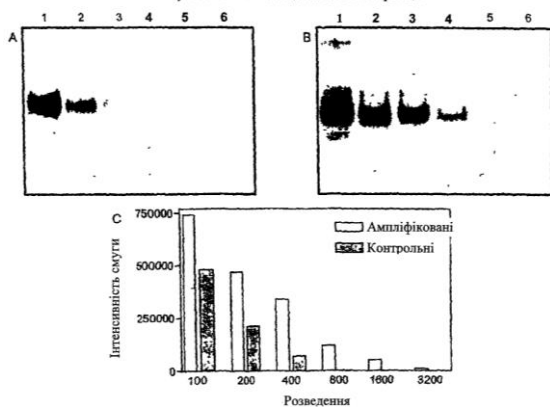
Westaway et al., *Genes Dev.* 8:959-969 (1994).

WHO/EMC/ZDI/98.9, Global Surveillance, Diagnosis and Therapy of Human Transmissible Spongiform Encephalopathies: Report of a WHO Consultation, Geneva, Switzerland 9-11 February 1998, WHO.



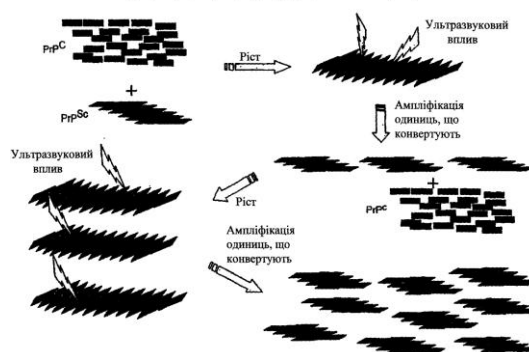
Фіг. 1

Чутливість системи циклічної ампліфікації

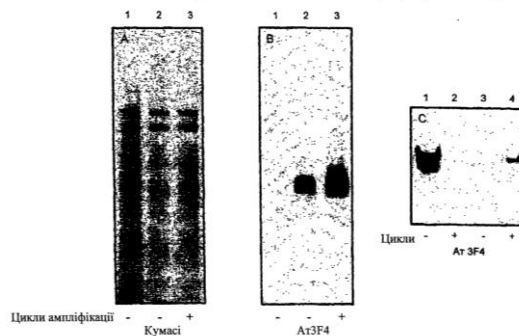


Фіг. 4

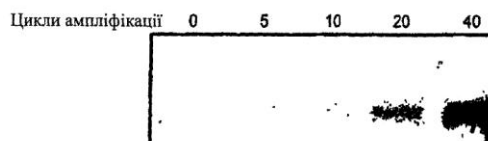
Діаграма, що зображує процедуру циклічної ампліфікації



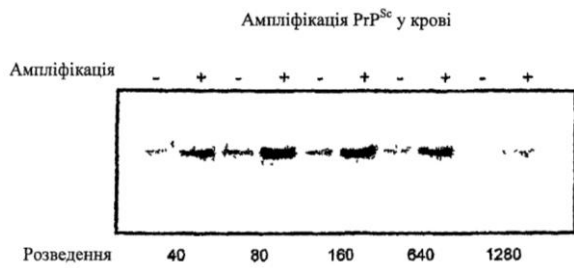
Фіг. 2

Ампліфікація PrP^{Sc} за допомогою циклів ультразвукового впливу

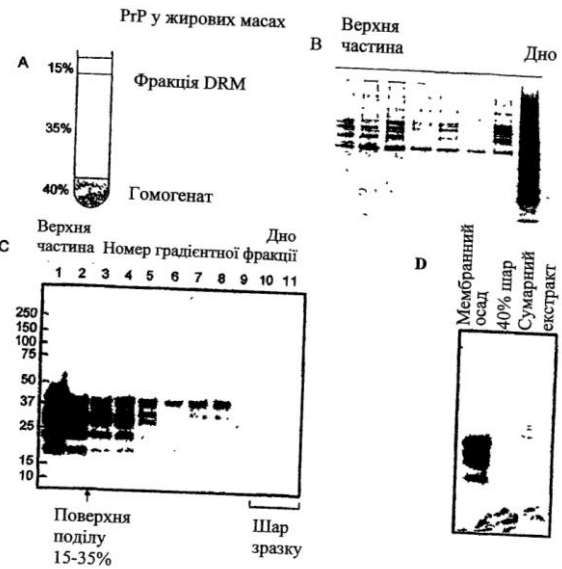
Фіг. 3

Залежність сигналу PrP^{Sc} від кількості циклів ампліфікаціїГомогенат ураженого скрапіє головного мозку, розбавлений 10⁻² у гомогенаті головного мозку здорового хом'яка

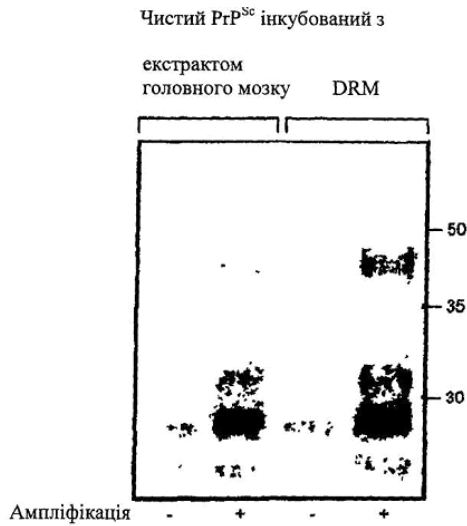
Фіг. 5



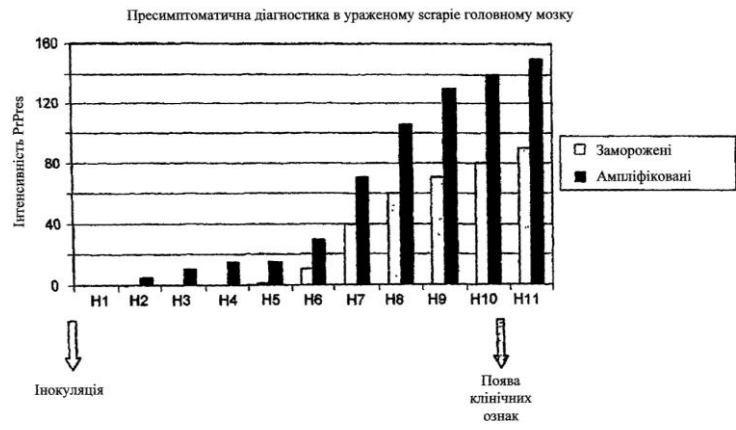
Фіг. 6



Фіг. 7

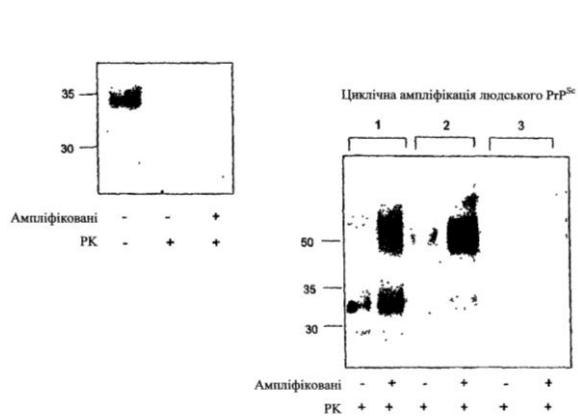


Фіг. 8

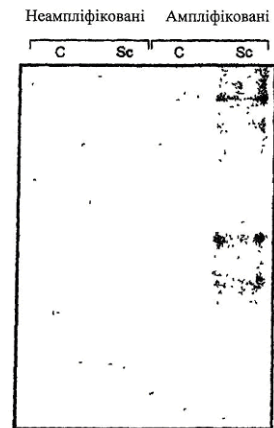


Фіг. 9

Виявлення PrP^{Sc} у крові після одержання гемолізованих еритроцитів

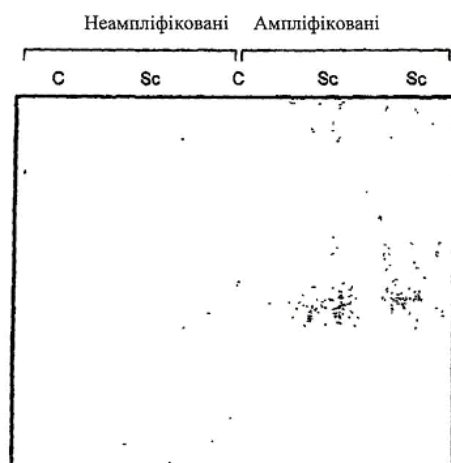


Фіг. 10



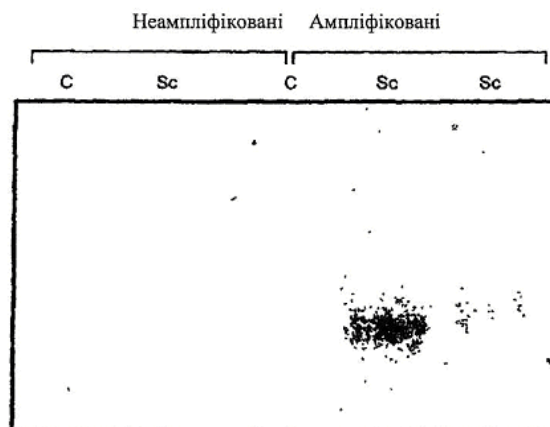
Фіг. 11

Виявлення PrP^{Sc} у крові після екстракції саркозиллом



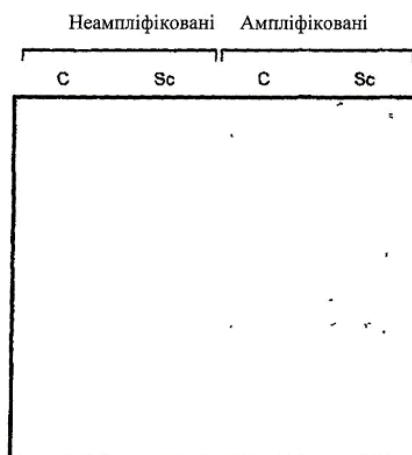
Фіг. 12

Виявлення PrP^{Sc} у крові після виділення жирових мас



Фіг. 13

Виявлення PrP^{Sc} у крові після одержання лейкоцитарних плівок



Фіг. 14