(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 33 663 T2** 2007.12.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 062 517 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 33 663.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP98/03609**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 941 283.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/004237**
(86) PCT-Anmeldetag: **16.06.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **28.01.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **01.03.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.12.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***G01N 33/68*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
2206774 16.06.1997 CA

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

(73) Patentinhaber:
Bergmann, Johanna E., 22587 Hamburg, DE;
Preddie, Enrique R., Montreal, Quebec, CA

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(72) Erfinder:
BERGMANN, E., Johanna, D-22587 Hamburg, DE;
Preddie, E., Rick, 22587 Hamburg, DE

(54) Bezeichnung: **DIAGNOSE SPONGIFORMER ENCEPHALOPATHIEN MIT PRIONINEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf diagnostische und therapeutische Moleküle zum Nachweis und zur Prävention der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE), von Skrapie (Skrapie) und der Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJS). Die Erfindung bezieht sich spezifisch auf drei miteinander nahe verwandte Proteine, BSAS, SCRAPAS und CJAS, welche ursächlich mit BSE, Skrapie und CJS in Zusammenhang stehen, auf Antagonisten dieser Proteine und auf diagnostische Reagenzien zum Nachweis dieser Proteine in klinischen Proben und in Nahrungsmitteln. Sie bezieht sich auch auf den Gebrauch von Homologen dieser Proteine von Hamstern und Mäusen, die für die Entwicklung und Testung von Methoden für den Einsatz in Impfstoffen und anderen Agenzien mit therapeutischem Wert für die Therapie von Menschen und Tieren mit TSE von Nutzen sind.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Prion Proteine (PrPs) sind eine Familie nahe verwandter Proteine, die in mehreren allelischen Formen in der Membran von Neuronen bestimmter Populationen in allen Tieren gefunden werden. PrPs werden im lyphoretikulären System exprimiert und in der Milz und in anderem lyphoretikulärem Gewebe repliziert (Kimberin R.H. und Walker C.A. Virus Res. 12: 201-211 (1989)). Die Veränderung der molekularen Konfiguration (Faltung) eines PrP durch einen unbekannten Mechanismus, der diese Proteine in infektiöse Partikel „Prionen" (PrPsc) umwandelt, ist mit einer Gruppe von Krankheiten namens „Übertragbare Spongiforme Enzephalopathien" (TSE) verbunden (Prusiner S.B. Science 252: 1515-1522 (1991); Prusiner S.B. Ed., Current Topics in Microbiology and Immunology 207 (1996); Westaway D. et al., Trends. Microbiol. 3: 141-147 (1995); Goldfarb L.G. and Brown P. Annu. Rev. Med. 46: 57-65 (1965)).

[0003] Drei Mitglieder der TSE Familie sind von großer wirtschaftlicher und medizinischer Bedeutung; es handelt sich um die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern, Skrapie bei Schafen und die Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJS) beim Menschen. Die Pathologie der TSE zeichnet sich durch Nervenzell-Dysfunktion und folgende fatale Neurodegeneration aus; charakteristisch für TSEs sind die symmetrische Aushöhlung von Neuronen und Neurophilen sowie die Anhäufung von PrPsc um Neuronen herum. Das letztere Phänomen gilt als Ursache des Phänotyps im von der Krankheit betroffenen Tier und Menschen (Darcel C. Vet. Res. Commun. 19: 231-252 (1995)).

[0004] Man nimmt an, dass Prionen sich selbst replizierende Proteine sind, welche in ihrer veränderten Konfiguration gegenüber dem Abbau durch proteolytische Enzyme und Hitzebedingungen, die gewöhnlich zerstörerisch für die meisten Proteine sind, resistent sind. Man glaubt, dass das infektiöse Prion auf unterschiedliche Spezies übertragbar ist. Es konnte aber nicht zufrieden stellend erklärt werden, wie ein im Gehirn vorkommendes und bisher nicht in biologischen Flüssigkeiten nachgewiesenes Protein in einer weidenden Viehherde von Tier zu Tier übertragen werden kann. Außerdem ist die Autokonversion eines endogenen Proteins von einer harmlosen nützlichen Form zu einer hoch pathogenen, infektiösen Form rätselhaft; viele exotische Hypothesen wurden hervorgebracht, um diese Phänomene zu erklären.

[0005] Allerdings haben einige plausible Hypothesen Einsicht in manche Aspekte des o.g. Rätsels geliefert, z.B. (i) wurde gezeigt, dass PrPsc in den Mandeln (Tonsillen) von Tieren mit BSE und Skrapie, und vermutlich auch in Tieren, die präsymptomatisch für diese Krankheiten sind (Schreuder B.E. et al., Nature 381; 563 (1996)), nachgewiesen werden kann; (ii) wurde vorgeschlagen, dass Prionen Rezeptoren sein könnten, die ein unbekanntes Virus oder andere infektiöse Agenzien in die Zelle einführen könnten (Brown P. (zitiert in „special news report") „Putting Prions to the Test" Science 273: 184-189 (1996)); (iii) scheinen Experimente in Mäusen darauf hinzuweisen, dass PrP an Chaperon-Proteine (Protein X) bindet, was die Bildung von PrPsc katalysiert (Telling G.C. Cell 83: 79-90 (1995)); (iv) deuten Experimente auch darauf hin, dass ein nicht identifizierter Faktor für BSE verantwortlich ist und dass Prionen als ein Wirt-Adaptationsagenz wirkt (Lasmezas C.I. et al. Science 275: 402-405 (1997)); und (v) wurde gezeigt, dass möglicherweise eine Translation mit Leserahmenverschiebung in der Skrapie mRNA bei der Konversion vom PrP zum PrPsc ein Rolle spielt (Wills P.R. et al. Microbiol. Pathogenesis 6: 235-249 (1989); Kiyotoshi K. et al. Proc. Natl. Aca. Sci. USA 94: 10069-10074 (1998)).

[0006] Es gibt eine bemerkenswerte Beziehung zwischen Skrapie bei Schafen, BSE bei Rindern und CJS beim Menschen; es wird angenommen, dass BSE durch das Skrapie Prion initiiert wird, und dass einige Formen der CJS durch den Konsum von BSE-infizierten Rindern, insbesondere deren Hirnen, entstehen. Letzteres schien kürzlich durch die Entdeckung eines so benannten BSE-Signatur-Moleküls bei Personen mit der

„neuen Variante CJS" Unterstützung zu erhalten (Collinge, J. et al. Nature 283: 685-690 (1996)). Trotzdem, und trotz eines großen internationalen Bemühens, die Pathogenese der TSE zu verstehen und nicht-invasive, allgemein anwendbare Methoden zum präsymptomatischen Nachweis dieser Krankheiten zu entwickeln, von denen BSE und Skrapie riesige Auswirkungen auf Kammerz und auf die Gesundheit der Bevölkerung im Allgemeinen haben, wurden substanzielle Fortschritte in diesen Zielrichtungen nicht gemacht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Es war das Ziel der vorliegenden Erfindung, andere Proteine zu finden, welche in Krankheits-spezifischer Weise exprimiert sind, mit PrP interagieren und dieses zu PrPsc umwandeln können. Wir glaubten, dass solche Proteine, weil sie in Körperflüssigkeiten vorkommen würden, hoch spezifische ante-mortem diagnostische Marker für präsymptomatische Rinder, Schafe und Menschen sein würden, und dass sie als Zielmoleküle für therapeutische Maßnahmen zur Kontrolle der Symptome von TSE Krankheiten bei Tieren und beim Menschen eingesetzt werden könnten. Außerdem versuchten wir, Methode/Methoden zu erfinden, welche Kreuz-Infektionen beim Menschen und anderen Tieren durch BSE und Skrapie verursachende Agenzien feststellen können.

[0008] Der Erfindung nach lag die Problemlösung in der Nutzung der Analogie zwischen Prion-Krankheiten und der Alzheimer Krankheit (AD), insbesondere der Beziehung zu einem Protein ALZAS, welches wir als potentiell verursachenden Faktor aller AD-Formen entdeckt haben. ALZAS (Bergmann J.E. et al. Neurobiol. Aging 17: S14 (1996)) ist kodiert und exprimiert innerhalb des humanen APP Gens; letzteres hat eine starke Verbindung zu AD. Durch post-translationelle Modifikation des APP Genproduktes, dem „β-Amyloid Vorläufer Protein", entsteht das β-Amyloid Protein (Aβ).

[0009] Aβ spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von AD (Scheuner D. et al. Nature Medicine 2: 864-870 (1996)). Vor kurzem wurde gezeigt, dass Proteinprodukte des APP Gens mit eine Leserahmenverschiebung verursachenden Mutationen und das Ubiquitin β Gen bei der Pathologie der Alzheimer Krankheit und des Down Syndroms beteiligt sind (van Leeuwen F. et al. Science 279: 242-247 (1998)). ALZAS, welches aus Aβ, der APP-Transmembran-Signalsequenz und einer einzigartigen, Intron-kodierten c-terminalen Sequenz zusammengesetzt ist, ist in Hirn, Blut und Speichel aller Menschen mit AD nachweisbar und hat zur Verursachung der klinischen Symptome von AD geeignete vorhersehbare biochemische Charakteristika (Bergmann J.E. et al. Neurobiol. Aging 17: S14 (1996)). Die pathophysiologischen Ähnlichkeiten zwischen AD und den TSEs, insbesondere CJS, und die implizierte Beziehung von ALZAS zu APP/Aβ, führten zu unserer Suche nach einem dem ALZAS ähnlichen Molekül, welches innerhalb der Prion Protein Gene von Rindern, Schafen und Menschen, und auch von Hamstern und Mäusen kodiert ist. Die beiden Nager-Spezies wurden ausgiebig von Wissenschaftlern in dem Bestreben, ein TSE-Modell herzustellen, genutzt. Unter Benutzung der von uns „disease gene discovery by positional searching" (DGDPS) genannten Methode (s. Bergmann J. und Preddie E. „WIPO" Veröffentlichungen Nr. WO98/07850 und Nr. WO98/07851) führte unsere Suche zu der Entdeckung der Proteine BSAS, SCRAPAS und CJAS, die innerhalb der PrP Gene von Rindern, Schafen und Menschen kodiert und exprimiert sind. Außerdem entdeckten wir die im PrP Gen von Maus und Hamster kodierten Proteine MPAS und HAMPAS. Da die für diese Proteine kodierenden Sequenzen in der chromosomalen Region gefunden wurden, in der sich das Prion Protein Gen befindet, nannten wir sie „prionine". Es folgt eine kurze Beschreibung von DGDPS, wie es zur Entdeckung der Prionine angewendet wurde.

Beziehung von BSAS und SCRAPAS zu BSE und Skrapie

[0010] Diese Proteine scheinen spezifisch mit der Entwicklung von BSE bei Rindern und Skrapie bei Schafen in Verbindung zu stehen. BSAS und SCRAPAS erscheinen im Blut aller Tiere mit klinischen Symptomen der Krankheit und bei einem signifikanten Anteil von Tieren, die der Krankheit ausgesetzt waren, gewöhnlich aber nicht bei Tieren, die mit der Krankheit nicht in Berührung gekommen waren. Außerdem produzieren exponierte Tiere einen spezifischen Antikörper (endogenen Antikörper), der gegen BSAS oder SCRAPAS gerichtet ist und der präsymptomatisch in betroffenen Tieren nachgewiesen werden kann. Die Konzentration des endogenen Antikörpers scheint in Tieren mit klinischen Krankheitssymptomen generell niedriger zu sein, was uns vermuten ließ, dass die Initiierung der symptomatischen Krankheit von einer Schwächung der Immunabwehr begleitet ist.

BSAS und SCRAPAS

[0011] BSAS und SCRAPAS sind relativ kleine Proteine mit β-Faltblatt-Struktur, die von innerhalb des Rinder- bzw. Schaf-Prion Protein Gens exprimiert sind. Die Proteine sind extrem hydrophob, haben die Fähigkeit, sehr

stark an Prion Proteine zu binden und konvertieren diese zur β-Konformation. Sie haben auch Sequenzhomologien mit einer Region im Prion Protein, für die durch Andere gezeigt wurde, dass sie bei der Wechselwirkung des Schaf-Prion Proteins mit dem so genannten „Protein X" beteiligt ist. Außer der Möglichkeit, Membranen zu durchdringen, haben BSAS und SCRAPAS strukturelle Ähnlichkeit zu DNA-bindenden Proteinen und auto-aktivieren womöglich ihre eigene Expression. Über das gesamte Molekül betrachtet haben sie untereinander ungefähr 60% Ähnlichkeit. Mehr als 20% der Aminosäuren sind Tryptophan, was unvergleichlich höher ist als der durchschnittliche Tryptophan-Gehalt von < 1% gerechnet über alle Proteine, deren Aminosäuresequenz bekannt ist.

[0012] Zwei Epitope (BSAS epi und SCRAPAS epi, jeweils 14 Aminosäuren) wurden ausgewählt, chemisch synthetisiert und benutzt, um polyklonale Antikörper gegen BSAS (BSAS pcAb) und SCRAPAS (SCRAPAS pcAb) in Kaninchen herzustellen. Zwei innerhalb von BSAS epi und SCRAPAS epi liegende Unterepitope (BSAS mepi und SCRAPAS mepi) wurden ebenfalls synthetisiert, am c-Terminus amidiert und zur Affinitätsreinigung einer spezifischen Antikörper-Population aus BSAS pcAb und SCRAPAS pcAb herangezogen. Diese Antikörper und die mepi Epitope wurden in den unten beschriebenen ELISA Tests eingesetzt.

ELISA Tests

[0013] Es wurden 2 Typen ELISAs entwickelt. Der eine weist in Serum die Antigene BSAS und SCRAPAS nach, der andere die gegen BSAS mepi und SCRAPAS mepi gerichteten endogenen Antikörper (spezifisches IgG). Die Spezifität aller Epitope wurde sowohl in in kommerziellem Maßstab von BSAS pcAb und SCRAPAS pcAb isolierten spezifischen TgG-Populationen, als auch in aus Serumproben von ausgewählten BSE-infizierten Rindern und Skrapie-infizierten Schafen isolierten endogenem IgG bestätigt. Potentiell kreuz-reagierende antigene Epitope wurden in den gegenwärtig zugänglichen Datenbanken nicht gefunden.

Vorbereitung der Serumproben zum Testen

[0014] BSAS und SCRAPAS sind extrem empfindlich gegenüber Einfrieren. Einfrieren über Nacht bei –20°C reduziert die Reaktion einer positiven Probe um 70-80%, Einfrieren bei –80°C eliminiert die Reaktion völlig. Wir nehmen an, dass diese hohe Empfindlichkeit gegenüber Einfrieren am hohen Tryptophan-Gehalt der Proteine und an der Tandem-Anordnung mehrerer Tryptophan-Triaden liegt. Die Wirkung des Einfrierens beeinträchtigt beide ELISA Typen, sie ist aber für den Antikörper-Einfang ELISA nicht so stark wie für den Antigen-Einfang ELISA (Antigen Moleküle binden aufgrund veränderter Konformation irreversibel an das endogene IgG in positiven Sera, was manchmal zu unregelmäßigen Ergebnissen im Antikörper-Einfang Test führt). Daher sind eingefrorene Proben für die ELISAs nicht geeignet. Für diese Untersuchungen müssen Serum Proben von frisch Blut bereitet und bei 4°C gelagert werden.

Beschreibung der Tests

Der Antigen-Einfang Test

[0015] Die Vertiefungen („Wells") von Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl Carbonat Puffer, pH 9,6, mit 5 µg/ml mepi-spezifischen Antikörper bei 4°C über Nacht benetzt. Die Platten wurden 3 × mit ELISA Waschpuffer, der 0,05 Tween-20 enthielt, gewaschen. 5 µl der Serumproben wurden zu 45 µl ELISA Waschpuffer mit 0,075% Tween-20 gegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. 50 µl Sekundär-Antikörper (affinitäts-gereinigter, für SCRAPAS/BSAS spezifischer, mit Meerettich-Peroxidase (HRP) markierter Antikörper), 1/40 in Waschpuffer mit 0,05% Tween-20 verdünnt, wurden zu jedem Well hinzugefügt, und die Platten wurden dann bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Die Platten wurden wieder 5 × mit Waschpuffer mit 0,075% Tween-20 gewaschen. 50 µl Substratlösung (Sigma OPD Tabletten-Set) wurden zu jedem Well gegeben; die Farbentwicklung geschah für 30 Minuten im Dunkeln, danach wurden die Platten bei 492 nm gemessen.

Der Antikörper-Einfang Test

[0016] Die Wells von Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl Carbonat Puffer, pH 9,6, mit 10 µg/ml BSAS mepi oder SCRAPAS mepi bei 4°C über Nacht benetzt. Die Platten wurden 3 × mit ELISA Waschpuffer mit 0.05% Tween-20 gewaschen. 1,5 µl Serumproben wurden zu 48,5 µl ELISA Waschpuffer mit 0,075% Tween-20 gegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Wells wurden 5 × mit 0,075% Tween-20-Waschpuffer gewaschen. 50 µl Sekundär-Antikörper (eine Mischung aus anti-bovines IgG- und anti-Schaf IgG-Antikörper (γ-Ketten-spezifisch und mit HRP markiert), 1/12000 in Waschpuffer mit 0,05% Tween-20 verdünnt, wurden zu jedem Well hinzugefügt, und die Platten wurden bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Die Platten wurden wieder 5 × mit

Waschpuffer mit 0,075% Tween-20 gewaschen. 50 µl Substratlösung (Sigma OPD Tabletten-Set) wurden zu jedem Well gegeben; die Farbentwicklung geschah für 30 Minuten im Dunkeln, danach wurden die Platten bei 492 nm gemessen.

Beschreibung der DGDPS Prozedur

[0017] Generell haben wir zunächst ein Gen identifiziert, das in enger Beziehung zu einem schon mit einer bestimmten Krankheit genetisch oder auf andere Weise assoziierten Gen steht. Sodann haben wir die von dem Gen transcribierte mRNA aus krankem Gewebe oder Patientenblut isoliert und nachfolgend mit der mRNA und reverser Transcriptase cDNA hergestellt. Die neuartige cDNA wurde dann mit spezifischen Primern, die die gesamte kodierende Region der cDNA umfassten, verstärkt, und die cDNA wurde aufgrund ihrer Größe nach Agarose-Gelelektrophorese identifiziert. Schließlich wurde die einzigartige cDNA vom Agarosegel isoliert. Dies ermöglichte uns, das fragliche Molekül auf seine Expression zu prüfen, ohne mehrere Millionen cDNA Klone testen zu müssen.

[0018] Die so in der vorliegenden Erfindung benutzte Prozedur und die erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Beispielen beschrieben.

Beispiel 1

Entdeckung des Rinder-PrP-Prionins BSAS

(1) Wir untersuchten die sequenzierten Regionen innerhalb des bovinen Prion Protein Gen Locus und wählten potentielle komplette Leserahmen (orf's) aus, d.h. solche mit akzeptablen, korrekt plazierten Initiationssequenzen (s. Kozak M. Nucleic Acid res. 12: 857-872 (1984)) und Translations-Terminations-Stopkodons (TAA, TAG oder TGA),
(3) dann wurden die orf's, die die obigen Bedingungen erfüllten, unter Benutzung des universellen Codes in putative Proteine übersetzt,
(4) dann analysierten wir die putativen Proteine mit der in unserem Besitz befindlichen, Komputer-unterstützten Protein-Fingerabdruck-Technologie und erhielten Information über die potentiellen biochemischen Charakteristika der abgeleiteten Proteine,
(5) als nächstes wurden die biochemischen Charakteristika der abgeleiteten Proteine mit den bekannten biochemischen Charakteristika von BSE korreliert.

[0019] Danach prüften wir, ob das Protein exprimiert ist: hierfür wurden innerhalb der Aminosäuresequenz am N-Terminus und am C-Terminus des abgeleiteten Proteins unter Benutzung der Methode von Hopp und Woods K.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828 (1981) zwei potentielle Epitope identifiziert/ausgewählt. Die Sequenzen wurden mit den Sequenzen in Datenbanken verglichen, und es wurden diejenigen ausgewählt, die keine Homologen in den Datenbanken zu haben schienen. Gegen sie gerichtete mono-spezifische polyklonale Kaninchen-Antikörper wurden hergestellt und durch Immunoaffinitäts-Chromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Pharmacia) nach einer Prozedur gereinigt, die den ersten Teil der Empfehlungen des Herstellers und den zweiten Teil wie in Current Protocols in Molecular Biology (Vol 1) Ausubel F.M. et al. (Herausg.) John Wiley & Sons NY, NY 1991 beschrieben kombiniert, und das polyklonale IgG wurde mit HRP gekoppelt. Zur Testung von Serumproben, Blut und Speichel von BSE-positiven Kühen auf BSAS wurde ein „Sandwich ELISA" im Enzym-basierten Immuntest-Format (beschrieben in „ELISA and other Solid Phase Immunoassays" (Kemeny D.M. et al. (Herausg.) John Wiley & sons, N.Y., N.Y. (1988))) benutzt. Dies geschah unter Einsatz von anti-BSAS IgG-HRP in einer kolorimetrischen Reaktion mit „Sigma OPD" als Substrat. Der Vorgang ist im Abschnitt oben beschrieben.

Beispiel 2

Nachweis von BSAS, SCRAPAS und CJAS in clinischen und anderen Proben

[0020] Die Prionin Proteine wurden unter Verwendung der oben beschriebenen ELISAs nachgewiesen. Da einige Moleküle der polyklonalen anti-TSE Antikörper mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten mit Domänen des Hauptepitops einer jeden TSE-Spezies kreuzreagieren, wurde anti-SCRAPAS-HRP als Sekundärantikörper für den Nachweis von BSAS und SCRAPAS benutzt. Für den Nachweis von CJAS wurde entweder anti-SCRAPAS-HRP oder anti-CJAS-HRP eingesetzt.

Beispiel 3

[0021] Eine andere Methode, die für den Einsatz als Routinetest nicht geeignet ist (am Beispiel BSAS): das BSAS Protein wurde aus 100 µl Serum einer infizierten Kuh auf einer anti-BSAS Antikörper Immunoaffinitätssäule isoliert. Das isolierte Protein wurde der SDS Gelelektrophorese, wie bei Schägger H. und von Jabow G.I. Anal. Beiochem. 166: 368-379 (1987) beschrieben, oder der PAGE ohne SDS unterzogen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine dem Western Blotting unterzogen oder auf eine Nylon Membran gepunktet und mit dem affinitäts-gereinigten Antikörper reagiert. Interaktionen des Antikörpers mit dem membran-gebundenen Protein wurde mit einem Chemilumineszenz-Kit von Bio-Rad Inc. nach der Vorschrift des Herstellers (s.a. Blake M.S. et al. Anal. Biochem. 136: 175-179 (1984)) sichtbar gemacht. MOPAS und HAMPAS wurden mit der gleichen Vorgehensweise entdeckt; allerdings wurde die Expression dieser Proteine in Tieren mit experimenteller TSE noch nicht untersucht.

Beispiel 4

[0022] Wir haben im Fall von BSAS und SCRAPAS eine spezifische Assoziation (100%) der Proteine mit Tieren, bei denen die Krankheit bestätigt wurde, oder die in irgendeiner Weise der Krankheit ausgesetzt waren; die Proteine waren nicht mit Tieren assoziiert, die mit der Krankheit nie in Berührung gekommen waren. BSAS und SCRAPAS wurden im Serum von allen Tieren nachgewiesen, die klinisch positiv für die Krankheit waren, und von der Mehrzahl von Tieren, die keine klinischen Symptome zeigten, aber von Herden mit sogar nur einem Fall der Krankheit kamen. CJAS wurde im Serum von zwei CJS Opfern nachgewiesen, von denen eines positiv für CJS und für AD war.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN DARSTELLUNG

[0023] Der Erfolg der vorliegenden Erfindung rührt von unserer Fähigkeit her, die alternativen Gene, die für die potentiell pathogenen Proteine BSAS, SCRAPAS und CJAS kodieren, innerhalb der PrP Gene von Rindern, Schafen und Menschen zu finden. Die Entdeckung der äquivalenten Gene in Mäusen und Hamstern trugen zur Formulierung unseres Modells für TSE bei.

EINZELHEITEN DER ERFINDUNG

[0024] Im Detail liefert die Erfindung Folgendes:

(i) fünf Protein Moleküle essentiell frei von natürlichen Kontaminanten, die für ein von BSAS, SCRAPAS, CJAS und MPAS und HAMPAS ausgewähltes Protein kodiert. Im Besonderen liefert die Erfindung die vorgenannten Protein Moleküle, deren Sequenzen SEQ ID: NO 1, SEQ ID: NO 2 SEQ ID: NO 3, SEQ ID: NO 4 and SEQ ID: NO 5 sind.

SEQ ID: NO 1

M E H W G E P I P R T G Q S W R Q P L S T S G R G W L G S A P S R W L G P A S W R W L G P A S W R W L G S A P W W W L G T A T W W W R L G S R W Y P R S M E Q T Q

SEQ ID: NO 2

M E H W C E P I P G T C Q S N R Q P L P T S G R G N L G S A P W R W L G P T S W R W L G S A P W W W L G T A T W W W R L G S R W

SEQ ID: NO 3

M E H N G Q P I P G A G Q P N R Q P L P T S G R N W L G A A S W W W L G A A S W W W L G A A P W W W L G S R R W H P Q S V E Q A E

SEQ ID: NO 4

M G A A G D N L M V V V G V S P M A V D G A K E G V P I I S G T S P A N Q K P T S S I W Q G L R Q L G Q

SEQ ID: NO 5

M G T A P W W W L G T T S W W W L G S A P W W W L G S R R W H P Q S V E Q A Q

(ii) Eine Methode zum Nachweis latenter CJS, BSE und Skrapie beim Menschen, bei Rindern und Schafen unter Verwendung der oben beschriebenen ELISA Methode zur Detektion von endogenem IgG, das gegen ein Epitop in dem Protein BSAS (SEQ ID: NO 1), oder dem Protein SCRAPAS (SEQ ID: NO 2) oder dem Protein CJAS (SEQ ID: NO 3) gerichtet ist, in Blut von Tieren und Menschen, die keine Symptome der Krankheit zeigen.

(iii) Eine Methode zum Nachweis von Kreuzinfektionen bei Tieren durch andere Tiere und beim Menschen durch Tiere mit der oben unter (ii) beschriebenen Methode zur Detektion von spezifischen anti-Prionin Antikörpern im Blut einer Person/eines Tieres.

(iv) Eine Methode zum Nachweis einer Kontamination in Fleisch, Fleisch Produkten und Blut Produkten durch BSAS (SEQ ID: NO 1), SCRAPAS (SEQ ID: NO 2) und CJAS (SEQ ID: NO 3) unter Verwendung

einer oder beider oben beschriebener ELISA Methoden zur Detektion entweder des Prionins oder von Spuren eines Spezies-spezifischen anti-Prionin IgGs in dem Testprodukt.

DIE MOLEKÜLE DER ERFINDUNG

[0025] BSAS, SCRAPAS und CJAS („Prionine") sind kodiert und exprimiert von innerhalb der bovinen, ovinen und humanen Prion Protein Gene:
BSAS „SEQ ID: NO 1" ist ein 9,6 kDa basisches Protein mit 19,75% Tryptophan (Trp) Resten, einer Strecke von 22 Aminosäuren (aa), die voraussichtlich eine positive DNA-Regulationseinheit ist, welche das Protein als positiven DNA-Regulator klassifiziert. Die Sekundärstruktur von BSAS ist als fünf (möglicherweise sieben) aneinandergereihte β-Faltblatt/β-Wendung organisiert. BSAS hat zwei Regionen mit signifikanter Homologie zu Regionen im bovinen Prion Protein zwischen aa 90-150. Zur letztgenannten Region wurde vorgeschlagen, dass sie an der Äthiologie von BSE bei Kühen beteiligt ist. BSAS hat außerdem eine auffallende Homologie zum Wachstumshormon-abgebenden Hormonrezeptor (growth hormone releasing hormone receptor).
SCRAPAS „SEQ ID: NO 2" ist ein 7,63 kDa basisches Protein. Es enthält 21, 87% Trp Reste und die zu der Einheit in BSAS identische voraussichtliche positive DNA-Regulationseinheit. Die Sekundärstruktur von SCRAPAS ist als vier oder fünf gleichmäßig verteilte β-Faltblätter in einem mit dem im BSAS fast identischen Muster organisiert. SCRAPAS hat keine signifikante Homologieregion zum Haupt-Schaf-Prion Protein, aber eine moderate Homologie zur oben beschriebenen Region (aa 90-150) im bovinen Prion Protein.
CJAS „SEQ ID: NO 3" ist ein 7,7 kDa basisches Protein. Es enthält 21,53% Trp Reste. CJAS hat eine Pro-reiche n-terminale Region und eine Sequenz von 27 aa, die eine potentielle Transmembranhelix enthält und die das Molekül ans Transmembranprotein klassifiziert. Die Sekundärstruktur von CJAS ist der von BSAS und SCRAPAS ähnlich und ist als vier aneinandergereihte β-Faltblätter, jeweils getrennt durch eine β-Wendung, organisiert. Das Protein hat eine Domäne mit signifikanter Homologie zu einer Domäne im Malaria Parasit Merozoit Membranprotein, von dem angenommen wird, dass es die Vakuolierung von infizierten Erythrozyten fördert und ihnen eine spongiforme Erscheinung verleiht (s. Dluzewski A.R. et al. J. Cell Sci. 92: 691-699 (1989)).
MPAS „SEQ ID: NO 4 ist ein 5,2 kDa neutrales Protein. Es enthält einen einzelnen Tryptophan Rest (< 0,5%). Die Sekundärstruktur ist als drei gleichmäßig verteilte, durch breite alpha-helikale Regionen getrennte β-Faltblättern organisiert. Es ist kein Protein mit β-Faltblattstruktur.
HAMPAS „SEQ ID: NO 5" ist ein 4,79 kDa basisches Protein. Es enthält 26% Tryptophan Reste. Es ist im Wesentlichen ein am N-Terminus verkürztes CJAS Protein. Mit CJAS hat es ein antigenes Epitop gemeinsam. Die Sekundärstruktur ist als drei aneinanderhängende β-Faltblätter organisiert, die ähnlich wie die β-Faltblätter 3, 4 und 5 von CJAS angeordnet sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0026] **Abb.** 1a (SEQ ID: NO 1) ist die Aminosäuresequenz von BSAS.

[0027] **Abb.** 1b (SEQ ID: NO 2) ist die Aminosäuresequenz von SCRAPAS.

[0028] **Abb.** 1c (SEQ ID: NO 3) ist die Aminosäuresequenz von CJAS.

[0029] **Abb.** 1d (SEQ ID: NO 4) ist die Aminosäuresequenz von MPAS.

[0030] **Abb.** 1e (SEQ ID: NO 5) ist die Aminosäuresequenz von HAMPAS.

[0031] **Fig.** 2a-c zeigt die Sequenz der antigenen Epitope von BSAS, SCRAPAS und CJAS. Das SCRAPAS Epitop kommt in BSAS vor (13 von 14 Aminosäureresten in BSAS und 9 von 14 Resten in CJAS); ein Teil des BSAS Epitops kommt in SCRAPAS und CJAS vor.

[0032] **Abb. 3a** ELISA Nachweis von endogenem anti-BSAS IgG in Serum von BSE-positiven und -negativen Rindern.

[0033] **Abb. 3b** ELISA Nachweis von endogenem anti-BSAS IgG in Serum von BSE-positiven, BSE-negativen und klinisch negativen Rindern von Herden mit BSE-Fällen.

[0034] **Abb. 3c** ELISA Nachweis von endogenem anti-SCRAPAS IgG in Serum von Skrapie-positiven und -negativen Schafen.

[0035] **Abb. 3d** ELISA Nachweis von endogenem anti-SCRAPAS IgG in Serum von Skrapie-positiven, Skra-

pie-negativen und klinisch negativen Schafen, die Skrapie ausgesetzt waren.

[0036] Abb. 3e ELISA Nachweis des CJAS Proteins in Serum von Patienten mit CJD und Patienten mit anderen neurologischen Krankheiten.

[0037] Abb. 3f ELISA Nachweis von endogenem anti-CJAS IgG in Serum von CJD-Patienten und Patienten mit einer Anzahl anderer neurologischer Krankheiten.

[0038] **Abb.** 3g Immunoblot eines kationischen, nicht-SDS Polyacrylamid Gels, welches das Vorkommen von BSAS und BSAS-Komplexen mit anti-BSAS IgG im Serum einer Kuh mit BSE.

[0039] Abb. 4 Sequenzen der DNA-bindenden Domänen von BSAS und SCRAPAS (die Sequenzen sind 100% homolog) und die Sequenz der membranspannenden Alphahelix von CJAS.

[0040] **Abb.** 5a Evolutionäre strukturelle Beziehung zwischen BSAS, SCRAPAS, CJAS, HAMPAS und MPAS nach der Gruppenanalyse von Prionen und Prioninen.

[0041] **Abb.** 5b Die β-Faltblatt-Struktur-Charakteristika von Prioninen.

DIE PHYSIOLOGISCHE ROLLE VON BSAS, SCRAPAS UND CJAS IN DER NEUROPATHOLOGIE VON BSE, SKRAPIE UND CJD

[0042] BSAS, SCRAPAS und CJAS („Prionine") werden von innerhalb der jeweiligen Prion Protein Gene exprimiert (wie es auch für die Expression von Leserahmenverschiebungs-Proteinen von innerhalb des humanen APP Gens bei der Alzheimer Krankheit gezeigt wurde). Sie sind strukturell nahe verwandt; allerdings scheint die Verwandtschaft nicht so nah zu sein wie die zwischen den PrPs (s. Abbildung), die nicht nahe verwandt mit den Prioninen sind (**Abb.** 5a). Prionine sind gänzlich β-Faltblatt-strukturierte Proteine (**Abb.** 5b). In dieser Hinsicht ähneln sie Schlangen- und Skorpion-Toxinen und einigen Insekten-Defensinen (Poren-bildende Proteine), die vornehmlich β-Faltblatt-Strukturen aufweisen (Bontems F. et al. Science 254: 1521-1523 (1991)), unterscheiden sich aber von diesen Proteinen, weil ihnen Cystin-Reste fehlen; allerdings enthalten Prionine ~20 Trp Reste, was dafür spricht, dass sie in Zellmembranen und anderen zellulären lipidhaltigen Strukturen löslich sind. Weiterhin werden in Prioninen die β-Faltblätter in regelmäßigen Abständen durch β-Wendungen abgelöst, und die Proteine sind, bis auf kurze Sequenzen am c-terminalen und n-terminalen Ende, völlig hydrophobe Moleküle; diese strukturellen Eigenschaften sind ähnlich wie funktionelle Domänen von Proteinen einer anderen Proteinfamilie, die mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten und deren Struktur verändern (s. PZD und PTB Domänen, Zhou H. et al. Nature Struct. Biol. 3: 388-393 (1996)).

[0043] Die oben erwähnten strukturellen Eigenschaften, die die Ähnlichkeit der Prionine mit Familien pathogener, Membran-affiner Proteine anzeigen, weisen darauf hin, dass Prionine pathogene Proteine sind. Dies wird untermauert durch die krankheits-spezifische Expression von BSAS, SCRAPAS und CJAS.

[0044] Poren-bildende Proteine zerstören Zellen, indem sie Löcher in der Membran bilden (Peitsch M. et al. Mol. Immunol. 27: 589-602 (1990)). Im Zellzytoplasma aggregieren sie gewöhnlich und werden löslich. Zwar enthalten weder BSAS noch SCRAPAS ein „komputer-definiertes" Transmembransignal, weil sie aber hoch hydrophobe moleküle sind, imitieren sie möglicherweise Poren-bildende Proteine, dadurch, dass sie mit Hilfe eines hauptsächlich aus Trp bestehenden hydrophoben Keils in die Plasmamembran eindringen (s. Hill H.P. et al. Science 251: 1481-1485 (1991)). Weiterhin spricht die extrem hohe Konzentration an Tryptophan-Resten dafür, dass Prionine Lipid-lösliche Proteine sind.

[0045] Das aktuelle Dogma besagt, dass PrPs zum infektiösen PrPsc wird, wenn die Sekundärstruktur des PrP von der vorherrschenden Alphahelix zur β-Faltung „umkippt", und dass diese molekulare Veränderung die Prionen veranlasst, die neuronale Membran zu verlassen und außerneuronal zu akkumulieren (Darcel E. Vet. Res. Commun. 19: 231-252 (1995)). Wie oben angedeutet, können Prionin Proteine womöglich an andere Proteine binden und die β-Faltblatt-Struktur auf diese übertragen. Wie Poren-bildende Proteine können Prionine auch das wechselwirkende Protein als Chaperon für den Transport zu Membranflächen in einer löslichen Form nutzen. PrPs werden im lymphoretikulären System exprimiert und zum Gehirn transportiert. Wie Prione werden Prionine bei allen TSE Krankheiten gefunden. Weiterhin spricht die evolutionäre Beziehung zu Prionen (exprimiert von den gleichen DNA-Sequenzen) und die Neigung von Proteinen, die von den selben DNA-Sequenzen exprimiert werden, zur Bindungsbildung (s.a. Baranyi L et al. Nature Medicine 1: 894-901 (1995)) dafür, dass Prionine spezifische Moleküle sind, die PrPc zu PrPsc konvertieren.

[0046] Wie zuvor erwähnt, sprechen bestimmte Beobachtungen dafür, dass BSE verursacht wird, wenn Kühe fahrlässig mit den Überresten Skrapie-infizierter Schafe gefüttert werden, und dass BSE auf den Menschen übertragen wird, wenn dieser infiziertes Fleisch verzehrt, und dass die Infektion einen Krankheitsphänotyp verursacht, der dem von CJD sehr ähnelt. Die vorliegende Erfindung scheint diese Hypothese zu unterstützen, da diese drei Krankheiten mit drei Spezies-spezifischen, einzigartigen Proteinen verbunden sind, die potentiell mit jedem PrP interagieren können und daher jede Zelle, in die sie eindringen, „infizieren" können.

[0047] BSAS SEQ ID: NO 1, SCRAPAS SEQ ID: NO 2 and CJAS SEQ ID: NO 3 sind spezifisch in mit BSE infizierten Kühen, mit Skrapie infizierten Schafen und mit an CJD erkrankten Menschen exprimiert alle drei Leserahmen öffnen an identischen Translations-Initiationssequenzen. BSAS und SCRAPAS sind positive DNA-bindende Proteine, die eine Anzahl von Genen aktivieren können und über Speziesgrenzen hinweg infizieren können. Diese beiden Proteine werden von alternativen Leserahmen innerhalb der Haupt-Priongene exprimiert. Daher, wenn Kühe SCRAPAS in aus Skrapie-infizierten Schafen hergestelltem Futter fressen, kann eine falsche Bindung von SCRAPAS an ein PrP in den Lymphozyten im Magen stattfinden, so dass SCRAPAS zum Gehirn transportiert werden kann, wo es die Translation von BSAS aktivieren kann, welches wiederum weitere Prione zur pathogenen Form konvertieren und daher BSE in diesen Tieren initiieren kann. Wenn BSAS über die Nahrungskette in den Menschen gelangt, kann es die Translation (oder Transcription) von CJAS, das dieselbe Translations-Initiationssequenz hat wie BSAS und SCRAPAS, aktivieren und die Symptome von CJD initiieren.

[0048] Von den obigen Ausführungen sollte deutlich werden, dass Prionine die Blut-Hirn-Schranke gebunden an ein Chaperon passieren können. Im Gehirn angelangt, können sie mit gewöhnlich von PrP besetzten neuronalen Membranbindestellen in Wechselwirkung treten. Weiterhin können Prionine, da sie Lipid-lösliche Moleküle sind, die Plasmamembran durchdringen, durch Lipidschichten diffundieren und in Neuronen eindringen. Wir glauben, dass dies wie folgt, am Beispiel von BSAS, ablaufen kann:
Das PrP Protein in der neuronalen Plasmamembran ist entweder ein spezifischen oder ein opportunistisches Zielmolekül für Prionine. BSAS, entweder endogen exprimiert oder von außen in eine Zelle eindringend, interagiert mit PrPs. Beim Binden an das PrP zwingt die rigide β-Faltblattstruktur von BSAS die flexible Konformation des PrP, sich in einer Weise umzuformen, die die β-Faltblattstruktur von BSAS beherbergt. Dies resultiert in der Bildung von Prionen (s. Harrison S.C. Cell 86: 343-344 (1996)). Der lösliche BSAS-Prion komplex durchwandert das Zytoplasma und verlässt die Zelle durch die Membran, tritt in das lymphatische vesikuläre Transportsystem ein, in dem er die Blut-Hirn-Schranke durchquert, und erreicht die Oberfläche einer bestimmten Untergruppe von Neuronen, die gewöhnlich das Ziel für PrPs sind. Beim Kontakt mit einem Neuron löst sich BSAS vom Prion und dringt in die neuronale Membran ein. Das Prion kann im konvertierten Zustand nicht in die Membran eintreten und bleibt im intraneuronalen Raum zurück, wo die Aggregation mit anderen verworfenen Prionen stattfindet. Alternativ kippt das PrP beim Ablösen von BSAS in den ursprünglichen alpha-helikalen Zustand zurück. Der Ereigniszyklus wird verstärkt da in das Neuron eintretendes BSAS die Expression von PrPs überaktiviert.

[0049] Da BSAS und SCRAPAS die identische positive DNA-Regulationssequenz, **Abb. 4**, enthalten, aktivieren sie wahrscheinlich ein ähnliches Portfolio an Genen und auto-aktivieren ihre eigene Transcription oder Translation.

[0050] Alternativ können Prionine von einem 3' abwärts des vermutlich für die Expression des PrP zuständigen Promotors befindlichen Promotorsystem exprimiert werden. Dagegen werden PrPs in geeigneten Zellen lebenslang exprimiert und scheinen essentielle Bestandteile von Neuronen zu sein, wenn auch ihre Funktion gegenwärtig nicht bekannt ist (s. aber Schmerling et al. Cell 93: 203-214 (1998)). Die Expression der Prionine, ihre Sezernierung und Zielrichtung auf Neuronen und andere nicht-neuronale Zellen (spezifische oder opportunistische Rezeptoren) geschieht wahrscheinlich nur in erkrankten Tieren.

[0051] Die Aussage, dass Prionine pathogen sind, erhielt Unterstützung durch den Befund, dass Prionine an verschiedene Immunglobulin-Moleküle gebunden im Blut aller klinisch BSE/Skrapie-positiven Tiere und bei CJD-erkrankten Menschen auftrat. Der Antikörper war auch bei einer signifikanten Anzahl klinisch negativer Tiere vorhanden, die aber BSE oder Skrapie ausgesetzt waren. Der endogene Antikörper wurde nie bei nicht BSE/Skrapie-exponierten Tieren oder klinisch normalen Personen ohne Kontakt mit CJD gefunden. Dies spricht dafür, dass das Immunsystem von Tieren und Menschen die Prionine als fremd erachtete und versuchte, wenn sie exprimiert wurden, sie zu neutralisieren. Die Immunantwort auf Prionine ist unter Umständen äußerst wichtig für die Kontrolle der TSE Krankheiten, insbesondere für die Kontrolle von Kreuzinfektionen. Sie

ist auch wichtig für den Nachweis von Latenz, und offensichtlich für die präsymptomatische Diagnose von TSE Krankheiten. Weiterhin erscheint es möglich, dass die Prionin-Expression initiiert werden kann, wenn geeignete Zellen Umweltgiften ausgesetzt werden (z.B. mikrobielle oder viröse Infektion, intrezelluläre giftige metabolische Nebenprodukte, oder Stress). Die Wirkung solcher Infektionen könnte erstens darin bestehen, dass sie das Immunsystem derart belastet, dass es andere Aufgaben nicht effizient genug bewältigen kann, und zweitens darin, dass das infektiöse Agens die Expression des Prionins aktiviert. Dies bewirkt eine geringere Effektivität des Immunsystems und ermöglicht, dass Prionine sich ihm entziehen, in Zellen eindringen und mit PrPs in Wechselwirkung treten.

[0052] Zusammenfassend treten Prionine als Poren-bildende Proteine auf oder liegen gebunden an Prione in Neuronen vor, zerstören die Lipidschicht und dringen in Neuronen ein, wo sie die Expression einer Anzahl von Genen aktivieren, einschließlich des PrP- und des Prionin-Gens. Prionin Moleküle, die auf oder in der Membran verweilen, regen das neuronale Immunsystem an. Dieses Immunsystem ist gegen Zellen gerichtet, die das Prionin Molekül enthalten und zerstören daher selektiv diese das Prionin tragenden Zellen, was den Charakterzug einer Autoimmunreaktion gegen endogene Neuronen annimmt. Da dieses Autoimmun-Geschehen selektiv gegen Zellen gerichtet ist, die auf ihrer Oberfläche Prionine tragen, bleiben umgebende Zellen größtenteils unberührt. Das Ergebnis ist die vakuolierte, schwammartige Erscheinung des TSE Gehirns.

DIE NUTZUNG DER MOLEKÜLE DER VORLIEGENDEN ERFINDUNG

A. Diagnostische Nutzung

[0053] Da BSAS, SEQ ID: NO 1, SCRAPAS, SEQ ID: NO 2 und CJAS, SEQ ID: NO 3, bei normalen Tieren oder Menschen nicht in nachweisbaren Mengen exprimiert werden, ist der Nachweis dieser Moleküle in einer Gewebe- oder Flüssigkeitsprobe (wie z.B. einer Biopsie oder Blut-, Urin- oder Speichelprobe) indikativ für die Krankheit in dem Tier bzw. der Person, sogar bevor irgendwelche klinischen Symptome vorhanden sind. Beispiel 6: 103 gemischte Blindproben, die aus Blut, Serum und Urin bestanden, wurden mit dem in **Abb. 3a** gezeigten ELISA Test untersucht. Alle Proben von klinisch positiven Tieren waren positiv für BSAS oder SCRAPAS, alle klinisch negative Tiere, die nie BSE oder Skrapie ausgesetzt waren, testeten negativ für BSAS oder SCRAPAS, während bis zu 30% der klinisch negativen Tiere, die BSE ausgesetzt waren, positiv testeten. Letztere Tiere waren präsymptomatisch für die Krankheit.

[0054] Wir haben empfindliche Sandwich ELISA Technologie zum Nachweis von BSAS, SCRAPAS und CJAS in Kuh-, Schaf- und Menschen-Material eingesetzt, wie auch für den Nachweis von Latenz und Kreuzkontamination bei Tieren, Nahrungsmitteln und Blutprodukten; der Nachweis dieser Moleküle kann aber auch mit verschiedenen anderen immunologischen Methoden erfolgen; geeignete Immunoassay-Formate wurden zahlreich beschrieben (Yolken R.H. Rev. Infect. Dis. 4: 35 (1982); Collins W.P. In: Alternative Immunoassays, John Wiley & Sons, NY (1985); Ngo T.T. et al. In: Enzyme Mediated Immunoassay, Plenum Press, NY (1985)).

[0055] Beispiel 7: Der gegen das Epitop im Hamster Prionin HAMPAS, SEQ ID: NO 5, gerichtete Antikörper kann für den Nachweis von CJAS verwendet werden. An Stelle solcher Antikörper können äquivalente Bindemoleküle verwendet werden, wie z.B. Antikörper-Fragmente (F(ab'), F(ab')2, Einzelketten-Antikörper etc.), rekombinante Antikörper, chimere Antikörper etc.

[0056] Wie oben angedeutet können in Immunoassay-Formaten markierte Antikörper eingesetzt werden, um den Nachweis zu erleichtern. Radioisotopen-Immunoassays („RIAs") haben den Vorteil, einfach, empfindlich und leicht ausführbar zu sein. Radioaktive Markierungen haben relativ kleine atomare Dimensionen, weshalb sie gewöhnlich nicht die Reaktionskinetik beeinflussen. Aufgrund des radioaktiven Zerfalls leiden solche Assays aber unter dem Nachteil, dass die Reagenzien eine kurze Lebensdauer haben, dass eine spezielle Handhabung und Entsorgung nötig ist und dass der Gebrauch einer komplizierten und teuren analytischen Ausrüstung erforderlich ist. RIAs sind beschrieben von Work T.S. et al. In: Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, NY (1978), mit besonderem Hinweis auf den Absatz mit dem Titel „An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" von Chard T.. Es gibt nicht ein einzelnes Enzym, das ideal als Markierung in jedem erdenklichen immunometrischen Assay wäre. Stattdessen muss man bestimmen, welches Enzym für ein bestimmtes Testsystem geeignet ist. Für die Auswahl eines Enzyms wichtige Kriterien sind die Umsatzzahl (turnover number) des reinen Enzyms (die Anzahl Substratmoleküle, die pro Enzymstelle und Zeiteinheit umgesetzt werden), die Reinheit der Enzympräparation, die Nachweisempfindlichkeit des Produktes, die Leichtigkeit und Schnelligkeit des Nachweises der Enzymreaktion, die Abwesenheit von Störfaktoren oder von enzym-ähnlicher Aktivität in der Probeflüssigkeit, die Stabilität des Enzyms und seiner Konjugate, die Erhältlichkeit und die Kosten für das Enzym und seine Konjugate, und ähnli-

ches. Beispiele von geeigneten und brauchbaren Enzymen sind neben vielen anderen Peroxidase, Acetylcholin-Esterase, alpha-Glyzerinphosphat Dehydrogenase, Alkalische Phosphatase, Asparaginase, β-Galactosidase und Catalase. Peroxidase und Urease gehören zu den mehr bevorzugten Enzymmarkierungen, insbesondere wegen chromogener pH-Indikatoren, die ihre Aktivität schon dem bloßen Auge sichtbar machen.

B. Therapeutische Nutzung

[0057] Es ist von Bedeutung, dass die gegenwärtige Erfindung Hilfsmittel für die Behandlung von BSE, Skrapie und CJD liefert. Die Behandlung kann „prophylaktisch" oder „therapeutisch" sein. Eine prophylaktische Behandlung wird im Vorwege zu irgendwelchen klinischen Symptomen von BSE, Skrapie oder CJD zur Verfügung gestellt, um den späteren Beginn der Krankheit zu verhindern oder abzuschwächen. Eine therapeutische Behandlung wird in Reaktion auf den Beginn von Symptomen von BSE, Skrapie oder CJD angewendet und dient dazu, die aktuellen Krankheitssymptome abzuschwächen.

[0058] In einer Verdeutlichung kommt so eine Behandlung dadurch zustande, dass behandlungsbedürftigen Tieren oder Menschen eine wirkungsvolle Menge eines Antikörpers, eines Antikörper-Fragments (F(ab'), F(ab')2, Einzelketten-Antikörper) oder einer Kombination von beiden, die an BSAS, SCRAPAS oder CJAS binden können, verabreicht wird. Hierbei ist eine wirkungsvolle Menge eine Menge, die ausreicht, einen klinisch signifikanten Unterschied im Schweregrad eines Symptoms, oder eine klinisch signifikante Verzögerung des Beginns eines Symptoms zu erwirken.

[0059] Für eine akute Behandlung mag die Verabreichung von monospezifischen polyklonalen oder von monoklonalen Antikörpern (oder von Fragmenten dieser beiden) wertvoll sein. Der Einsatz von nicht-immunogenen Antikörpern ist aber vorzuziehen, was insbesondere für die chronische Anwendung gilt. Solche Moleküle können pseudo-homolog sein (d.h. produziert in irgendeiner Spezies und zu einer Form verändert, die sich nicht von der humanen Form unterscheidet). Beispiele solcher pseudo-homologer Moleküle schließen „humanisierte" ein (d.h. nicht-immunogen beim Menschen), die durch Rekombinations- oder andere Technologie hergestellt werden. Solche Antikörper sind Äquivalente von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, sind aber weniger immunogen und werden vom Patienten besser toleriert.

[0060] Humanisierte anti-CJAS Antikörper können z.B. durch Ersetzen eines immunogenen Teils jedes Antikörpers durch einen nicht-immunogenen Teil (d.h. chimere Antikörper) hergestellt werden (Robinson R.R. et al. Internationale Patentveröffentlichung PCT/US86/02269; Akira K. et al. Europäische Patentanmeldung 184,187; Taniguchi M. Europäische Patentanmeldung 171,496; Morrison S.L. et al. Europäische Patentanmeldung 173,494; Neuberger M.S. et al. PCT Anmeldung WO 86/01533; Cabilly S. et al. Europäische Patentanmeldung 125,023; Better M. et al. Science 240: 1041-1043 (1988); Liu A.Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443 (1987); Liu A.Y. et al. J. Immunol. 139: 3521-3526 (1987); Sun L.K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218 (1987); Nishimura Y. et al. Cancer Res. 47: 999-1005 (1987); Wood C.R. et al. Nature 314: 446-449 (1985); Shaw et al. J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559 (1988)). Allgemeine Reviews über "humanisierte" chimere Antikörper wurden von Morrison S.L. (Science 229: 1202-1207 (1985)) und von Oi V.T. et al. (BioTechniques 4: 214 (1986)) verfasst. Geeignete „humanisierte" Antikörper können alternativ auch durch CDR oder CEA hergestellt werden (Jones P.T. et al. Nature 321: 552-525 (1986); Verhoeyan et al. Science 239: 1534 (1988); Beidler C.B. et al. J. Immunol. 141: 4053-4060 (1988)).

D. Verabreichung der Moleküle der vorliegenden Erfindung

[0061] Zusätzliche pharmazeutische Methoden können zur Kontrolle der Einwirkzeit eingesetzt werden. Präparationen zur kontrollierten Abgabe können durch den Einsatz von Polymeren zur Komplexierung oder Absorption des Mittels erreicht werden. Die kontrollierte Zuführung kann durch die Wahl geeigneter Makromoleküle (z.B. Polyester, Polyaminosäuren, Polyvinylpyrrolidon, Äthylenvinylazetat, Methycellulose, Carbosymethylcellulose oder Protaminsulfat) und der Konzentration der Makromoleküle, wie auch der Verabreichungsmethoden zur Kontrolle der Krankheit ausgeübt werden.

[0062] Nach dieser allgemeinen Beschreibung der Erfindung durch Referenzen und Beispiele, die dem leichteren Verständnis für Jedermann mit ausreichender Fachkenntnis dienen, muss hier darauf hingewiesen werden, dass die Erfindung hierdurch nicht eingeschränkt werden sollen, es sei denn, es ist ausdrücklich erwähnt.

[0063] Die Erfindung wird durch die Patentansprüche definiert.

TABELLEN

Tabelle 1

Antigen-Einfang ELISA Testergebnisse mit Blut und Urin von Kühen und Schafen mit BSE bzw. Skrapie.

BSE dia, Skrapie

dia	= klinische Diagnose von Tieren
cv	= Herde aus einem EU-Land
neg	= keine sichtbaren BSE-Symptome aber Herden mit BSE/Skrapie ausgesetzt
pos	= klinische BSE-Symptome
nz	= Testmaterial direkt von einem Skrapie/BSE-freien Land erhalten
can 43-83	= Plasma von „40" kanadischen Kühen, die nie BSE ausgesetzt waren
*	= alle Proben testeten im ELISA negativ

Tabelle 2.1 & 2.2

[0064] Antikörper-Einfang ELISA Testergebnisse mit Serum erhalten von Skrapie-positiven Schafen und mit Serum erhalten von Skrapie-negativen Schafen von einer Herde, die nie Skrapie ausgesetzt war.

Tabelle 3

[0065] Antikörper-Einfang ELISA Testergebnisse mit Serum erhalten von BSE-positiven Kühen und von BSE-negativen Kühen die nie BSE ausgesetzt waren.

LEGENDEN ZU DEN ABBILDUNGEN

Fig. 1a-e

[0066] Die von der Sequenz der mRNA abgeleiteten Aminosäurensequenzen der Prionine BSAS, SCRAPAS, CJAS, MPAS und HAMPAS.

Abb. 2

[0067] Sequenz der für die Herstellung polyklonaler Antikörper benutzten antigenen Epitope. Die Epitope wurden mit einer Festphasentechnologie chemisch synthetisiert, mit HPLC gereinigt und an Key Hole Limpet Hämocyanin gekoppelt. IgG wrude von Immunseren an CN-Sepharose gekoppeltem Epitop durch Affinitäts-Säulenchromatographie gereinigt.

Abb. 3

(a) Nachweis von endogenem anti-BSAS IgG in BSE-positiven Kühen, aber nicht in gut charakterisierten BSE-negativen Kühen (Platten mit BSAS benetzt und gebundener Antikörper mit anti-bovinem IgG.HRP detektiert).
(b) Nachweis von endogenem anti-BSAS IgG in Serum abgenommen von Kühen mit klinischer BSE, klinisch normalen Kühen einer Herde mit einem BSE-Fall und klinisch negative, nicht BSE-exponierten Kühen.
(c) Nachweis von endogenem anti-SCRAPAS IgG in Serum abgenommen von Skrapie-positiven Schafen, aber nicht in Serum abgenommen von Schafen, die nie Skrapie ausgesetzt waren (Platten mit SCRAPAS benetzt und anti-SCRAPAS Antikörper wurde detektiert mit anti-Schaf IgG.HRP).
(d) Nachweis von endogenem anti-SCRAPAS IgG in Serum von Schafen mit klinischer Skrapie, in Serum fon klinisch normalen Schafen von einer Herde mit mehreren Skrapie-Fällen und in Serum von Schafen, die nie Skrapie ausgesetzt waren.
(e) Nachweis von CJAS in Serum abgenommen von zwei an CJD erkrankten Personen, aber nicht bei einer normalen Person oder bei Patienten mit anderen neurologischen Zuständen (Platten wurden mit anti-SCRAPAS IgG benetzt, und CJAS wurde mit anti-CJAS IgG.HRP detektiert; 1 = physiologische Alterung, 2 = diffuse Lewy Körper, 3 = Parkinson, 4 = CJD, 5 = CJD und Alzheimer Krankheit, 6 = Epilepsie, 7 = Dementia vom gemischten Typ).
(f) Nachweis von endogenem anti-CJAS IgG in Serum von zwei CJD Patienten, aber nicht in Serum von 33

klinisch normalen Personen und Personen mit verschiedenen neurodegenerativen Zuständen (CJAS wurde an die ELISA Wells gebunden, und gebundenes endogenes anti-CJAS IgG wurde mit Fc-spezifischem anti-human IgG.HRP detektiert); 2 & 34 = CJD, 20 = Alzheimer Krankheit, 1, 3-19, 21-33 & 35 = Normale und andere Krankheiten.
(g) Das Vorkommen von BSAS und BSAS komplexiert mit IgG Fragmenten im Serum isoliert von einer BSE-positiven Kuh. 50 µl des Serums wurden mit kationeischer nicht-SDS PAGE elektrophoretisiert und auf eine Nylonmembran geblottet. Das Blot wurde mit anti-BSAS IgG behandelt, und die Gegenwart von anti-BSAS Antikörpern komplexiert mit BSAS wurde mit einem Maus anti-Kaninchen IgG.HRP, gekoppelt mit einem Chemilumineszenzsubstrat, und nachfolgender Röntgenfilm-Exposition detektiert. In einem anderen, nicht gezeigten Experiment wurde BSAS in der den Komplex enthaltenden Bande identifiziert.

Abb. 4

[0068] Sequenz a-b des positiven DNA-Regulators von BSAS und SCRAPAS und c der Membran-spannenden Helix von CJAS.

Abb. 5

[0069] Evolutions-Beziehung zwischen den Prioninen BSAS, SCRAPAS und CJAS, MPAS und HAMPAS; zwischen bovinem PrP, Schaf-PrP, humanem PrP, Maus-PrP und Hamster-PrP.

Abb. 6

[0070] Die β-Faltblatt-Wahrscheinlichkeit („propensity") der Prionine.

Tabelle 1

Probe	Quelle	Gewebe	BSE-dia.	Skrapie-dia.	ELISA
1	cv	Serum	neg	na	-
2	cv	Serum	neg	na	+
3	cv	Serum	pos	na	+
4	cv	Serum	neg	na	-
5	cv	Serum	pos	na	+
6	cv	Serum	pos	na	+
7	cv	Serum	pos	na	+
8	cv	Serum	neg	na	+
9	cv	Serum	neg	na	-
10	cv	Serum	pos	na	+
11	cv	Serum	pos	na	+
12	cv	Serum	neg	na	-
13	cv	Serum	pos	na	+
14	cv	Serum	neg	na	-
15	cv	Serum	neg	na	+
16	cv	Serum	neg	na	-
17	cv	Serum	neg	na	+
18	cv	Serum	pos	na	+
19	cv	Serum	neg	na	-
20	cv	Serum	pos	na	+
21	cv	Serum	neg	na	+
22	cv	Serum	neg	na	-
23	cv	Serum	neg	na	-
24	cv	Serum	neg	na	-
25	cv	Serum	neg	na	-
26	cv	Serum	pos	na	+
27	cv	Serum	pos	na	+
28	cv	Serum	pos	na	+
29	cv	Serum	pos	na	+
30	cv	Serum	pos	na	+
31	cv	Urin	pos	na	+
32	cv	Urin	pos	na	+
33	cv	Urin	pos	na	+
34	cv	Urin	ops	na	+
35	cv	Urin	pos	na	+
36	cv	Urin	neg	na	+
37	cv	Urin	neg	na	+
38	nz	Urin	neg	na	-
39	nz	Urin	neg	na	-
40	nz	Urin	neg	na	-
41	nz	Urin	neg	na	-
42	nz	Urin	neg	na	-
43 - 83	can	Plasma	all neg	na	-
84	cv	Plasma	na	neg	-
85	cv	Plasma	na	neg	-
86	cv	Plasma	na	neg	-
87	cv	Plasma	na	pos	+
88	cv	Plasma	na	neg	-
89	cv	Plasma	na	pos	+
90	cv	Plasma	na	neg	-
91	cv	Plasma	na	pos	+
92	cv	Plasma	na	pos	+
93	cv	Plasma	na	neg	-
94	cv	Plasma	na	neg	-
95	cv	Plasma	na	pos	+
96	cv	Plasma	na	pos	+
97	cv	Plasma	na	pos	+
98	cv	Plasma	na	neg	-
99	cv	Plasma	na	neg	-
100	cv	Plasma	na	pos	+
101	cv	Plasma	na	neg	-
102	cv	Plasma	na	pos	+
103	cv	Plasma	na	pos	+

Tabelle 2.1

durchschnittliche Absorption	status	durchschnittliche Absorption	status
367	POS	211	NEG
373	POS	117	NEG
389	POS	182	NEG
449	POS	19	NEG
437	POS	143	NEG
409	POS	131	NEG
419	POS	189	NEG
450	POS	189	NEG
362	POS	122	NEG
362	POS	127	NEG
360	POS	172	NEG
331	POS	183	NEG
333	POS	204	NEG
419	POS	206	NEG
331	POS	206	NEG
392	POS	40	NEG
383	POS	51	NEG
360	POS	73	NEG
368	POS	117	NEG
357	POS	152	NEG
391	POS	78	NEG
383	POS	111	NEG
347	POS	128	NEG
378	POS	112	NEG
394	POS	138	NEG
387	POS	199	NEG
333	POS	202	NEG
410	POS	147	NEG
379	POS	122	NEG
453	POS	137	NEG
413	POS	80	NEG
431	POS	16	NEG
414	POS	108	NEG
376	POS	139	NEG
412	POS	181	NEG
366	POS	184	NEG
348	POS	10	NEG
463	POS	181	NEG
350	POS	134	NEG
362	POS	213	NEG
416	POS	83	NEG
417	POS	115	NEG
334	POS	164	NEG
380	POS	123	NEG
380	POS	217	NEG
346	POS	177	NEG
418	POS	103	NEG
373	POS	208	NEG
349	POS	65	NEG

Table 2.2

durchschnittliche Absorption	Status	durchschnittliche Absorption	Status
399	POS	115	NEG
401	POS	167	NEG
331	POS	129	NEG
448	POS	48	NEG
.341	POS	123	NEG
473	POS	179	NEG
397	POS	223	NEG
426	POS	90	NEG
352	POS	165	NEG
368	POS	167	NEG
433	POS	116	NEG
342	POS	5	NEG
598	POS	58	NEG
334	POS	104	NEG
397	POS	158	NEG
358	POS	129	NEG
536	POS	120	NEG
512	POS	58	NEG
336	POS	118	NEG
389	POS	153	NEG
349	POS	179	NEG
433	POS	188	NEG
375	POS	146	NEG
		92	NEG
		119	NEG
		123	NEG
		208	NEG
		184	NEG
		105	NEG

Tabelle 3

durchschnittliche Absorption	Status	durchschnittliche Absorption	Status
669	POS	118	NEG
455	POS	33	NEG
684	POS	41	NEG
518	POS	268	NEG
572	POS	153	NEG
546	POS	137	NEG
453	POS	101	NEG
474	POS	121	NEG
668	POS	83	NEG
457	POS	74	NEG
588	POS	66	NEG
572	POS	78	NEG
813	POS	200	NEG
579	POS	191	NEG
496	POS	89	NEG
515	POS	120	NEG
589	POS	111	NEG
60	NEG	82	NEG
14	NEG	187	NEG
44	NEG	238	NEG
22	NEG	114	NEG
206	NEG	41	NEG
22	NEG	110	NEG
53	NEG	70	NEG
214	NEG	239	NEG
31	NEG	41	NEG
22	NEG	118	NEG
196	NEG		
98	NEG		
188	NEG		
259	NEG		
39	NEG		
179	NEG		
96	NEG		
169	NEG		
133	NEG		
204	NEG		
89	NEG		
152	NEG		
41	NEG		
102	NEG		
30	NEG		
111	NEG		
103	NEG		
105	NEG		
290	NEG		
172	NEG		
131	NEG		

LISTUNG DER SEQUENZEN

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) BEWERBER: Bergymann, Johanna & Preddie, Rick.E

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: "PRIONINE", HOCH SPEZIFISCHE ZIELMOLEKÜLE FÜR DEN NICHT-INVASIVEN PRÄSYMPTOMATISCHEN NACHWEIS, MAB-BASIERTE VAKZINE UND DIE KONTROLLE VON KREUZINFEKTIONEN VON NAHRUNGSMITTELN UND BLUTPRODUKTEN BEI TSE KRANKHEITEN.

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: DR. J. BERGMANN
(B) STRASSE: MÖRIKESTR. 22
(C) STADT: HAMBURG
(D) LAND:
(E) STAAT: GERMANY
(F) ZIP: 22587

(v) KOMPUTER-LESBARE FORM:

(A) MEDIUM ART: Floppy disk
(B) KOMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEGSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER:
(B) BUCHUNGSDATUM:
(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/AGENTUR INFORMATION:

(A) NAME: KEINER
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER:

(ix) TELEKOMMUNIKATION INFORMATION:

(A) TELEFON: (4940) 862-576

(B) TELEFAX: (4940) 862-596

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 81 Aminosäuren
(B) TYP: Protein
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(iv) ANTI-SENSE: NEIN
(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
(A) ORGANISMUS: Bovin

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:
(B) KLON: BSAS

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:1:

Met	Glu	His	Trp	Gly	Glu	Pro	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ser	Trp	
				5				10						15	
Arg	Gln	Pro	Leu	Ser	Thr	Ser	Gly	Arg	Gly	Trp	Leu	Gly	Ser	Ala	
				20				25						30	
Pro	Ser	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Trp	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	
				35				40						45	
Ala	Ser	Trp	Arg	Trp	Leu	Gly	Ser	Ala	Pro	Trp	Trp	Trp	Leu	Gly	
				50				55						60	
Thr	Ala	Thr	Trp	Trp	Trp	Arg	Leu	Gly	Ser	Arg	Trp	Try	Pro	Arg	
				65				70						75	
Ser	Met	Glu	Gln	Thr	Gln										

80

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 64 Aminosäuren
(B) TYP: Protein
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
(A) ORGANISMUS: Schaf
(vii) UNMITTELBARE QUELLE:
(B) KLON: SCRAPAS

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:2:

Met Glu His Trp Gly Glu Pro lie Pro Gly Thr Gly Gln Ser Trp
5 10 15

Arg Gln Prp Leu Pro Thr Ser Gly Arg Gly Trp Leu Gly Ser Ala
20 25 30

Pro Trp Arg Trp Leu Gly Pro Thr Ser Trp Arg Trp Leu Gly Ser
35 40 45

Ala Pro Trp Trp Trp Leu Gly Thr Ala Thr Trp Trp Trp Arg Leu
50 55 60

Gly Ser Arg Trp

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:3:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 65 Aminosäuren

(B) TYP: Protein

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:

(B) KLON: CJAS

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:3:

Met Glu His Trp Gly Gln Pro Ile Pro Gly Ala Gly Gln Pro Trp
5 10 15

Arg Gln Pro Leu Pro Thr Ser Gly Arg Trp Trp Leu Gly Ala Ala
20 25 30

Ser Trp Trp Trp Leu Gly Ala Ala Ser Trp Trp Trp Leu Gly Ala
35 40 45

Ala Pro Trp Trp Trp Leu Gly Ser Arg Arg Trp His Pro Gln Ser
50 55 60

Val Glu Gln Ala Glu
65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:4:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 52 Aminosäuren

(B) TYPE: protein

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Maus

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:

(B) KLON: MPAS

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID NO:4:

Met	Gly	Ala	Ala	Gly	Asp	Asn	Leu	Met	Val	Val	Val	Gly	Val	Ser
				5				10					15	

Pro	Met	Ala	Val	Asp	Gly	Ala	Lys	Glu	Gly	Val	Pro	Ile	Ile	Ser
				20				25					30	

Gly	Thr	Ser	Pro	Ala	Asn	Gln	Lys	Pro	Thr	Ser	Ser	Ile	Trp	Gln
				35				40					45	

Gly	Leu	Arg	Gln	Leu	Gly	Gln
			50			

(2) INFORMATION ZU SEQ ID N0:5:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:

(A) LÄNGE: 39 Aminosäuren

(B) TYP: Protein

(D) TOPOLOGie: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Hamster

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:

(B) KLON: HAMPAS

(xi) BESCHREIBUNG DER SEUQNZ: SEQ ID NO:5:

```
Met Gly Thr Ala Pro Trp Trp Trp Leu Gly Thr Thr Ser Trp Trp
 5                  10                  15

Trp Leu Gly Ser Ala Pro Trp Trp Trp Leu Gly Ser Arg Arg Trp
 20                  25                  30

His Pro Gln Ser Val Glu Gln Ala Gln
 35
```

Patentansprüche

1. Ein Proteinmolekül, frei von natürlichen Kontaminationen, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus BSAS, SCRAPAS, CJAS, MPAS und HAMPAS, deren Sequenzen die SEQ ID NR: 1, SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 3, SEQ ID NR: 4 und SEQ ID NR: 5 sind.

2. Ein Antikörper spezifisch für entweder BSAS, SCRAPAS, CJAS oder HAMPAS, deren Sequenzen die SEQ ID NR: 1, SEQ ID NR: 2, SEQ ID NR: 3, SEQ ID NR: 4 und SEQ ID NR: 5 sind.

3. Ein Antikörper von Anspruch 2, worin der Antikörper durch Immunisierung eines geeigneten Tieres mit Polypeptid-Domänen von BSAS oder SCRAPAS oder CJAS oder HAMPAS hergestellt ist.

4. Ein Antikörper von Anspruch 2 mit Spezifität für entweder BSAS, SCRAPAS oder CJAS, worin besagter Antikörper endogen durch entweder eine Kuh, ein Schaf oder einen Menschen produziert wird.

5. Ein Antikörper oder ein Antikörper-Fragment oder einkettige Antikörper, oder Kombinationen von diesen, fähig, spezifisch entweder an BSAS, SCRAPAS oder an CJAS zu binden, für den Gebrauch zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (TSE) bei Menschen oder bei Tieren.

6. Der Gebrauch eines Antikörpers oder eines Antikörper-Fragmentes oder eines einkettigen Antikörpers, oder von Kombinationen von ihnen, fähig, spezifisch entweder an BSAS, SCRAPAS oder an CJAS zu binden, für die Herstellung eines Medikaments zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von TSE bei Menschen oder Tieren.

7. Ein Antikörper wie definiert in Anspruch 5 für den Gebrauch wie definiert in Anspruch 6, worin der Antikörper ein monospezifischer polyklonaler Antikörper oder ein monoklonaler Antikörper oder ein rekombinanter Antikörper oder ein humanisierter Antikörper ist.

8. Eine Methode zur Diagnose oder präsymptomatischen Diagnose von TSE bei Menschen oder Tieren, die den Nachweis eines Proteins wie definiert durch SEQ ID NR: 1, SEQ ID NR: 2 oder SEQ ID NR: 3 in einer Gewebe- oder Körperflüssigkeitsprobe umfasst.

9. Eine Methode zur Diagnose oder präsymptomatischen Diagnose von TSE bei Menschen oder Tieren, die den Nachweis eines Antikörpers mit Spezifität für jeweils eines der in SEQ ID NR: 1, SEQ ID NR: 2 oder SEQ ID NR: 3 definierten Proteine in einer Probe umfasst.

10. Ein Antikörper wie definiert in Ansprüchen 5 oder 7, oder der Gebrauch wie definiert in Ansprüchen 6 oder 7, oder eine Methode wie definiert in Ansprüchen 8 oder 9, worin die TSE bovine spongiforme Enzephalophathie (BSE), Skrapie oder Creutzfeldt-Jakob Syndrom (CJS) ist.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

a

M E H W G E P I P R T G Q S W R Q P L S T S G R G W L G
S A P S R W L G P A S W R W L G P A S W R W L G S A P W
W W L G T A T W W W R L G S R W Y P R S M E Q T Q

b

M E H W G E P I P G T G Q S W R Q P L P T S G R G W L G S
A P W R W L G P T S W R W L G S A P W W W L G T A T W W W
R L G S R W

c

M E H W G Q P I P G A G Q P W R Q P L P T S G R W W L G A
A S W W W L G A A S W W W L G A A P W W W L G S R R W H P
Q S V E Q A E

d

M G A A G D N L M V V V G V S P M A V D G A K E G V P I I
S G T S P A N Q K P T S S I W Q G L R Q L G Q

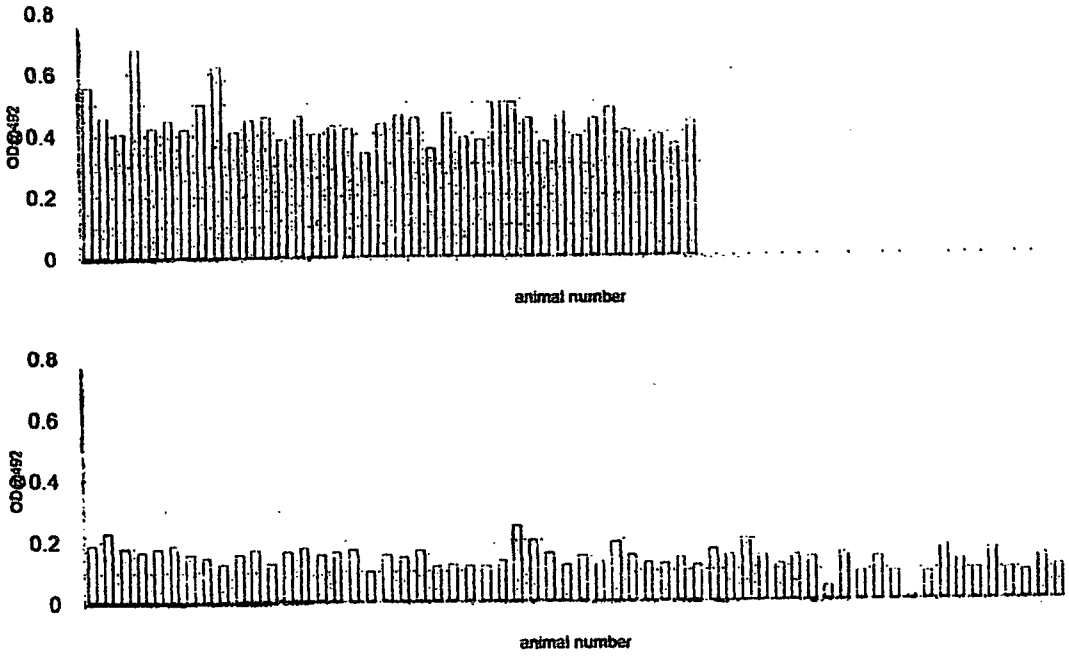
e

M G T A P W W W L G T T S W W W L G S A P W W W L G S R R
W H P Q S V E Q A Q

FIG 2

BSAS	**RLGSRWYPRSMEEQTQ**
SCRAPAS	**PLPTSGRGWLGSAPWR**
CJAS	**GSRRWHPQSVEQAE**
HAMPAS	**RRWHPQSVEQAQ**
MPAS	**SPMVDGAKEGVP**

Fig 3a



upper = positive
lower = negative

FIG. 3b

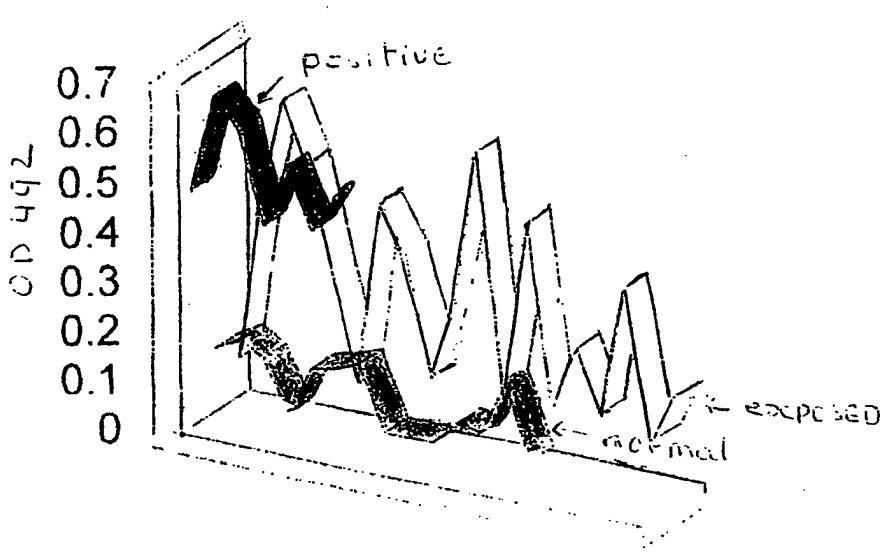
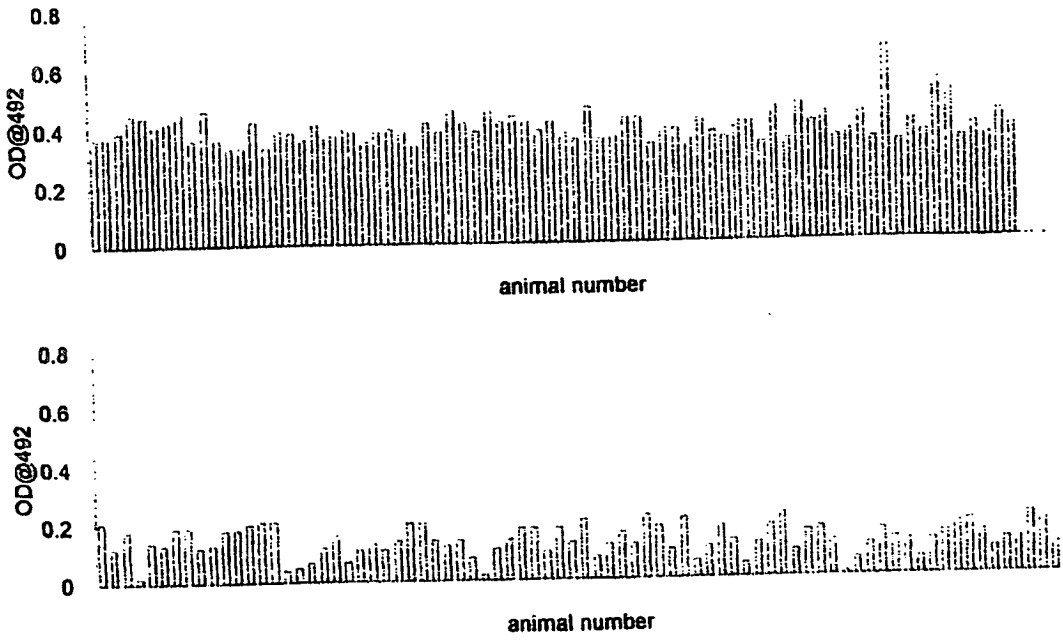


FIG 3C



upper = positive
lower = negative

Fig 3d

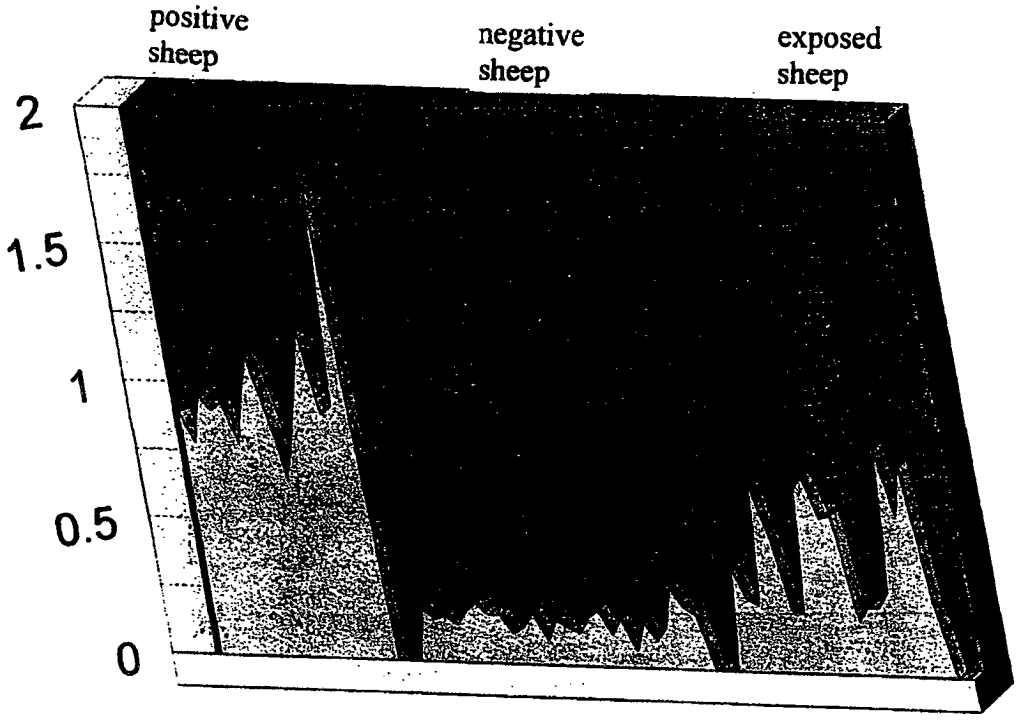


Fig 3e

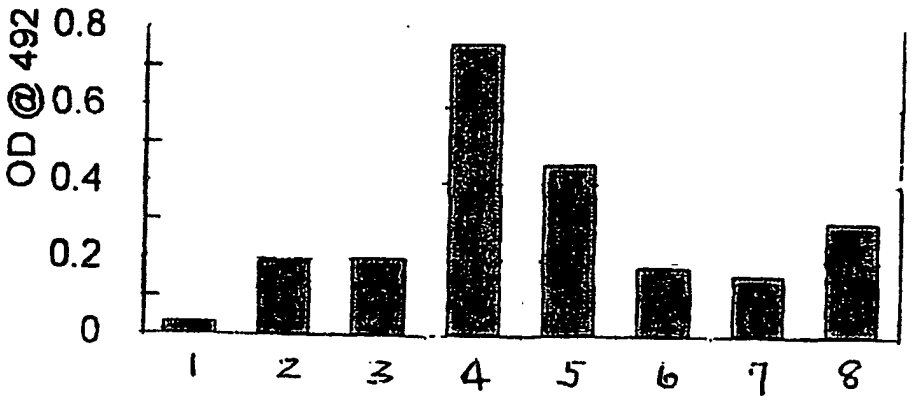


FIG 3f

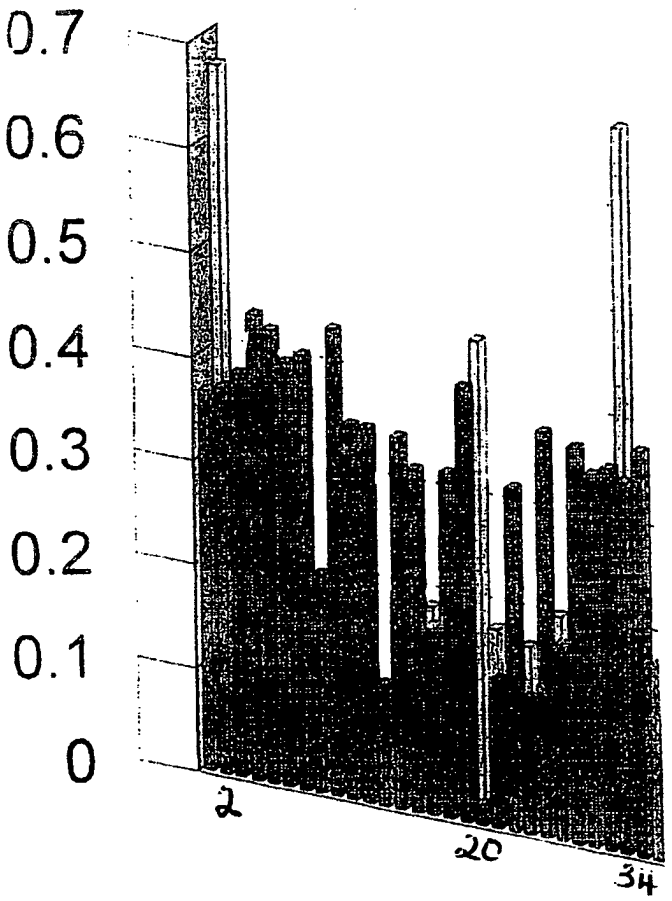
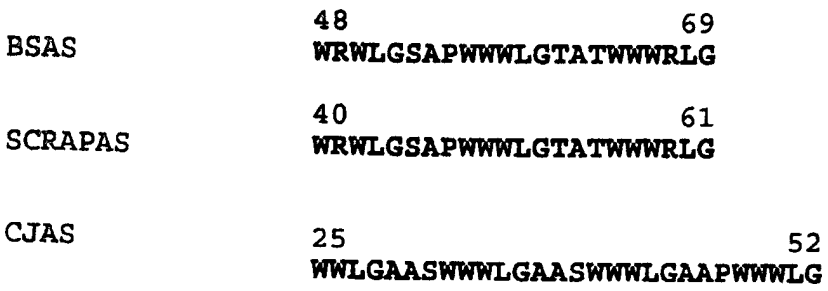
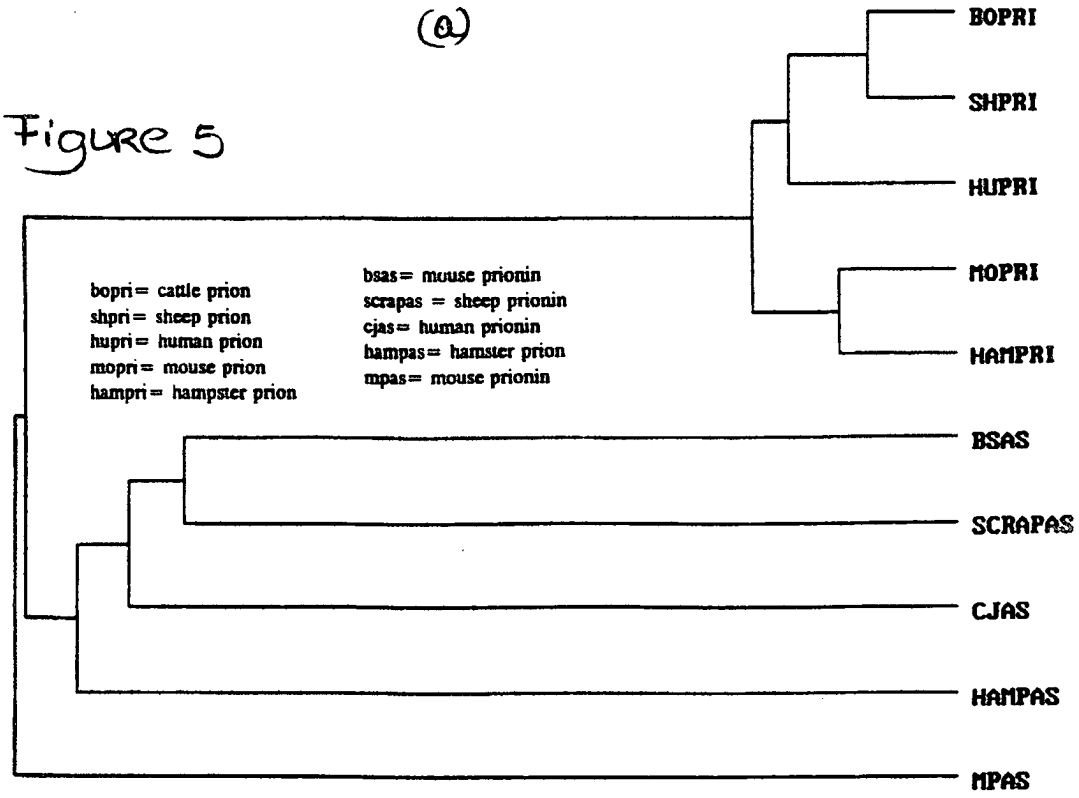


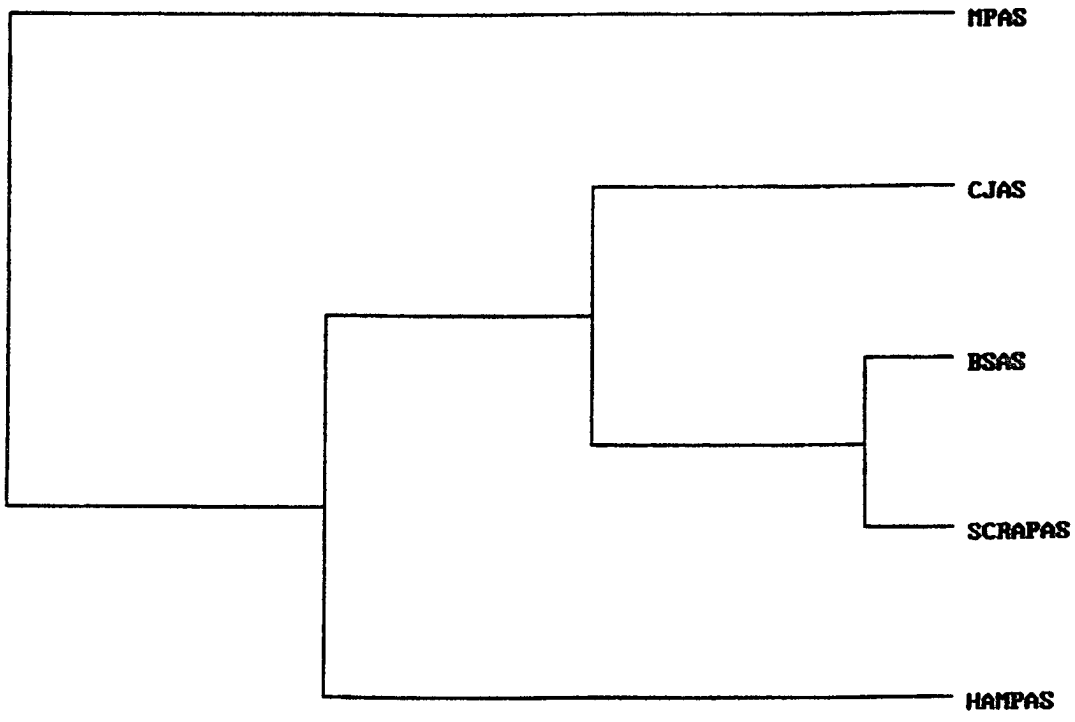
Figure 4


48
69
BSAS
WRWLGSAPWWWLGTATWWWRLG
40
61
SCRAPAS
WRWLGSAPWWWLGTATWWWRLG
CJAS
25
52
WWLGAASWWWLGAASWWWLGAAPWWWLG

(a)

Figure 5


BOPRI
SHPRI
HUPRI
MOPRI
HAMPRI
BSAS
SCRAPAS
CJAS
HAMPAS
MPAS
bopri= cattle prion
shpri= sheep prion
hupri= human prion
mopri= mouse prion
hampri= hampster prion
bsas= mouse prionin
scrapas = sheep prionin
cjas= human prionin
hampas= hamster prion
mpas= mouse prionin


MPAS
CJAS
BSAS
SCRAPAS
HAMPAS

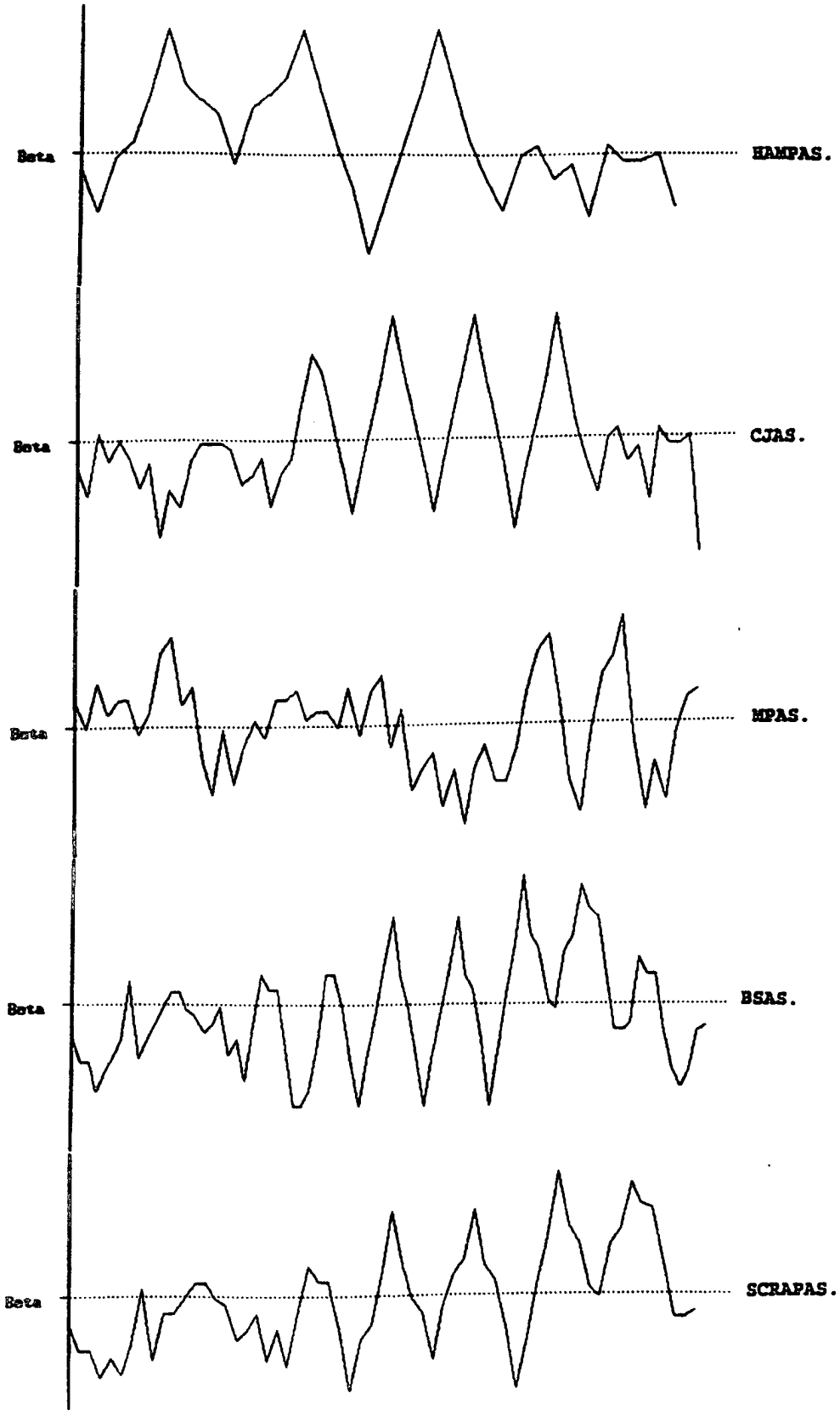



Figure 5(b)