

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00811803.5

A61K 39/00
A61K 39/40 A61K 39/395
A61K 38/00 A61K 38/06
G01N 33/53 C12N 5/06
C07K 16/00

[43] 公开日 2002 年 9 月 18 日

[11] 公开号 CN 1370078A

[22] 申请日 2000.6.23 [21] 申请号 00811803.5

[30] 优先权

[32] 1999.6.23 [33] US [31] 60/140,634

[86] 国际申请 PCT/US00/17455 2000.6.23

[87] 国际公布 WO00/78344 英 2000.12.28

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.19

[71] 申请人 卡普利昂药品公司

地址 加拿大魁北克省

[72] 发明人 N·R·卡斯曼 E·帕拉米蒂奥蒂斯
J·斯伦-乌萨基维茨 A·哈希哈特
M·皮纳德 T·劳顿

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成

权利要求书 6 页 说明书 55 页 附图页数 16 页

[54] 发明名称 朊病毒蛋白肽及其应用

[57] 摘要

总的来讲本发明的特征在于 PrP^{Sc} 特异性抗体及其诊断、治疗和净化用途。本发明的特征还在于可用作制备 PrP^{Sc} 特异性抗体的免疫原以及用作治疗朊病毒病治疗药物的合成肽。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

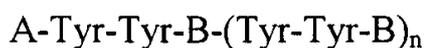
1. 一种抗体或其片段，该抗体或其片段以高结合亲和力与哺乳动物 PrP^{Sc} 的 YYX 表位结合。
- 5 2. 权利要求 1 的抗体，其中所述抗体基本上不结合 PrP^C。
3. 权利要求 1 的抗体，其中所述抗体与哺乳动物 PrP^{Sc} 的 YYR 表位结合。
4. 权利要求 1 的抗体，其中所述抗体是针对 PrP^{Sc} 的 YYR 表位产生的多克隆抗体。
- 10 5. 权利要求 4 的抗体，其中所述 YYX 表位是 CYR (SEQ ID NO: 32) 的组成部分。
6. 权利要求 1 的抗体，其中所述抗体是针对 PrP^{Sc} 的 YYR 表位产生的单克隆抗体。
7. 权利要求 6 的抗体，其中所述 YYR 表位是 CYYRYYRYY (SEQ ID NO: 33) 的组成部分。
- 15 8. 权利要求 1 的抗体，其中所述抗体是 IgG、IgM、IgE、IgD 或 IgA。
9. 权利要求 1 的抗体，其中所述抗体片段是 Fab 片段或 Fv 片段。
10. 一种产生单克隆抗体的杂交瘤细胞系，所述单克隆抗体以高结合亲和力与哺乳动物 PrP^{Sc} 的 YYX 表位结合。
- 20 11. 权利要求 10 的杂交瘤，其中所述抗体基本上不结合 PrP^C。
12. 权利要求 10 的杂交瘤细胞系，其中所述抗体与哺乳动物 PrP^{Sc} 的 YYR 表位结合。
13. 权利要求 12 的杂交瘤细胞系，其中所述 YYR 表位是 CYYRYYRYY (SEQ ID NO: 33) 的组成部分。
- 25 14. 一种组合物，该组合物包含权利要求 1-9 中任一项的抗体。
15. 权利要求 14 的组合物，其中所述组合物还包含一种载体。
16. 权利要求 14 的组合物，其中所述组合物为治疗组合物。

17. 一种免疫试验试剂盒,该试剂盒包括权利要求 1-9 中任一项的抗体以及检测所述抗体的方法。
18. 一种用于检测生物样品中的 PrP^{Sc} 的方法,该方法包括以下步骤:
- 5 (a) 在允许权利要求 1-9 的抗体和 PrP^{Sc} 形成复合物的条件下,使所述生物样品与所述抗体接触; 和
- (b) 检测所述复合物,存在所述复合物说明所述生物样品中存在 PrP^{Sc}。
19. 权利要求 18 的方法,其中所述抗体基本上不结合 PrP^C。
- 10 20. 权利要求 18 的方法,其中所述抗体是多克隆抗体或其片段。
21. 权利要求 18 的方法,其中所述抗体是单克隆抗体或其片段。
22. 权利要求 18 的方法,其中所述生物样品包括组织或细胞、组织或细胞提取物、体液或活检组织。
23. 权利要求 18 的方法,其中所述 PrP^{Sc} 来自人、家畜或宠物。
- 15 24. 权利要求 18 的方法,其中采用 ELISA、RIA、蛋白质印迹法、免疫沉淀法或流式细胞术检测所述复合物。
25. 一种用于治疗或预防哺乳动物 PrP^{Sc} 病的方法,该方法包括给予所述哺乳动物用药学上可接受的载体配制的有效量的权利要求 1-9 的抗体。
- 20 26. 一种包含 YYX、YYR、YYD 或 YYQ 氨基酸序列的肽,所述肽具有 PrP^{Sc} 抗原性。
27. 权利要求 26 的肽,其中所述肽由 18 个或少于 18 个氨基酸组成。
28. 权利要求 26 的肽,其中所述肽由 12 个或少于 12 个氨基酸组
- 25 成。
29. 权利要求 26 的肽,其中所述肽由 8 个或少于 8 个氨基酸组成。
30. 权利要求 26 的肽,其中所述肽由 5 个或少于 5 个氨基酸组成。
31. 权利要求 26 的肽,其中所述肽与一种免疫原性载体融合。

32. 权利要求 26 的肽，其中所述免疫原性载体是血清清蛋白、卵清蛋白、匙孔蛾血蓝蛋白、8map 或溶菌酶。

33. 权利要求 26 的肽，其中所述肽是具有氨基酸序列 YYR 的三肽。

5 34. 一种具有下式的合成肽：



其中 A 为任何氨基酸或者不存在；

其中 B 为任何氨基酸或者不存在；和

其中 n 为 0-10，包括 0 和 10。

10 35. 权利要求 34 的肽，其中 A 和 B 中的至少一个不为 Tyr。

36. 权利要求 34 的肽，其中 A 或 B 选自 Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp。

15 37. 权利要求 34 的肽，其中所述肽为 A-Tyr-Tyr-Arg (SEQ ID NO: 12)或其药学上可接受的盐。

38. 权利要求 34 的肽，其中所述肽为 A-Tyr-Tyr-Gln (SEQ ID NO: 13)或其药学上可接受的盐。

39. 权利要求 34 的肽，其中所述肽为 A-Tyr-Tyr-Asp (SEQ ID NO: 14)或其药学上可接受的盐。

20 40. 权利要求 34 的肽，其中所述肽与一种免疫载体连接。

41. 一种具有下式的合成肽：



其中 A 为任何氨基酸或者不存在；

其中 B 为任何氨基酸或者不存在；

25 其中 C 为任何氨基酸或者不存在；

其中 D 为任何氨基酸或者不存在；和

其中 n 为 0-10，包括 0 和 10。

42. 权利要求 41 的肽，其中 A、B、C 和 D 中的至少一个不为 Tyr。

43. 权利要求 41 的肽，其中 A、B、C 或 D 选自 Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp。

44. 权利要求 41 的肽，其中 A 为 Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp，而 B、C 和 D 选自 Arg、Gln、Asp、Glu、Phe 或 Trp。

45. 权利要求 41 的肽，其中所述肽为 A-Tyr-Tyr-Arg-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Tyr (SEQ ID NO: 25)或其药学上可接受的盐。

46. 权利要求 41 的肽，其中所述肽与一种免疫载体连接。

47. 一种用于产生以高结合亲和力与哺乳动物 PrP^{Sc} 结合的抗体的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 提供一种朊病毒蛋白肽，该蛋白肽包含具有两个或两个以上氨基酸侧链的可及表位；

(b) 用步骤(a)的所述朊病毒蛋白肽免疫哺乳动物；和

(c) 从所述哺乳动物组织或从用所述组织制备的杂交瘤中纯化所述抗体。

48. 权利要求 47 的方法，其中所述抗体基本上不结合 PrP^C。

49. 权利要求 47 的方法，其中所述抗体是多克隆抗体或其片段。

50. 权利要求 47 的方法，其中所述抗体是单克隆抗体或其片段。

51. 权利要求 47 的方法，其中所述朊病毒蛋白肽包含 YYX 氨基酸序列。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述朊病毒蛋白肽包含 YYR 或 YYQ 或 YYD 氨基酸序列。

53. 权利要求 47 的方法，其中所述朊病毒蛋白肽由 18 个或少于 18 个氨基酸组成。

54. 权利要求 47 的方法，其中所述朊病毒蛋白肽由 12 个或少于 12 个氨基酸组成。

55. 权利要求 47 的方法，其中所述肽由 8 个或少于 8 个氨基酸组

成。

56. 权利要求 47 的方法，其中所述肽由 5 个或少于 5 个氨基酸组成。

57. 权利要求 47 的方法，其中所述朊病毒蛋白肽包括权利要求 34 或权利要求 41 的肽。

58. 一种抗 PrP^{Sc} 病的疫苗，该疫苗包含权利要求 26、34 或 41 中任一项的肽和一种药学上可接受的载体。

59. 一种针对 PrP^{Sc} 病免疫哺乳动物的方法，该方法包括给予有效量的权利要求 58 的疫苗。

60. 一种组合物，该组合物包含权利要求 26-46 中任一项的肽。

61. 权利要求 60 的组合物，其中所述组合物为治疗组合物。

62. 一种用于净化生物样品中的 PrP^{Sc} 的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 用权利要求 1-9 中任一项的抗体处理生物样品，其处理时间足以允许形成抗 PrP^{Sc} 抗体: PrP^{Sc} 复合物；和

(b) 从所述生物样品中回收所述抗 PrP^{Sc} 抗体: PrP^{Sc} 复合物。

63. 权利要求 62 的方法，其中所述生物样品为组织、体液或器官。

64. 权利要求 62 的方法，其中用所述抗体灌注所述生物样品。

65. 一种抑制生物样品中的 PrP^{Sc} 的方法，该方法包括：

用权利要求 1-9 中任一项的抗体处理生物样品，其处理时间足以允许形成抗 PrP^{Sc} 抗体: PrP^{Sc} 复合物。

66. 权利要求 65 的方法，其中所述生物样品为体液、组织或器官。

67. 权利要求 65 的方法，其中用所述抗体灌注所述生物样品。

68. 一种鉴定治疗朊病毒病的候选化合物的方法，该方法包括：

(a) 测定在试验化合物存在下抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；和

(b) 测定在所述试验化合物不存在时所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；

其中在所述试验化合物存在下所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水

平比在所述试验化合物不存在时所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平低，表明所述试验化合物是用于治疗朊病毒病的潜在治疗化合物。

69. 权利要求 68 的方法，其中所述抗 YYX 抗体是抗 YYR 抗体、抗 YYD 抗体或抗 YYQ 抗体。

5 70. 权利要求 68 的方法，其中所述朊病毒病影响人类、家畜或宠物。

71. 权利要求 68 的方法，其中所述朊病毒病影响人类、牛、绵羊或山羊。

72. 权利要求 68 的方法，其中所述试验化合物是一种小分子。

10 73. 一种化合物，该化合物为按照权利要求 68 的方法鉴定的化合物。

74. 一种鉴定用于诊断朊病毒病的化合物的方法，该方法包括：

(a) 测定在试验化合物存在下抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；和

15 (b) 测定在所述试验化合物不存在时所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；

其中在所述试验化合物存在下所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平比在所述试验化合物不存在时所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平低，表明所述试验化合物是用于诊断朊病毒病的潜在化合物。

20 75. 权利要求 74 的方法，其中所述抗 YYX 抗体是抗 YYR 抗体、抗 YYD 抗体或抗 YYQ 抗体。

76. 权利要求 74 的方法，其中所述朊病毒病影响人类、家畜或宠物。

77. 权利要求 74 的方法，其中所述朊病毒病影响人类、牛、绵羊或山羊。

25 78. 权利要求 74 的方法，其中所述试验化合物是一种小分子。

79. 一种化合物，该化合物是按照权利要求 74 的方法鉴定的化合物。

80. 一种抗体，该抗体为按照权利要求 47 的方法产生的抗体。

说明书

朊病毒蛋白肽及其应用

5

发明背景

本发明涉及 PrP^{Sc}-特异性抗体以及用来产生所述抗体的肽。这些抗体适用于检测样品中的 PrP^{Sc} 以及纯化 PrP^{Sc}。另外，本发明涉及用于检测 PrP^{Sc} 的诊断辅助剂、含有或模拟 PrP^{Sc}-特异性构象表位的药物以及净化朊病毒的方法。

10

朊病毒是与神经变性性综合征相关的传染因子，所述综合征的特征为海绵状变化(例如通常主要在灰质中出现的脑微泡)、神经元细胞丧失、与神经元丧失不成比例的星形胶质细胞增生、以及有时在脑中的离散性病斑内累积异常淀粉样蛋白。朊病毒病神经变性可能与其它更常见的神经变性性综合征(例如早老性痴呆(Alzheimer's Disease)、肌萎缩性侧索硬化和帕金森病(Parkinson's disease))的某些基本机制相同。

15

20

传播这些疾病的病原明显不同于病毒和类病毒，因为在感染材料中一直没有重复检测到核酸组分的化学或物理学证据(Prusiner, *Science*, 216: 136-144, 1982)。研究朊病毒和由朊病毒引起的疾病的一个主要步骤是发现并纯化称为朊病毒蛋白(PrP)的蛋白质(Bolton 等, *Science*, 218: 1309-11, 1982; Prusiner 等, *Biochemistry*, 21:6942-50, 1982; McKinley 等, *Cell*, 35:57-62)。当采用蛋白酶 K 消化进行纯化时，在罹患瘙痒病的仓鼠脑中发现了一种 27-30 kD 蛋白酶抗性蛋白，并将其称为 PrP 27-30，后来发现是一种 PrP^{Sc} 片段(Bolton 等, *Science*, 218: 1309-1311, 1982)。

25

按照朊病毒假说，朊病毒感染性在于 PrP^{Sc}。PrP^{Sc} 至少与感染性密切相关，因此看来 PrP^{Sc} 是朊病毒感染的可靠替身。PrP^{Sc} 是称为 PrP^C 的宿主编码细胞蛋白的构象变体(Oesch 等, *Cell*, 40:735-746,

1985), 所述 PrP^C 是连接糖基磷脂酰肌醇(GPI)的细胞表面蛋白, 分子量为 33-35 kD。

已从正常脑中分离出 PrP^C, 并发现 PrP^C 对蛋白酶敏感, 与产生瘙痒病的活性无关(Bendheim 等, *Ciba Found. Symp.* 164-177, 1988)。

5 按照朊病毒学说, PrP^C 自动催化转换成 PrP^{Sc} (Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 95:13363-83, 1998)。最近, 据报道 PrP^C 可以在体外通过 PrP^{Sc} 转变成蛋白酶抗性形式(Kocisko 等, *Nature*, 370:471-473, 1994)。PrP^C 是进化上保守的膜蛋白, 但其真正生物学功能或生理机能尚不了解。不含 PrP^C 的小鼠也可存活, 并且没有神经和身体障碍的明显表现
10 (Bueler 等, *Nature*, 356:577-582, 1992)。另外, 这些小鼠对朊病毒感染不敏感, 着重说明了 PrP 在反复感染性方面的中心重要性(Bueler 等, *Cell*, 73:1339-1347, 1993; Prusiner 等, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 90:10608-10612, 1993)。针对性研究 PrP 敲出(knockout)小鼠揭示突触功能障碍(Collinge 等, *Nature*, 370:295-297, 1994)以及睡眠调节改变
15 (Tobler 等, *J Neurosci.*, 17:1869-79)。此外, 已经显示 PrP^C 改变由伴刀豆凝集素 A 刺激诱导的 T 细胞活化(Cashman 等, *Cell* 61:185-192, 1990), 表明该蛋白质的功能作用。

朊病毒病是一组快速进行性、致死性、无药可治的神经变性性综合征。人类朊病毒病包括克罗伊茨费尔特-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease) (CJD), 该病存在散发性、医源性和家族性发病形式;
20 以及变异型 CJD(“vCJD”), 其可能原因是食用了污染牛海绵状脑病原的牛组织(参见综述 Cashman, *Can. Med. Assoc. J.* 157:1381-5, 1997)。CJD 偶尔也通过污染的尸体垂体激素、硬脑膜移植、神经外科仪器和角膜移植而在人类中传播(Brown 等, *Lancet* 340:24-7, 1992)。通过血及血制品传播 CJD 的潜在危险性已受到全球广泛关注。
25 此外, 与英国牛海绵状脑病(俗称疯牛病) (BSE)一样, 羊瘙痒病在北美是一种常见的在经济上重要的朊病毒相关疾病。根据英国农业、渔业和食品部的统计, 超过 4,347,380 头牛已经被销毁, 因为认为这

些牛可能携带疯牛病病原因子。据英国农业部估计，截止到2002年，疯牛病流行的总损失达到\$713亿(billion)。已经证实英国全国已有超过173,000头牛受到感染，然而无数的牛可能已经进入了未检测到的食品供应点。

5 另外，美国和加拿大现在已经实行 BSE 流行年和高峰年间居住在英国的个人供血者推迟供血。这样一种限制作为防止传播 vCJD 危险性的预防措施已被正式通过，从 1996 年至今，已有 60 多名英国人受此限制。加拿大血液服务中心(Canadian Blood Services)估计，从
10 曾经到过英国(*Montreal Gazette*, 1999 年 5 月 6 日)。补充许多新供血者来代替所失去的供血者，引起了各种关注。一种这样的关注是，新供血者的血液不安全，因为只对疾病例如肝炎和人免疫缺陷病毒进行过筛选。

15 因此，需要适用于大量筛选朊病毒感染的血液或组织的诊断方法。因此能够获得把 PrP^C 和 PrP^{Sc} 区分开来的抗体将在开发用于朊病毒感染的试验中具有重大价值。此外，需要预防和/或治疗朊病毒病的治疗药物。

发明概述

20 如本文所述，获得的证据证实 PrP 的 YYX 连续表位可用于产生 PrP^{Sc} 特异性抗体。具体地说，我们已经证明，利用根据 PrP 序列连续合成的短肽的免疫方案可产生 PrP^{Sc} 特异性高亲和力多克隆抗体和单克隆抗体。此外，也发现这类抗体对 PrP^C 缺乏可检测反应性。在一个实例中，根据从 PrP^C 构象变为 PrP^{Sc} 构象的分子建模分析，建模
25 分析预测所述蛋白质 PrP^{Sc} 同种型的分子表面的溶剂可及序列，从而选择了包括 YYR 序列的肽。

 因此，本发明的特征在于以高结合亲和力结合哺乳动物 PrP^{Sc} 连续 YYX 表位的表位特异性抗 PrP 抗体或其片段。所述抗体最好与哺

5 乳动物 PrP^{Sc} 的 YYR 表位、YYQ 表位或 YYD 表位结合。在优选的实施方案中，所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。这类抗体包括 IgG 抗体、IgM 抗体、IgE 抗体、IgD 抗体或 IgA 抗体，以及多种片段，例如 Fab 片段或 Fv 片段。这样的抗 PrP 抗体最好是针对特定 PrP^{Sc} 表位。另外，可以用与 PrP^{Sc} 结合的抗体定量测定任何标准诊断测定中的 PrP^{Sc}。

10 再一个相关方面，本发明的特征在于表位特异性抗 PrP 抗体在免疫学检测方法中的应用，以便诊断传染病特异性的朊病毒。如本文所述，可以用适当改造的 PrP 肽制备与 PrP^{Sc} 特异性反应的抗 PrP 抗体。本发明尤其涉及含有所述 PrP 肽和/或表位特异性抗 PrP 抗体的诊断辅助剂。另外，本发明涉及与疾病特异性的朊病毒蛋白选择性结合而不与正常朊病毒蛋白结合的抗体。

15 另一方面，本发明的特征在于具有序列酪氨酸-酪氨酸-精氨酸(YYR)的朊病毒蛋白肽。最好是，所述肽是与一种载体连接的三肽，使所述肽免疫原性更强，可制备高亲和力抗 PrP 抗体。本文介绍了这种三肽的合成。按照本发明，这类短肽(例如，YYR 三肽、YYQ 三肽或 YYD 三肽)为朊病毒蛋白 PrP^{Sc} 同种型存在、正常 PrP^C 同种型不存在和/或以允许抗体检测的方式在 PrP^{Sc} 中成簇的决定簇。例如，在所述三种朊病毒蛋白表位中的两种内含有 YYR 三肽；然而，该三肽以前没有将其鉴定为 PrP^{Sc} 免疫反应性的特异性基础。此外，这类序列在许多物种之间是高度保守的，所述物种包括但不限于牛、人、绵羊、小鼠和仓鼠(图 2)。

再一个方面，本发明还的特征在于具有下式的合成肽：

A-Tyr-Tyr-B-(Tyr-Tyr-B)_n (SEQ ID NO: 1-11)

25 其中 A 或者为任何氨基酸或者不存在；B 或者为任何氨基酸或者不存在；n 为 0-10(包括 0 和 10)。在优选的实施方案中，A 和 B 至少一个不为 Tyr。在其它优选的实施方案中，A 或 B 选自 Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、

Ser、Thr、Val 或 Trp。在其它优选的实施方案中，所述肽与免疫载体连接。这类肽包括但不限于 A-Tyr-Tyr-Arg (SEQ ID NO: 12); A-Tyr-Tyr-Gln (SEQ ID NO: 13); A-Tyr-Tyr-Asp (SEQ ID NO: 14); 或其任何药学上可接受的盐。

5 又一个方面，本发明的特征在于具有下式的合成肽：

A-Tyr-Tyr-B-C-Tyr-Tyr-D-Tyr-Tyr-(Tyr-Tyr-B)_n (SEQ ID NO: 15-24)

其中 A 或者为任何氨基酸或者不存在；B 或者为任何氨基酸或者不存在；C 或者为任何氨基酸或者不存在；D 或者为任何氨基酸或者不存在；n 为 0-10(包括 0 和 10)。在优选的实施方案中，A、B、C 和 D 中的至少一个不为 Tyr。在其它优选的实施方案中，A、B、C 或 D 选自 Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp。在另外优选的实施方案中，A 选自 Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val 或 Trp，而 B、C 和 D 选自 Arg、Gln、Asp、Glu、Phe 或 Trp。一种典型的肽包括但不限于 A-Tyr-Tyr-Arg-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Tyr (SEQ ID NO: 25)或其药学上可接受的盐。在其它的实施方案中，所述肽与免疫载体连接。

20 另一方面，本发明涉及具有 PrP^{Sc} 抗原性的合成朊病毒短肽(例如，3-10 个(包括 3 个和 10 个)氨基酸或 4-12 个(包括 4 个和 12 个)氨基酸)，所述朊病毒短肽包括一个或多个下列氨基酸残基：见于小鼠 PrP 的 T189-193 的苏氨酸四重复残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；小鼠 PrP 的 M128、M133 或 M153 氨基酸残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；小鼠 PrP 的 H186 氨基酸残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；小鼠 PrP 的 Q159、Q167、Q185 或 Q216 氨基酸残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；小鼠 PrP 的 N158 氨基酸残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；小鼠 PrP 的 M128、M133 或 M153 氨基酸残基或

人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；小鼠 PrP 的 L124 或 L129 氨基酸残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基；或者小鼠 PrP 的 I181 或 I183 氨基酸残基或人 PrP、绵羊 PrP、山羊 PrP 或牛 PrP 的相应氨基酸残基。

5 按照本领域已知的方法，可以通过化学合成制备按照本发明的肽。

 另外，按照本发明的 PrP 肽可以用来制备表位特异性抗 PrP^{Sc} 抗体。具体地说，本发明的肽具有高度纯物质的各种优点，并且适合于制备抗 PrP 抗体，所述抗 PrP 抗体可以例如在标准免疫测定(例如
10 免疫沉淀法、ELISA 和流式细胞术)中用于检测样品中的 PrP^{Sc}。按照本发明的 PrP 肽(例如，YYR)既可以用来制备表位特异性抗 PrP^{Sc} 多克隆抗体(抗血清)，又可以用来制备表位特异性抗 PrP 单克隆抗体。按照本领域已知的标准方法制备这些抗体，并且所述抗体最好与载体材料结合，以便用于产生抗体。

15 此外，可以合理设计或者从组合文库获得发挥 PrP^{Sc} 特异性暴露的 YYX 的化合物，所述组合文库模拟 YYX 与抗 YYX 抗体的相互作用。这些化合物可用于诊断朊病毒或者用作朊病毒病的治疗药物。

 另一方面，本发明的特征在于用于治疗 and 预防朊病毒病的药用制剂，所述药用制剂包含本发明的 PrP 肽或结构相关化合物、或多克
20 隆抗体或单克隆抗体和药用载体。这类药物含有按照本发明的 PrP 肽或表位特异性抗 PrP 抗体。

 如有需要，可以以药学上可接受的盐形式提供本发明的肽和抗体。优选盐的实例是与治疗学上可接受的下列酸的盐：有机酸，例如乙酸、乳酸、马来酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、苯
25 甲酸、水杨酸、甲磺酸、甲苯磺酸或扑酸(pamoic acid)；以及聚合酸，例如单宁酸或羧甲基纤维素；以及与无机酸的盐，所述无机酸例如氢卤酸(例如盐酸、硫酸或磷酸)。另外，以一种传统模式(例如，口服、胃肠外、经皮或经粘膜给药)，可以采用生物降解的生物相容性

聚合物的缓释制剂或通过使用胶粒、凝胶和脂质体将本发明的任何肽或抗体给予哺乳动物、尤其是人。

5 再一个方面，本发明的特征在于治疗或预防动物(例如人、牛、绵羊、猪、山羊、狗或猫)朊病毒病的方法。在一个优选的实施方案中，所述方法包括给予所述动物治疗有效量的一种表位特异性抗 PrP 抗体或 PrP 肽，所述表位特异性抗 PrP 抗体或 PrP 肽阻断 PrP^C 转换为 PrP^{Sc}、抑制 PrP^{Sc}:PrP^{Sc} 集合物的形成、或者阻断 PrP^C 补充 PrP^{Sc}。也可以用所述 PrP 肽免疫所述宿主，以通过刺激宿主产生 PrP^{Sc} 特异性抗体而抵抗朊病毒病。

10 在相关方面，本发明的特征在于用于检测生物样品中的 PrP^{Sc} 的方法和试剂盒。

再一个方面，本发明的特征在于用于净化生物样品中的 PrP^{Sc} 的方法和试剂盒。在一个优选的实施方案中，所述方法包括以下步骤：
15 (a) 用所述多克隆抗体或单克隆抗体(或其片段或类似物)处理生物样品，所述处理可形成抗体:PrP^{Sc} 复合物；和(b) 从所述生物样品中回收抗体:PrP^{Sc} 复合物。这种净化方法也可以包括应用抗体(或其片段或类似物)灌流生物样品，以去除或灭活 PrP^{Sc}。

另一方面，本发明的特征在于用于治疗朊病毒病的化合物的鉴定方法。所述方法包括以下步骤：
20 (a) 在试验化合物存在下，测定抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；和(b) 在所述试验化合物不存在时，测定抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；其中在所述试验化合物存在下所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平比在所述试验化合物不存在时所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平低，表明所述试验化合物是可用于治疗朊病毒病的潜在治疗化合物。最好是，所述抗 YYX 抗体为抗 YYR
25 抗体、抗 YYD 抗体或抗 YYQ 抗体。

另一方面，本发明的特征在于用于诊断朊病毒病的化合物的鉴定方法。所述方法包括以下步骤：
(a) 在试验化合物存在下，测定抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；和(b) 在所述试验化合物不存在时，测定

抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合；其中在所述试验化合物存在下所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平比在所述试验化合物不存在时所述抗 YYX 抗体与 PrP^{Sc} 的结合水平低，表明所述试验化合物是可用于诊断朊病毒病的潜在化合物。

5 在相关方面，本发明的特征在于按照任一前述方法鉴定的治疗化合物和诊断化合物。

“高结合亲和力”是指亲和常数小于 10 μ M、优选小于 1 μ M、更优选小于 100 nM、最优选小于 10 nM 的结合。

10 “朊病毒病”是指一组朊病毒介导的、快速进行性、致死性、无药可治的脑变性性疾病，包括但不限于人类中的克罗伊茨费尔特-雅各布病 (CJD)、变异型克-雅病、医源性克-雅病、家族性克-雅病、库鲁病(Kuru)、格施综合征(Gerstmann-Sträussler syndrome)和致死性家族失眠症(Prusiner, *Science* 252:1515-1522, 1991)、羊瘙痒病和牛海绵状脑病、以及最近描述的其它反刍动物和猫朊病毒病。

15 “朊病毒病的治疗”是指减轻、预防、稳定或延迟与朊病毒病相关的任何症状、尤其是导致海绵状变化、神经元细胞丧失、星形胶质细胞增生、PrP^{Sc} 蛋白的累积、痴呆或死亡的朊病毒病改变的发生的能力。

20 “纯化抗体”是指不含所述蛋白质和与其天然结合的天然有机分子的至少 60% (重量)的抗体。所述制剂中的抗体，例如 YYX 特异性抗体(例如 YYR 特异性抗体、YYQ 特异性抗体或 YYD 特异性抗体)优选为至少 75% (重量)、更优选至少 90% (重量)、最优选至少 99% (重量)。例如采用底物结合 YYX 的亲和层析和标准技术可以获得纯化抗体。

25 “YYX”是指具有序列酪氨酸-酪氨酸-X 的肽，其中 X 为任何氨基酸。“YYR”是指具有序列酪氨酸-酪氨酸-精氨酸的肽。“YYQ”是指具有序列“酪氨酸-酪氨酸-谷氨酰胺”的肽。“YYD”是指具有序列“酪氨酸-酪氨酸-天冬氨酸”的肽。

“治疗组合物”是指适合于给予动物的组合物，所述动物例如哺乳动物(例如人)、家畜(例如牛、山羊、猪或绵羊)或宠物。

“小分子”是指分子量小于或等于 10,000 道尔顿、优选小于或等于 1000 道尔顿、最优选小于或等于 500 道尔顿的化合物。

5 根据以下描述的优选实施方案和权利要求书，本发明的其它特征和优点将是显而易见的。

附图简述

10 图 1A 为显示小鼠重组 PrP^C 的 pH 相关性构象变化的圆二色性图。在 pH 为 7.0 和 3.0 时 PrP^C 的远紫外线圆二色光谱学显示分子椭圆率改变与在生理 pH 下主要为 α 螺旋构象变为在低 pH 下主要为 β 折叠构象一致。

15 图 1B 为显示小鼠重组 PrP^C 中的芳族环取向的 pH 相关性变化的荧光光谱曲线图。酪氨酸侧链和色氨酸侧链的特异性荧光变化与用于溶剂可及性的相反倾向一致，因为 pH 被降低。

20 图 2 显示以下 PrP 氨基酸序列的序列比对：牛(SEQ ID NO: 26)、人(SEQ ID NO: 27)、绵羊(SEQ ID NO: 28)、小鼠(SEQ ID NO: 29)和仓鼠(SEQ ID NO: 30)。方框突出显示在氨基酸 160-162 和 173-175 上的两个高度保守的 YYR 序列以及在氨基酸 235-237 上的 YYQ/D 序列(按照牛的序列)。

图 3 显示小鼠 PrP^C 的 NMR 溶液结构，突出显示了 YYR 序列和 YYD 序列的位置和取向。没有 YYR 基序显示芳族环对分子表面的所谓垂直串联取向。

25 图 4 为示意图，显示基于 PrP^C 构象变为 PrP^{Sc} 构象的酪氨酸环取向改变的表位产生。如图 3 所示，PrP^C 中两个 YYR 基序的取向使得在所述分子内的一个酪氨酸环为溶剂可及的，而另一个酪氨酸环为溶剂不可及的。(第三个 YY 基序(在该图中未显示)的取向使得所述酪氨酸环不能相互作用)。在 PrP 构象转换后，一个或多个 YYX 基序

中的酪氨酸环以垂直串联取向存在于分子表面，所述取向通过 π -堆积(pi-stacking)作用稳定。末端平面精氨酸(或在第三个基序中的天冬氨酸/谷氨酰胺)可以加强稳定酪氨酸-酪氨酸的相互作用。

5 图 5 显示采用缀合对照蛋白的磁珠的小鼠 PrP^{Sc} 的免疫沉淀(IP)。将与磁珠(泳道 9-12)或偶联 BSA 的磁珠(泳道 5-8)的非区别性 PrP 单克隆抗体 6H4 与正常(N)或 ME7 瘙痒病感染(Sc)的小鼠脑匀浆进行反应。在进行免疫沉淀之前用蛋白酶 K 处理(+)或不用蛋白酶 K 处理(-)所述脑匀浆。泳道 1-4 (Load)显示与用于免疫沉淀中的相同脑匀浆量的直接蛋白质印迹。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还原条件下分辨所述
10 免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后，再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。

图 6 显示采用与抗 YYR 多克隆抗体 pAbC2 缀合的磁珠的小鼠 PrP^{Sc} 的免疫沉淀(IP)。将偶联 pAbC2 的磁珠(泳道 9-12)或与 BSA 偶联的磁珠(磁珠，泳道 5-8)与正常(N)或 ME7 瘙痒病感染(Sc)的小鼠脑匀浆进行反应。所述脑匀浆用蛋白酶 K 进行处理(+)或不用蛋白酶 K 进行处理(-)，然后进行免疫沉淀。用于所述免疫沉淀中的相同脑匀浆量的直接蛋白质印迹在泳道 1-4 (Load)中显示。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还原条件下分辨所述免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后，再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。
15

20 图 7 显示采用与 pAbC2 兔多克隆抗体缀合的磁珠的牛 PrP^{Sc} 的免疫沉淀。用 6H4 (泳道 1 和 2)或 pAbC2 偶联的磁珠(泳道 3 和 4)免疫沉淀正常或 BSE 脑匀浆。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还原条件下分辨所述免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后，再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。

25 图 8 显示采用与抗 YYR p165 山羊多克隆抗体缀合的磁珠的小鼠 PrP^{Sc} 的免疫沉淀。将偶联抗体的磁珠与正常(N)或 ME7 瘙痒病感染(Sc)的小鼠脑匀浆进行反应。瘙痒病小鼠脑匀浆样品用蛋白酶 K 进行处理(+)或不用蛋白酶 K 进行处理(-)，然后进行免疫沉淀。泳道 1-3 (p165)

亲和纯化的山羊 pAb; 泳道 4-6 (IgG)山羊总 IgG; 泳道 7-9 (BSA) 缀合 BSA 的磁珠; 泳道 10-12 (6H4)非区别性抗 PrP 单克隆抗体 6H4。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还原条件下分辨所述免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后, 再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。

5

图 9 显示采用与抗 YYR 小鼠单克隆抗体缀合的磁珠的小鼠 PrP^{Sc} 的免疫沉淀。将偶联单克隆抗体的磁珠与正常(N)或 ME7 瘙痒病感染 (Sc)的小鼠脑匀浆进行反应。该瘙痒病样品用蛋白酶 K 进行处理(+)或不用蛋白酶 K 进行处理(-), 然后进行免疫沉淀。1A4 (泳道 1-3)、2C (泳道 4-6)和 6B1 (泳道 7-9)为瘙痒病反应性单克隆抗体。19E (泳道 10-12)为不与 PrP 反应的单克隆抗体。6H4 (泳道 13-15)为不能将 PrP^C 和 PrP^{Sc} 区分开的抗 PrP 单克隆抗体。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还原条件下分辨所述免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后, 再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。在泳道 10-12 (相当于 19E) 中, 抗体-磁珠缀合物的免疫球蛋白重链(45 kDa)和轻链(30 kDa)分别与 PrP 二聚体和一种 PrP 糖基化变体共迁移。

10

15

图 10 显示抗体-磁珠缀合物的免疫球蛋白轻链和重链渗漏。将单克隆抗体 1A4 和 6B1 磁珠缀合物加工后, 在脑匀浆不存在时用于 SDS PAGE 和蛋白质印迹分析。对于这两种抗体-磁珠缀合物均在非还原条件下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 而对于未缀合的 6H4 单克隆抗体在还原条件下进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。印迹用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物显色。

20

图 11 显示采用与抗 YYR 1A4 单克隆抗体偶联的磁珠的多个小鼠 PrP^{Sc} 样品的免疫沉淀。将 1A4-磁珠缀合物与正常(N, 泳道 19)、4 个 ME7 (泳道 1-8)或 5 个 139A (泳道 9-18)瘙痒病感染的小鼠脑匀浆进行反应。所述瘙痒病样品用蛋白酶 K 进行处理(+)或不用蛋白酶 K 进行处理(-), 然后进行免疫沉淀。作为对照, 将 6H4-磁珠缀合物与正常(N, 泳道 20)小鼠脑匀浆进行反应。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还

25

原条件下分辨所述免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后，再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。

图 12 显示抗 YYR 单克隆抗体与 PrP^{Sc} 的反应性的构象依赖性。在 SDS-PAGE 凝胶中在非还原条件下分辨正常(N)、ME7 或 139A 瘙痒病感染的小鼠脑匀浆。印迹用 1A4 (泳道 1-3)或 6B1(泳道 4-6)进行探测后，再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。然后所述印迹不经剥离再用 6H4 (泳道 7-9)和山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。

图 13 显示采用流式细胞术分析与荧光素化抗 PrP^{Sc} 单克隆抗体 1A4、2B5、6B1、17B 和 18B 反应的解离的正常小鼠脾细胞。将荧光素化山羊抗小鼠 Ig (GAM Ig)用作对照。截获时(on acquisition)通过特征性前向和侧向散射参数门控细胞，并且排除碘化丙锭。虚线代表背景荧光；实线代表染色抗体。根据 96 孔板读出器的荧光素发射测量，单克隆抗体被成功地荧光素标记，并且根据 ELISA 测定所述单克隆抗体保持对免疫抗原的反应性。

图 14 显示采用抗 YYR 小鼠单克隆抗体和山羊多克隆抗体的仓鼠 PrP^{Sc} 的免疫沉淀。将 1A4 单克隆抗体和 p165 多克隆抗体-磁珠缀合物与正常(N)或瘙痒病感染的仓鼠脑匀浆(Sc)进行反应。该瘙痒病样品用蛋白酶 K 进行处理(+)或不用蛋白酶 K 进行处理(-)，然后进行免疫沉淀。在 SDS-PAGE 凝胶上在非还原条件下分辨所述免疫沉淀物。印迹用 6H4 单克隆抗体进行探测后，再用山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物进行探测。

图 15 显示对正常牛脑中的蛋白酶敏感 PrP^C (泳道 1 和 4)和 BSE 脑中的 PrP^C 和蛋白酶抗性 PrP^{Sc} (泳道 2 和 3)的免疫印迹检测。将用蛋白酶 K 处理或不用蛋白酶 K 处理的脑匀浆(+或-)在 SDS-PAGE 电泳上分辨后，转移至 PVDF 膜上进行免疫印迹。按照标准方法，将膜用 mAb 6H4 探测，洗涤，然后用 ECL 显色，最后对 X-光胶片曝光。

图 16 显示证明抗 YYR 兔多克隆抗体 pAbC2 特异性识别牛 PrP^{Sc}

5 的 ELISA 系统。与吸附的可溶性朊病毒受体胞外域(PC2)或对照蛋白(Mek)反应的 BSE 脑提取物按照 ELISA 显示, 在受体孔与对照孔中 pAbC2 对结合 PrP^{Sc} 的检测结果显示具有统计学显著性(图 A; p 值=0.008)。还显示了用 pAbC2 或 mAb6H4 通过直接 ELISA 识别牛重组 PrP^C (bPrP) (图 B)。

发明详述

10 我们发现, 在 PrP 中的一个或多个位点上的 YYX 表位(例如 YYR)的酪氨酸选定芳族侧链的取向限定 PrP^{Sc} 分子表面特异性的连续免疫表位, 而按照公开的 PrP^C NMR 结构溶液, 已知同样的酪氨酸侧链在 PrP^C 构象中是隐蔽的(Riek 等, *Nature* 382:180, 1996; Donne 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13452-7, 1997; Zahn 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:145-50, 2000)。这一发现有助于产生可用于诊断和治疗目的的 PrP^{Sc} 特异性抗体, 以及开发筛选可用于检测或消灭朊病毒及其相
15 关疾病和障碍的新型化合物。

制备抗 PrP^{Sc} 的表位特异性抗体

20 抗体通过独特的氨基酸决定簇或表位特异性识别蛋白质。这些决定簇或表位可以为线性氨基酸序列或通过氨基酸以三维空间形成的特有构象。认为 PrP^C 转换为 PrP^{Sc} 涉及蛋白质构象的主要变化, 可能是转变后形成或暴露出独特表位。因此, 如本文所讨论的, 我们提出了关于朊病毒蛋白转换的所谓侧链假说。按照该方案, 通常隐蔽在溶剂不可及 PrP^C 内部的侧链在 PrP^{Sc} 中成为溶剂可及的。因此, 预期新暴露侧链的优势在于是疏水性的, 其证据是稳定的 PrP^{Sc} 样中
25 中间体中疏水性残基的溶剂暴露增加(Swietnicki 等, *J. Biol. Chem.* 272:27517-20, 1997)。挤出的这些疏水性侧链单独或与通常存在于 PrP^C 分子表面的侧链一起构成抗体识别 PrP^{Sc} 的独特表位基础。此外, 预期这些表面可及的疏水性侧链改变 PrP^{Sc} 的溶解度和聚集特性, 与该

结构同种型的已知特性等同。新的可及侧链也可以参与 PrP^C 补充 PrP^{Sc} 的过程。

5 检验该假说，始于在体外检查色氨酸环和酪氨酸环的两个疏水性氨基酸侧链的取向，其信息通过荧光光谱学研究获得。首先，通过低 pH 诱导小鼠重组 PrP^C 的 β 折叠转换，以便模拟 PrP^C 转换为 PrP^{Sc} 的特征性结构变化 (Hornemann 和 Glockshuber, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6010, 1998)。图 1A 说明：根据 pH 7.0-3.0 的圆二色性，分子椭圆率的改变与 PrP^C 从主要为 α 螺旋改变成主要为 β 折叠相一致(光谱在适当的相应频率从双最小变成单最小)。

10 其次，采用标准荧光光谱法，检查重组 PrP^C 中的酪氨酸侧链和色氨酸侧链随 pH 增加的溶剂可及性(图 1B)。该研究基于以下原理：与基它氨基酸侧链相邻的芳族侧链(即在蛋白质内)将具有与暴露于水的芳族侧链不同的特定荧光(例如，Chin 等, *Biochemistry* 31:1945-51, 1992)。当重组小鼠 PrP^C 在低 pH 时，色氨酸和酪氨酸芳族基团呈现与差别溶剂暴露一致的相反行为。

15 检查人 PrP^C、牛 PrP^C 和小鼠 PrP^C 的氨基酸序列揭示出 13 个酪氨酸残基(图 2)。人 PrP 和牛 PrP 中的 11 个酪氨酸、小鼠 PrP 中的 10 个酪氨酸位于所述蛋白质 C 末端 2/3 中，所述蛋白质 C 末端 2/3 包含朊病毒感染性必需的足够蛋白酶抗性结构域。值得注意的是，该结构域中的 6 个酪氨酸以罕见的“YY”成对基序存在(图 2)。3 对中的 2 对与 C 末端精氨酸(R)连接，而第 3 个 YY 基序在小鼠和仓鼠中与 C 末端天冬氨酸(D)连接或在牛、绵羊和人中与 C 末端的谷氨酰胺(Q)连接。R 含有一个末端胍基，而 Q 和 D 含有平面羧酰胺和羰基键。在 YY 基序中这样的—个末端平面氨基酸可以与暴露的酪氨酸环相互作用，以稳定或指导它们的免疫识别。

25 另外，检查小鼠 PrP^C、仓鼠 PrP^C 和人 PrP^C 的 NMR 解析结构揭示，没有鉴定的酪氨酸对的两个环取向为分子表面可及的垂直串联构型 (Riek 等, *Nature*, 382:180, 1996; Donne 等, *Proc Natl. Acad. Sci.*

94:13452, 1997; Zahn 等, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:145-50, 2000)
(图 3)。推测是在酸处理的 PrP^C 或 PrP^{Sc} 表面酪氨酸暴露增加可能与
某些酪氨酸对有关。一种稳定的酪氨酸环构象称为 π -堆积, 其中两个
酪氨酸环以略偏移的平行方式堆积(示意性说明见图 4)。虽然稳定,
5 但是对结构数据库进行 π -堆积表面可及酪氨酸环的初步检索仅鉴定出
4 种其它具有类似取向的蛋白质, 其中没有一个位于膜蛋白胞外域。
因此, 认为新型 PrP^{Sc} 特异性表位是以 π -堆积取向的酪氨酸对, 存在
或没有精氨酸、谷氨酰胺和天冬氨酸侧链(属于平面氨基酸, 也可能
参与与其前面的酪氨酸的 π -堆积作用)的作用。

10 除了 PrP^{Sc} 中酪氨酸侧链取向方面的改变外, 也可能所述三种
YYR 基序因为其相互靠近的变化使成为 PrP^{Sc} 免疫学上更可达。典型
IgG 抗体的组成是: 两个相同的抗原结合区通过柔性铰链区与一个恒
定区连接。在 PrP^C 构象改变成 PrP^{Sc} 构象期间, YYR 基序可能彼此
相对移动(Korth 等, *Nature*, 390:74-77, 1997), 从相对分开移至相对
15 靠近。另外, IgG 识别 PrP^C 中的 YYR 基序可能是不利的, 因为两个
关键基序位于该分子的不同侧面, 使得识别为低亲和力单价性质,
而不是其中两个 IgG 抗原结合区都参与识别的高亲和力相互作用。

我们用牛 PrP^C 和 PrP^{Sc} 获得的数据表明, 根据免疫沉淀和 ELISA
测试, 抗 YYR 抗体特异性识别 PrP^{Sc} (参见下文), 与 PrP^{Sc} 中和/或 YYR
20 表位附近的酪氨酸侧链的可及性改变相一致。还认为氨基酸残基精
氨酸在 YYR 抗体的产生和识别特异性方面是重要的。认为在极性酪
氨酸侧链和精氨酸高碱性侧链之间的静电作用归因于 YYR 表位在通
过 YYR 三肽免疫和衍生抗体识别 PrP^{Sc} 两个方面的性质。值得注意的是,
25 在某些物种(包括人和牛)中, 在末端 PrP 环中的第三个 YY 二
聚体基序与谷氨酰胺结合, 谷氨酰胺是对精氨酸的部分保守取代,
在某些其它物种(包括小鼠和仓鼠)中, 末端 PrP 环中的第三个 YY 二
聚体基序与天冬氨酸结合, 为非保守取代。具有平面侧链的典型氨
基酸包括精氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺。

PrP^C 构象转换为 PrP^{Sc} 构象伴随的氨基酸侧链暴露现象可能不只适用于酪氨酸对。可能具有大侧链的其它氨基酸可能存在 PrP^{Sc} 核心耐受性差的侧链，这些侧链单独或与其它局部部分一起构成 PrP^{Sc} 独特免疫反应性的基础。在 PrP^C 和 PrP^{Sc} 之间不同的免疫表位构成用于 PrP^{Sc} 诊断试验的基础，并且也可用于治疗免疫人和动物，以抵抗朊病毒病。认为疏水侧链暴露使得 PrP^{Sc} 比 PrP^C 的疏水性增加和聚集增强。

在 PrP^C 中溶剂不完全可及的大侧链的实例包括以下氨基酸(按照小鼠 PrP 序列对氨基酸残基进行编号):

1. 非 YYX 基序包含的酪氨酸，包括 Y127、Y156、Y217。
2. 部分不暴露于溶剂的一个苏氨酸四重复残基 T189-193。
3. 组氨酸 H186。
4. 谷氨酰胺 Q159、Q167、Q185、Q216。
5. 天冬酰胺 N158。
6. 甲硫氨酸 M128、M133、M153。
7. 亮氨酸 L124、L129。
8. 异亮氨酸 I181、I183。

如下所述，合成含 YYR 表位的肽。将这些肽与载体缀合后，用于免疫兔子或小鼠，以产生多克隆抗体或单克隆抗体。然后测试多克隆和单克隆抗体对 PrP^{Sc} 的特异性。结果表明，这样的抗体以高结合亲和力特异性结合 PrP^{Sc}。

提供下述实施例用来说明本发明，而不应认为是限制本发明。

PrP^{Sc}-特异性抗体

在兔子中，针对与 KLH 连接的 YYR 肽产生多克隆抗血清 pAbC2。在免疫方案后从每只兔子中收集血清，并用 A 蛋白柱纯化总 IgG。然后在免疫沉淀反应中用得自正常或瘙痒病感染小鼠的脑匀浆测试这些样品的抗 PrP^{Sc} 活性。用于这些研究的脑匀浆的初步分析

表明，正常脑提取物中的 PrP^C 量(图 5, 泳道 1)和感染样品中的 PrP 量(图 5, 泳道 3)均为可检测量。同预期的一样, PrP^C 对蛋白酶 K (PK) 消化敏感(图 5, 泳道 2), 而 PK 消化后显示 PrP^{Sc} 蛋白酶抗性核心 (命名为 PrP 27-30)的特征性迁移改变(图 5, 泳道 4)。这些脑匀浆与偶联 BSA 的磁珠一起温育不能沉淀任何可检测的 PrP (图 5, 泳道 5-8), 5 而将所述样品与用 6H4 (PrP 特异性单克隆抗体)偶联的磁珠一起温育免疫沉淀正常脑的 PrP^C (图 5, 泳道 9)以及感染脑匀浆的 PrP^{Sc} (图 5, 泳道 11)和 PrP 27-30 (图 5, 泳道 12)。当将 pAbC2 IgG 与所述磁珠偶联后与正常脑匀浆一起温育时, 没有免疫沉淀可检测的 PrP(图 6, 泳道 9 和 10)。引人注目的是, 将偶联 pAbC2 IgG 的磁珠与受感染样品一起温育免疫沉淀 PrP^{Sc} (图 6, 泳道 11)和 PrP 27-30 (图 6, 泳道 12)。再一次证实, 包括可检测量的 PrP^C 和 PrP^{Sc} 的这些组织(图 6, 泳道 1-4)和偶联 BSA 的磁珠不能免疫沉淀任何 PrP (图 6, 泳道 5-8)。

另外, 类似的实验显示, 与 6H4 相比, pAbC2 IgG 特异性免疫沉淀 BSE 感染的牛脑 PrP^{Sc} (图 7)。此外, 在 ELISA 系统中, 采用可溶性 PC2 (朊病毒受体)作为捕获试剂, pAbC2 抗体可以识别牛 PrP^{Sc}, 但是在重组牛 PrP 直接吸附在板上的 ELISA 研究中不产生信号, 尽管使用 6H4 单克隆抗体可检测 (图 16)。在蛋白质印迹法中, 抗 YYR IgG 不识别变性的重组牛 PrP^C (数据未显示), 与以下详述的用小鼠抗 YYR 单克隆抗体进行的研究相似。

也针对与 KLH 连接的 YYR 产生山羊多克隆抗血清。收集血清, 经硫酸铵沉淀分离纯化总 IgG。也采用缀合 YYR 的柱子, 通过亲和层析, 从同一血清纯化 YYR 反应性 IgG。如上详述, 将这些抗血清进行一系列的类似筛选并验证免疫沉淀反应。3 只免疫山羊中的其中一只产生 PrP^{Sc} 特异性抗血清(p165) (图 8), 并进行进一步特征鉴定。如同以上实验, 偶联 6H4 的磁珠不能区别性沉淀受感染小鼠脑的 PrP^C 和 PrP^{Sc} (图 8, 泳道 10 和 11)。在该实验中没有观察到 6H4 免疫沉淀 PrP 27-30(图 8, 泳道 12), 偶尔观察到的原因未知。当将免疫山羊的

5 总 IgG 与所述磁珠偶联时，从正常和受感染小鼠脑匀浆中沉淀的物质即使有也很少(图 8，泳道 4、5 和 6)。相反，当将 YYR 亲和纯化的 IgG(p165)与所述磁珠偶联时，从受感染小鼠脑中仅沉淀 PrP^{Sc}(图 8，泳道 2)。与得自兔子的 pAbC2 多克隆不同，山羊抗 YYR 多克隆不沉淀 PrP 27-30 (图 8，泳道 3)。PK 消化后，这些提取物都含有可检测 PrP 27-30，与此同时使用相同匀浆评价单克隆抗体(参见下文)，并且在 PK 消化后检测到 PrP 27-30 (图 9，泳道 3、6 和 9)。此外，通过蛋白质印迹分析脑匀浆揭示，受感染小鼠脑匀浆中可检测到 PrP^{Sc} 和 PrP 27-30 (数据未显示)。

10 除产生山羊多克隆抗体外，也产生针对同一 PrP^{Sc} 特异性表位的单克隆抗体，但是用原抗原的衍生物，在所述抗原衍生物中多个原 YYR 肽连接在一起成为一种连续序列。合成 YYRRYYRYY (SEQ ID NO: 31)，试图增加在所述肽序列中 YYR 表位的数目，以及增加酪氨酸堆积的机率和/或 π -堆积的频率。此外，在 5 个目的物种中，在朊病毒蛋白中的一个 YYR 序列前接一个精氨酸(图 2)。将 YYRRYYRYY 肽与 KLH 连接，随后用该抗原免疫小鼠。分离这些小鼠的脾细胞，并将其与 FO 小鼠 B 细胞系(ATCC CRL-1646)融合，以产生特异性杂交瘤克隆。从克隆产生腹水，在 ELISA 中，腹水与缀合替代载体 8map 的 YYR 反应。用 A 蛋白柱纯化得自这些腹水的 IgG，然后用标准方法
15 20 25 法进行筛选和验证。在免疫沉淀反应中，用得自受感染小鼠的脑匀浆，鉴定出特异性识别 PrP^{Sc} 的 5 种单克隆抗体(1A4、6B1、2B5、2C 和 18B)。图 9 说明这些单克隆抗体中的 3 种 1A4、2C 和 6B1 特异性沉淀 PrP^{Sc}。与阴性对照抗体 19E (图 9，泳道 10 和 11)以及非区别性抗体 6H4 (图 9，泳道 14 和 15)相比，观察到 p165、1A4、2C 和 6B1 特异性沉淀 PrP^{Sc}(图 9，将泳道 1、3 和 5 分别与泳道 2、4 和 6 比较)。与 p165 相反，这些 PrP^{Sc} 特异性抗体中的所有 3 种均沉淀 PrP 27-30 (图 9，泳道 3、6 和 9)。采用正常小鼠脑匀浆，在 1A4、2C 和 6B1 沉淀(图 9，泳道 1、3 和 5)以及 19E 的沉淀中均存在模糊条带，可能代表

混合存在的 PrP^C 和从磁珠洗脱出的小鼠 IgG 轻链及重链的非特异性背景沉淀，所述小鼠 IgG 轻链和重链随后通过山羊抗小鼠 Ig-HRP 缀合物检测到(图 10)。

5 继续评价 PrP^{Sc} 特异性单克隆抗体揭示，PrP^{Sc} 特异性单克隆抗体能够通过构象依赖性表位识别不同鼠品系的 PrP^{Sc}。如图 11 所示，将 1A4 用于对用感染鼠瘙痒病 ME7 或 139A 病毒株的不同小鼠制备的大量提取物的免疫沉淀。在这些实验中，发现 1A4 特异性沉淀 PrP^{Sc} 和 PrP 27-30，与病毒株无关。对于其它 PrP^{Sc} 特异性单克隆抗体也观察到这种结果(数据未显示)。当在 SDS-PAGE 凝胶中在非还原条件下
10 将脑匀浆(正常、ME7 和 139A 感染)进行电泳，然后用一种 PrP^{Sc} 特异性单克隆抗体(1A4 或 6B1)或 6H4 探测 PrP 时，很明显仅 6H4 能够检测变性 PrP^C 和 PrP^{Sc} (图 12，泳道 7、8 和 9)。对于 1A4 和 6B1，样品变性后丧失 PrP^{Sc} 特异性决定簇，确定了所述表位的构象敏感性。

15 另外，确定了在正常和 PrP^{-/-}敲出小鼠脾细胞表面或离体后立即解离的脑细胞表面，YYR 反应性单克隆抗体不识别任何细胞表面蛋白。通过 ficol 梯度，将脾细胞和脑悬浮液离心，分离小鼠活脾细胞和脑细胞。如图 13 所示，用所列的缀合 FITC 的抗体(实线)或用同种型匹配的 FITC 标记的对照抗体(虚线)染色脾细胞。用碘化丙锭排除分析中的死细胞。脾细胞(图 13)或脑细胞(未显示)上缺乏表面免疫反
20 应性表明，YYR 构象表位罕见，与上述结构检索结果一样。此外，缺乏明显信号为研究脾细胞和其它受试细胞细胞表面的 PrP^{Sc} 免疫反应性提供可接受的背景。细胞表面 PrP^{Sc} 的检测可用作人和动物朊病毒病感染的诊断试验。最后，细胞表面免疫反应性的缺乏独立证实了这样的事实：抗 YYR 抗体不识别 PrP^C，因为脾细胞和脑细胞具有
25 通过 6H4 免疫组织化学可检测到的表面 PrP^C (数据未显示)。

还检测了 YYR 表位的种特异性。在采用瘙痒病感染仓鼠脑匀浆的研究中，发现上述 PrP^{Sc} 特异性单克隆抗体和多克隆抗体免疫沉淀仓鼠 PrP^{Sc}(图 14)。此外，也观测到在采用感染小鼠组织的研究中存

5 在的 PrP^{Sc} 和 PrP 27-30 相似特异性。例如，单克隆抗体 1A4 特异性免疫沉淀 PrP^{Sc} 和 PrP 27-30(图 14, 泳道 3 和 4), 而多克隆山羊抗体 p165 仅特异性免疫沉淀感染仓鼠脑的 PrP^{Sc}(图 14, 泳道 7、8、9 和 10)。如果需要的话, 可采用本文所述的任何技术特异性免疫沉淀除仓鼠以外的感染绵羊、牛和人组织的 PrP^{Sc}。

材料与方

采用下列材料和方法获得并测试上述 PrP^{Sc} 特异性抗体。

10 圆二色性

按照 Hornemann 和 Glockshuber (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6010, 1998)介绍的方法进行圆二色谱检测。于 25°C 以 0.1 cm 光径的石英杯在 62DS 型 Aviv 圆二色谱仪(Lakewood, NJ)上记录远紫外线圆二色谱。从 195 nm-260 nm 以 1.0 nm 梯段、1.0 nm 带宽和收集时间 4 秒/段获取光谱。实验数据表示为平均残留椭圆率(residue ellipticity)(deg θ cm² dmol⁻¹)。

荧光光谱学

20 按照 Chin 等介绍的方法(*Biochemistry* 31: 1945-51, 1992)进行荧光光谱检测。

制备免疫性 YYR 肽

25 为了获得抗 PrP^{Sc} 抗体, 合成具有氨基酸序列乙酰基-Cys-Tyr-Tyr-Arg-NH₂ (YYR) (SEQ ID NO: 32)的肽, 使其与 KLH 缀合, 然后采用众所周知的技术将所述肽肌内注射到兔子体内。

在所述肽的氨基末端, 加入半胱氨酸残基, 使得所述肽可与蛋白载体缀合。经乙酰化封闭所述肽的氨基, 经酰胺化封闭所述肽的羧基。

肽合成

采用人工固相肽合成法或者自动固相肽合成法(MPS396 肽合成仪, Advanced ChemTech)合成肽。用 Fmoc 肽合成化学完成氨基酸残基的偶联(Fields 等, 1990, *IJPPR* 35, 161)。在 Wang 树脂或酰胺 Rink 树脂上, 用侧链完全保护的氨基酸进行合成。由于用 Fmoc 基团保护氨基酸的 α -氨基, 因此对于三官能氨基酸侧基选择以下保护基:

半胱氨酸: 5-三苯基甲基(Trt)

精氨酸: 2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)

酪氨酸: 叔丁基醚(tBu)

根据偶联反应的化学和难度, 将 BOP、PyBOP 或 TBTU 用作活化剂。所有化学品购自 Advanced ChemTech, Bachem 和 Calbiochem/NovaBiochem。通过用 3-6 倍过量的偶联剂和所说的双偶联确保序列残基之间的每个肽键的形成; 意味着对于加入至生长肽链中的每个氨基酸都重复偶联反应。

从树脂中切下 fluo-肽

合成后, 用试剂 K 作为切割混合物: 水(2.5%)、TIS (2.5%)、EDT (2.5%)、TFA (92.5%), 从树脂中切下所述肽。然后用冷乙醚沉淀所述肽。将沉淀物离心, 用乙醚洗涤三次, 溶于 20%-50% AcCN/水混合物中, 然后冻干。用分析型 RP-HPLC 和电雾化 MS 进行粗制品的分析。

HPLC 纯化

使用 RP-HPLC (反相高效液相层析), 在 Vydac C18 柱(2.5x25 cm)上, 使用 10-50%线性梯度乙腈水溶液与 0.06% TFA(1%/分钟梯度, 10 ml/分钟流速), 在 215 nm 和 254 nm 进行 UV 监测, 从而纯化所述粗制肽。用分析型 RP-HPLC 评价流分的纯度。获得的终产物为冻干肽,

通过分析型 RP-HPLC (Vydac C18, 0.46x25 cm, 线性梯度 10-60%乙腈水溶液, 0.1% TFA, 1%/分钟, 1 ml/分钟流速, 在 215 nm 和 254 nm 进行 UV 吸收检测)估计所述冻干肽的纯度为至少 95%。使用 SCIEX API III 质谱仪, 按照标准方法, 通过分子量分析鉴定该纯肽。

5

分析数据

所述肽在 RP-HPLC 上的保留时间为 21.215 分钟。所述肽的理论分子量计算值为 644.74; 分子量分析的实际分子量实测值为 646.5 (MW+H⁺)。

10

肽与载体的偶联

将肽与载体偶联, 在本情下载体为匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)。可用于这种偶联的其它载体包括但不限于白蛋白、或卵清蛋白、8map、或溶菌酶。通过与半胱氨酸巯基的硫醚键实现偶联。这种类型的键合有利于肽以确定方式与载体蛋白进行偶联。

15

与 KLH 偶联如下进行。将 10 mg 肽溶于 2 ml 磷酸缓冲液(PBS 1x)中。将 1 ml KLH (Pierce 产品目录号 77100)加入肽溶液中并搅拌(1 mole 肽/50 个氨基酸)。KLH 浓度为 10 mg/ml。边搅拌边将 20 μ l 戊二醛(25%水溶液)加入肽/载体溶液中, 温育 1 小时后, 加入甘氨酸终止液。通过 PBS 透析, 从所述肽中分离出肽/载体缀合物。

20

按照标准方法, 例如本文介绍的方法, 合成另外的 YYR 肽(例如, CYYYRYYRYY (SEQ ID NO: 33)和 CKYEDRYRE (SEQ ID NO: 34))。通过对上述合成方法进行适当改进, 可以制备其它合成肽。也采用本领域已知的任何标准方法(例如本文介绍的方法)鉴定这类肽。

25

免疫兔子

按照标准方法制备多克隆抗体, 以 3-8 周的间隔, 用重复强化注射增强免疫应答。以蛋白质印迹或 ELISA 或者两种方法, 通过测定抗体浓度证实免疫成功。更具体地说, 为了产生针对 PrP^{Sc} 的多克隆

抗体，按照 164 天的免疫方案，将与 KLH 缀合的三肽 YYR 注射到兔子体内，然后从产生特异性抗体的动物取血。

5 为了取免疫前血清样品，每只兔子抽取 10 ml 血作为免疫前对照。首先用弗氏完全佐剂进行初次免疫，随后用弗氏不完全佐剂(IFA)加强免疫(1 ml/只兔，0.5 ml/每侧股肌)。每次注射包含约 200 μ g 纯肽。在第 21 天、第 42 天和第 70 天，用 IFA 给予强化注射。在第 31 天、第 42 天和第 80 天，从耳中央动脉抽取 10 ml 血液用于效价测定(6 ml/kg/只兔)。在第 80 天，检查血清效价，再以 4 周间隔注射(IFA)三次，注射后 10 天取血样。最后一次加强免疫后 10 天，通过心脏穿
10 刺对麻醉兔子进行取血，并收集抗血清。

免疫山羊

按照标准方法产生山羊多克隆抗体。如下免疫 3 只山羊。在第 1 天，所有山羊的初次免疫为接受 1 mg YYR-KLH 缀合物的弗氏完全
15 佐剂。对于 3 只山羊中的 2 只通过注射 1 mg YYR-KLH 缀合物的弗氏不完全佐剂进行加强免疫，而第 3 只山羊接受 1 mg YYR-8map 缀合物的弗氏不完全佐剂。通过 ELISA，测试 3 次取血样品的各血清样品对 YYR-BSA 缀合物的反应性。用第 3 组血样品，经硫酸铵沉淀纯化总 IgG，然后使用 YYR 亲和柱纯化 YYR 反应性 IgG。按照本文
20 所述测试 IgG 流分对 PrP^{Sc} 的反应性。严格免疫程序如下：第 1 天，初次免疫；第 21 天，第 1 次加强免疫；第 30 天，第 1 次取血；第 46 天，第 2 次加强免疫；第 53 天，第 2 次加强免疫；第 60 天，第 2 次取血；第 76 天，第 3 次加强免疫；第 83 天，第 3 次加强免疫；第 90 天，第 3 次取血。

25 或者，可以采用本文所述的合成肽和标准杂交瘤技术(参见例如 Kohler 等，*Nature* 256, 1975; Kohler 等，*Eur. J. Immunol.* 6:511, 1976; Kohler 等，*Eur. J. Immunol.* 6:292, 1976; Hammerling 等，*In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981; Ausubel 等，1999,

Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York), 制备单克隆抗体。制备单克隆抗体后还通过免疫沉淀和蛋白质印迹分析(例如, 通过采用 Ausubel 等介绍的方法, 参见上文)测试单克隆抗体对 PrP 的特异性识别。

5

免疫小鼠

如下制备单克隆抗体。用含小鼠 PrP-AP 融合蛋白的杆状病毒上清液的弗氏完全佐剂免疫小鼠, 然后 2 周后用同样抗原的弗氏不完全佐剂进行加强免疫。免疫后 2 周, 用 PrP-AP 上清液加上 100 μg KLH-CYYRRYYRYY 和 100 μg KLH-CKYEDRYRE 缀合物的混合物加强免疫小鼠。将这些小鼠的脾细胞与 FO 小鼠 B 细胞系(ATCC CRL-1646)融合, 产生特异性杂交瘤克隆。通过 ELISA 筛选杂交瘤上清液。没有对 PrP-AP 或 CKYEDRYRE 序列反应的上清液, 但是有对 YYR-8map 缀合物反应的克隆。

15

抗体的纯化

采用 Pharmacia A 蛋白 HiTrap 柱, 按照生产商的建议, 从血清纯化兔总 IgG。概括地讲, 用 3 倍柱体积的起始缓冲液(0.2M 磷酸钠缓冲液, pH 7.0)平衡 HiTrap 柱。使用注射器通过 luer 接管将血清加样到柱子上。随后用 5 ml 起始缓冲液洗涤柱子。用 0.1 M 甘氨酸, pH 3.0 洗脱结合蛋白, 并收集于装有 1 M Tris pH 8.0 (50 μl /500 μl 样品)的 eppendorf 管中。在 SDS-PAGE 上分析流分。

20

如上所述从血清样品纯化山羊多克隆抗体。

产生的小鼠单克隆抗体为腹水, 并用 A 蛋白柱试剂盒(Pierce), 按照生产商的说明, 纯化小鼠单克隆抗体。概括地讲, 用结合缓冲液以 1:1 终比率稀释腹水样品。然后将样品加样到柱子顶部, 该柱子先前已用结合缓冲液平衡, 让样品流过基质。收集流出物质, 用 5 倍体积的结合缓冲液洗涤柱子。将温性洗脱缓冲液加入柱子中, 以

25

从基质释放结合的 IgG 抗体。通过转换成 IgG 洗脱缓冲液收集其它抗体同种型。以 1 ml 流分收集所有抗体，通过 BCA 以测定总蛋白含量以及经 SDS-PAGE 电泳以确定抗体纯度的程度来对该流分进行分析。通过使流分通过 D-盐柱(Pierce)，使含有最大得率 IgG 的流分脱盐。分配抗体流分，用 PBS 将其贮藏于-80℃。

随后如下测试采用前述方法产生的抗体的高亲和力结合。

牛脑匀浆的制备

使用两种方法制备牛脑匀浆。在第一种方法(A)中，采用 Polytron (OMNI GLH)，将脑样品在组织匀浆缓冲液(10%蔗糖、20 mM HEPES pH 7.5、2%十二烷基肌氨酸钠和 5 mM EDTA)中匀浆。使用的匀浆终浓度为 1% (w/v)。

在第二种方法(B)中，将脑匀浆制成 10% (w/v)溶液。使用 Dounce 匀浆器(带一个 Teflon 研棒)以 2 倍体积的冷裂解缓冲液(100 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5% Nonidet P-40、0.5%脱氧胆酸钠的 tris-HCl 溶液，pH 7.4)将牛脑捣碎。样品在冰上孵育 20 分钟后，再在匀浆器中匀浆 15 次。通过在 4℃以 3000 rpm 离心 15 分钟来去除细胞碎片。随后定量测定上清液的蛋白质含量。

仓鼠和小鼠匀浆的制备

仓鼠或小鼠脑组织加入足够匀浆缓冲液(PBS 0.5% NP40、0.5% 脱氧胆酸盐)，产生 10% (重量/体积)匀浆。重复通过 18 号针和 22 号针使组织匀浆。连续 2 次以 500g 离心 20 分钟去除细胞碎片。用 BCA 试剂盒(Pierce)定量测定上清液中的总蛋白，用匀浆缓冲液将浓度调至终浓度为 5 mg/ml。制备成各 200 μl 等份样品，贮藏于-80℃。

磁珠缀合

采用生产商提供的方案，将 60-150 μl 纯化抗体或 BSA 与大约 6 x

5 10^8 甲苯磺酰活化的磁珠(Dynal)缀合。概括地讲, 将每种抗体的 1 ml 匀质未缀合磁珠悬液洗涤两次, 重悬于含抗体或 BSA 的 PBS pH 7.4 中。混合物在转子上于 37°C 温育 20-24 小时。然后旋转下在 PBS 0.1% BSA 中将混合物洗涤两次, 每次 5 分钟, 然后旋转下在封闭缓冲液 (0.2M Tris pH 8.5 0.1% BSA) 中于 37°C 温育 4 小时。用 PBS 0.1% BSA 再洗涤 5 分钟后, 将抗体-磁珠缀合物在 PBS 0.1% BSA 1% Tween-20 中洗涤 10 分钟, 再用 PBS 0.1% BSA 洗涤, 然后贮藏于 4°C。

蛋白酶 K 消化

10 将牛脑匀浆与蛋白酶 K 溶液(100 μ g/ml)于 50°C 温育 30 分钟。用蛋白抑制剂 PMSF (2 mM)终止消化。

用 45 μ g/ml 终浓度蛋白酶 K 于 37°C 消化小鼠和仓鼠脑匀浆 30 分钟。加入 19 mM PMSF 终浓度终止反应。

15 免疫沉淀法

将 10 μ l 脑提取物加入 950 μ l 免疫沉淀缓冲液(PBS 3% NP-40、3% Tween-20), 于 37°C 温育 30 分钟或 60 分钟。对于评价 PrP²⁷⁻³⁰ 与磁珠缀合物反应性的实验, 进行温育之前加入 50 μ l 1 mg/ml 蛋白酶 K。将未用蛋白酶 K 处理的样品于 37°C 再温育适当时间。温育后, 20 两组试管中都加入 60 μ l 100 mM PMSF 溶液。然后将 100 μ l 重悬浮的磁珠缀合物加入至混合物中, 边旋转边于室温下温育 2 小时。用洗涤缓冲液(PBS 2% NP-40 2% Tween-20)洗涤磁珠 3 次, 每次洗涤后通过涡旋进行重悬。最后一次洗涤后, 将磁珠重悬于 20 μ l 2X 加样缓冲液(100 mM Tris pH 6.8、4% SDS、0.015% 溴酚蓝、20% 甘油)中, 25 于 95°C 加热 3 分钟。

蛋白质印迹

按照标准方法, 通过蛋白质印迹测定脑匀浆的 PrP^{Sc} 含量。将蛋

5 白质样品与 2x 样品缓冲液以 1:1 比率进行混合，于 100℃煮沸 5 分钟。按照标准方法进行 SDS-PAGE 分析。将样品与预染色分子量标准参照物(Biorad)一起加样到 15%预制丙烯酰胺凝胶(Biorad)中。凝胶于 100V 进行电泳直至溴酚蓝染料前沿到达凝胶底部。然后在 100V 将分离的蛋白质转移至 PVDF 膜上达 1 小时。在封闭缓冲液中将膜封闭 30 分钟，封闭后用 TBST 洗涤膜 3 次。然后将膜与变性 PrP 特异性抗体一起于室温下温育 2 小时。如上所述洗涤膜后，将其与山羊抗小鼠 IgG 碱性磷酸酶缀合的第二抗体(1:5000 的 TBST)一起于室温下温育 1 小时。洗涤后，用化学发光底物 CDP-star 产生信号，然后对 X-光胶片曝光。

流式细胞术

15 通过使组织通过金属网，从 Balb/c 小鼠制备脾细胞悬液。用不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的冷 Dulbecco PBS 洗涤细胞 1 次，在细胞悬液上加入 Lympholyte(Cedarlane)并且以 1300g 离心 20 分钟分离活细胞。用不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 2.5%胎牛血清的冷 Dulbecco PBS 洗涤细胞 1 次，将 0.5×10^6 细胞等份加至圆底 96 孔板的各孔中。将细胞离心后以 1/10 终浓度重悬于 50 μl 抗体-FITC 缀合物的不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 2.5%胎牛血清的冷 Dulbecco PBS 中，在冰上保持 15 分钟。细胞用不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 2.5%胎牛血清的冷 Dulbecco PBS 洗涤 2 次后，重悬于含 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙锭的相同培养基中。在 Coulter Epics 流式细胞仪上分析细胞并根据大小和粒度(前向和侧向散射)和活力(排除碘化丙锭荧光)门控细胞。

FITC 抗体缀合

25 通过使用 Fluorotag 试剂盒(Sigma)，按照生产商的说明，制备荧光素标记的 mAb。概括地讲，用浓碳酸氢盐缓冲液使 0.5 mg 每种抗体升高至 pH 9，加入 FITC 储备液，使 FITC:抗体的比率为 20:1。然

后将实验瓶于室温下温育 2 小时。通过使混合物通过 Sephadex G-25M 柱，将标记抗体与游离 FITC 分开。采用 LJI Biosystems Analyst，通过测量缀合抗体在 535 nm 的 FITC 发射光，来测试缀合抗体的成功荧光素化，用 ELISA 针对 YYR-8map 缀合物测试抗体保留的结合活性。

5

脑匀浆 PrP 含量的测定

使用 mAb6H4 通过蛋白质印迹法证实从脑样品制备的提取物中存在 PrP^C 和 PrP^{Sc} (图 3)。在从正常和 BSE 感染的脑样品制备的提取物中观察到 PrP^C (33-35 kDa) 的分散带型。用蛋白酶 K 处理提取物后，PrP^C 被完全消化，而 PrP^{Sc} 显示为 27-30 kDa 的条带。

10

所有脑的特征在于存在 PrP^{Sc}，在合并提取物中占总 PrP 含量的 15-20% (图 15)。

可溶性原钙粘着蛋白-2 (sPC2) 的表达

一种 PrP 结合蛋白 PC2 用作 PrP^C 和 PrP^{Sc} 的捕获试剂，以证明 pAbC2 的 PrP^{Sc} 特异性。将含有编码所有 6 个钙粘着蛋白结构域、但在跨膜结构域的起点处截断的人原钙粘着蛋白-2 序列的质粒 (HU-PC43 3'trunc/PC1nel)，转染到 COS 细胞中。收集含可溶形式的原钙粘着蛋白-2 的培养基，使用抗 PC2 单克隆抗体通过蛋白质印迹法，测定 sPC2 的存在。题目是“朊病毒蛋白结合蛋白及其应用”的 WO 97/45746 描述了 PC2 作为朊病毒蛋白受体的应用，所述文献通过引用结合到本文中。

20

用 ELISA 测试 pAbC2

采用 ELISA 方法确定与使用重组 PrP (rbPrP) 的 PrP 相比，pAbC2 是否有效特异性识别牛脑提取物中的 PrP^{Sc}，。用含 PrP^{Sc} 的脑提取物合并物或 rbPrP 测试 pAbC2 对 PrP^{Sc} 的特异性。

25

在含 50 mM Tris、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM CaCl₂ 的 TBS

缓冲液中，用含 PC2 的培养上清液将 Immunolon ELISA 板(Dynex)各孔于 4℃ 包被过夜。对于 BSE 脑提取物实验，将对照各孔用含 Mek-4 的上清液包被；对于 rbPrP 实验，将牛奶用作对照，以测定各孔中抗体的非特异性结合。用抗 PC2 单克隆抗体证实可溶性 PC2 对 ELISA 板的包被。使用 SLT “Columbus”微量培养板洗涤仪(Tecan)，用含 0.05% Tween-20 的 TBS，洗涤各孔 4 次，然后通过用 0.2% I-Block (Tropix)的 TBST 填充各孔并将该板于 37℃ 温育 1 小时来进行封闭。洗涤板，将牛脑匀浆(在 TBS 中稀释至 1 % w/v)或 rbPrP 加入至设计的各孔中，于室温下温育 1 小时。用 TBST 洗涤各孔 4 次。将 pAbC2 加入至合适孔中，于室温下温育 1 小时，随后再与 100 μl 抗兔或小鼠 IgG/辣根过氧化物酶缀合物(1:5000)的含 1%脱脂牛奶的 TBST 一起温育 45 分钟。用 TBST 洗涤各孔 4 次。用 TMB/H₂O₂ 作为过氧化物酶的底物产生信号。15 分钟后通过加入 100 μl 2M 磷酸终止反应。采用 SLT 微量培养板读出器，以 620 nm 为参考波长监测 450 nm 的信号。通过将 PC2 结合的 PrP 和与阴性对照 Mek-2 或牛奶结合的 PrP 进行比较，测定特异性阳性信号。免疫前对照显示无结合。

在 BSE 感染的所有牛脑提取物的情况下，这些点记录的绝对值都比得自正常脑提取物的记录值高，无论所述板上是否存在 sPC2。可能 BSE 样品中的聚集导致与 ELISA 板各孔的非特异性粘附，因此，记录到的信号较高。然而，BSE 样品的值仍然比用 Mek-4 对照探测同一样品获得的值高。

pAbC2 与结合 PC2 的物质的反应比与结合 Mek-4 的物质的反应更强，通过比与 Mek-4 对照的结合高 1.5-2 倍，表明与 PrP^{Sc} 的结合是特异性的(图 16)。在大多数情况下，pAbC2 抗体作为第二检测试剂仅与 PrP^{Sc} 阳性样品结合，表明这种试剂的组合可以在未经蛋白酶预处理就能够检测 PrP^{Sc}。

采用免疫沉淀法检测分析 PrP

确定 pAbC2 识别 ELISA 测定中的 PrP^{Sc} 后, 随后进行免疫沉淀法, 以验证 pAbC2 是否可以免疫沉淀牛脑提取物中的 PrP。将数个正常或 BSE 感染的脑提取物的合并物用于本实验中, 除非另有说明。所有脑样品先前已鉴定存在 PrP^{Sc}。概括地讲, 将 20 μl 10% 脑匀浆与各种已知与 PrP 结合的抗体(例如 mAb6H4)以及含 0.5M GuHCl 的 TBS 中的 pAbC2 一起于室温下温育 2 小时。与 25 μl 偶联 A 蛋白的磁珠或偶联 G 蛋白的磁珠(Dyna-beads)一起于室温下温育 1 小时后, 用磁铁沉淀琼脂糖磁珠。洗涤沉淀 3 次后, 在 SDS 样品缓冲液中煮沸, 用于蛋白质印迹分析。用抗 PrP 多克隆抗体或单克隆抗体检测 PrP。

使用 pAbC2, 在含正常脑提取物的反应中未检测到 PrP, 然而, 在含 BSE 感染样品提取物的反应中检测到与 PrP 相似位置上的迁移条带(图 7)。这些结果进一步证实了 ELISA 研究结果: 即 pAbC2 对 PrP^{Sc} 是特异性的而对 PrP^C 无特异性。未偶联的磁珠用作阴性对照, 显示不能沉淀 PrP^{Sc}。在免疫沉淀反应中 mAb 6H4 用作阳性对照。如所预期的一样, 使用 mAb 6H4 有效沉淀正常脑的 PrP^C。

用途

可以将本文描述的 PrP 肽和 PrP^{Sc} 特异性抗体用于例如以下诊断、治疗、疫苗和净化目的, 以及用于筛选可以用于诊断或对抗朊病毒病的化合物或净化朊病毒样品的新型化合物。

用于诊断朊病毒病的试验试剂盒

表位特异性抗 PrP 抗体主要具有在检测或监测朊病毒病方面的诊断用途。例如, 采用标准检测方法, 可以将抗 PrP 抗体用于监测生物样品(例如活检组织、细胞或液体)中是否存在 PrP^{Sc}。免疫测定可以包括直接检测 PrP^{Sc}, 并且尤其适合于筛选存在 PrP^{Sc} 的大量样品。例如, 针对连续 YYX 表位例如 YYR 产生的多克隆抗体或单克隆抗体(如上所述)可以用于任何标准免疫测定形式(例如 ELISA、蛋白质印迹、

免疫沉淀、流式细胞术或 RIA 测定), 以测定复合物的形成。另外, 因为本文所述抗体对 PrP^{Sc} 有特异性, 因此, 如有需要, 免疫分析前可以不用蛋白酶预处理待测样品。在这些检测方法中可以使用直接或间接显现的任何合适的标记物, 包括但不限于任何放射性标记、
5 荧光标记、生色标记(例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)、化学发光标记、可以用标记的半抗原特异性抗体或其它结合配偶体(例如抗生物素蛋白)显现的半抗原(例如洋地黄毒苷或生物素)。例如, 在 Ausubel 等, 参见上文, Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), 以及
10 Moynagh 和 Schimmel, *Nature* 400:105, 1999 中描述了典型的免疫测定。例如, 使用本文描述的抗体, 采用标准流式细胞术法, 例如本文所述的那些方法, 在细胞表面(例如白细胞)可以容易地检测到 PrP^{Sc}。与合适对照样品相比, 标记复合物水平增加的样品说明存在 PrP^{Sc}, 因此指示存在朊病毒相关疾病。

15 另外, 使用本发明的抗体可以鉴定出可用于诊断朊病毒病的新化合物。例如, 按照标准方法(例如平衡透析、Biacore 分析或竞争性抑制), 筛选组合化学文库或小分子文库, 以鉴定能够抑制一种或多种抗 YYX 抗体与 YYX 表位的结合作用的化合物。这样的文库按照本领域已知方法可以从天然产物、合成(或半合成)提取物或化学文库
20 获得。药物发现和开发领域的技术人员知道, 化合物的准确来源对于本发明的筛选方法不是至关重要的。天然化合物来源的实例包括但不限于植物来源、真菌来源、原核生物来源或动物来源以及对现有化合物的修饰。许多方法也可用来随机产生或定向合成(例如半合成或全合成)任何数量的化学化合物, 包括但不限于糖、脂质、肽
25 和核酸型化合物。合成化合物文库可以商业性获得或可以按照本领域已知方法产生。此外, 如有需要, 采用标准化学方法、物理方法或生物化学方法, 可以容易地改进任一文库或化合物。

在最低浓度下抑制抗 YYX 抗体与 YYX 表位结合的化合物被称

为“高亲和力竞争剂”并可用于本发明的诊断方法。随后测试这类模拟抗 YYX 抗体(例如抗 YYX 抗体的互补决定区(“CDR”))活性的高亲和力竞争剂对 PrP^{Sc} 的有效识别和结合。鉴定出高亲和力竞争剂后,就可将其与固体支持物(例如 ELISA 孔或珠)偶联,用作朊病毒感染的任何实际诊断试验的捕获相。

使抗 PrP^{Sc} 单克隆抗体转换成 IgM

诊断方法也可以使用 IgM 抗体进行,所述 IgM 抗体增加对 PrP^{Sc} 的亲和力。为了增加对 PrP^{Sc} 的抗体亲和力,可以如下将特异性结合的 IgG Fab 区基因构建为五价 IgM 片段。

免疫球蛋白(Ig)分子由不同结构域和功能域组成。每种免疫球蛋白由 2 条重链(每条 50-80kD)和 2 条轻链(每条 25kD)构成。重链是 4 种免疫球蛋白基因 V_H、D_H、J_H 和 C_H 之一重排的产物。前 3 个基因统称为可变区,它们组合形成重链的结合部位。第 4 个基因 C_H 也称为恒定区,不参与结合部位的形成,但起免疫系统其它组分识别重链的作用。同样,轻链产生于三种免疫球蛋白基因 V_L、J_L 和 C_L 之一拷贝的重排。与重链一样,轻链的结合部位通过 V_L 基因和 J_L 基因组合产生,但不包括 C_L 基因。因此任何特定抗体的结合部位通过两个可变区: V_H-D_H-J_H 多肽和 V_L-J_L 多肽的相互作用而产生。大多数抗体具有两个这样的结合部位。

在免疫应答过程中,最早产生的免疫球蛋白类型称为 IgM。一般而言, IgM 含有具有相对低亲和力的结合部位,但是通过每个抗体分子表达五个结合部位而补偿所述特性。随着免疫应答的进展,产生其它抗体例如 Ig G, Ig G 比之前产生的 IgM 的亲和力高得多,但每个分子仅有两个结合部位。

如上所述,三肽 YYR 或相关基序在 PrP 序列中出现三次。在牛 PrP、啮齿类动物 PrP 和人 PrP 中,所述基序以二次 YYR 和一次 YYX 出现。因此,可能的情况是,特定试剂检测到的所述各基序越多,

所述试剂就越敏感。在 IgG 分子中含有最高亲和力结合部位。然而，因为它们仅有两个结合部位，因此这些抗体不是检测 PrP^{Sc} 的最佳试剂。IgM 分子含有足够的结合部位，但它们的亲和力较低，因此它们也不是检测 PrP^{Sc} 的最佳试剂。因此模块式构建 Ig 分子可解决该问题而且提供了一种构建用于检测 PrP^{Sc} 的最佳 Ig 的方法。

用于产生抗 PrP^{Sc} 多克隆抗体的 YYR-KLH 抗原用来免疫小鼠。用本领域已建立的已知产生高亲和力 Ig G 抗体的方法，免疫小鼠。通过标准方法产生 B 细胞杂交瘤，然后通过 ELISA，测试这些细胞产生的含有分泌单克隆抗体的组织培养上清液对该抗原 YYR 部分的免疫反应性。采用 Heinrichs 等(*J. Immunol. Methods*, 178:241-51, 1995)介绍的单侧 PCR 方法，克隆产生所述抗体的重排免疫球蛋白基因。仅需要克隆重链和轻链的可变区。然后，采用标准方法，将这些克隆基因插入到含有合适恒定区的表达载体质粒中，但是在这种情况下，分泌型 IgM 恒定区可以为任何其它 Ig 同种型。恒定区可以为小鼠来源或者人来源，人来源的 IgM 恒定区使所述抗体人源化，从而将其给予人后产生的副作用最小(关于综述参见 Winter 和 Harris, *Immunol Today*, 14(6):243-6, 1993; Vaughan 等, *Nature Biotech*, 16(6):535-9, 1998)。然后用现已含有与恒定区(例如衍生自 IgM 分子)偶联的产生自 IgG 分子的可变区的载体在细菌表达系统或真核表达系统中驱动产生重组抗 PrP^{Sc} 抗体。关于这种策略的实例参见 Poul 等, *Immunotechnology*, 1:189-96, 1995。

另一方面，按照文献(Marks 等, *J. Mol. Biol*, 222:581-597, 1991; Vaughan 等, *Nature Biotech*, 14:309-14, 1996)介绍从噬菌体展示文库选择对 YYR-KLH 抗原的 YYR 部分产生最佳反应性的可变区的组合，然后进行分离并亚克隆为上述全长抗体。

使抗 PrP^{Sc} 单克隆抗体转换成 IgE

检测样品(例如血样)中的 PrP^{Sc} 的一种替代方法包括使抗 PrP^{Sc} 单

克隆抗体转换成 IgE。PrP^{Sc} 形成各种大小的聚集物，而通常 PrP^C 不形成这样的聚集物。这些 PrP^{Sc} 多聚物可能存在于受感染个体的血液中。可以利用这种特征以生物测定检测 PrP^{Sc}。具体地说，通过亚克隆，使 PrP^{Sc} 特异性或与 PrP^C 和 PrP^{Sc} 交叉反应性的单克隆抗体转换成 IgE 同种型。这将包括与上述相同的方法，使用 IgE 恒定区代替 IgM 恒定区。

IgE 恒定区特异性细胞表面受体结合 IgE 抗体。这些受体广泛分布于身体内，并在变态反应中起重要作用。这时所研究的受体，即对 IgE (Fc RI) 的高亲和力受体存在于肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞和朗格汉斯细胞(Langerhans cells)上。它是由 3 个多肽链组成的细胞表面受体，并对 IgE 具有非常强的亲和力($K_a = 10^{10} M$)。每个 Fc RI 结合一个 IgE 分子(Kulczycki 和 Metzger, *J. Exp. Med.*, 140:1676, 1974; Barclay 等, *The Leukocyte Antigen Factsbook*, San Diego: Academic Press, 1997)。然而，为了起动脉信号应答，多个 Fc RI 受体与多价抗原交联(Metzger, *J. Immunol*, 149:1477, 1992)。细胞内信号强度与交联程度成正比。交联后表达 Fc RI 的细胞脱颗粒，引起快速释放组胺和其它贮藏的介质。

在目前生物测定法中，将血样与 PrP^{Sc} 反应性或 PrP^C 和 PrP^{Sc} 交叉反应性的单克隆抗体一起温育。结合单体 PrP 和多聚体 PrP (例如 PrP^{Sc} 集合物)后，将该混合物与表达 Fc RI 的细胞系例如 RBL-2H3 (已知表达 $2-3 \times 10^5$ Fc RI/细胞)一起温育(Barsumian 等, *Eur. J. Immunol*, 11:317, 1981)。这样的细胞系可得自 ATCC。由于 Fc RI 的聚集是发生脱颗粒所需要的，所以无论是否与抗体结合的单体 PrP 都不引起细胞脱颗粒，然而，多聚体 PrP 可引起细胞脱颗粒。用标准免疫测定例如 ELISA 直接检测所释放的介质。

PrP^{Sc} 疫苗

本发明的肽及其混合物和组合也可用作疫苗的有效成分，所述

疫苗能够在对感染敏感的宿主和/或感染宿主中诱发预防性或治疗性免疫应答以抵抗朊病毒病。给予途径、抗原剂量、注射次数和频率将随物种而变化并且可以与目前临床和/或实验用以产生针对其它传染病或癌症的免疫或治疗疗法同时使用。例如，疫苗是含有本发明肽、其类似物或混合物或其组合的药学上可接受的组合物，用有效量的该组合物治疗哺乳动物(包括人)，产生的免疫力足以保护所治疗的哺乳动物在一定时间内免患朊病毒病。用 YYX (YYR、或 YYD、或 YYQ)或相关化合物免疫激发产生的 PrP^{Sc} 特异性免疫也可有效促进降解 PrP^{Sc} 或缓解所述疾病的临床表现，而不影响 PrP^C 在脑和其它组织中的表达或功能，改善朊病毒病临床症状性患者的临床状态。

按照本领域已知的标准方法可以开发出不同类型的疫苗。例如，疫苗可以是肽型、核酸型、细菌型或病毒型疫苗。更具体地说，关于肽疫苗，相当于 PrP^{Sc} 特异性表位的肽或其功能衍生物可用作多种形式的预防性疫苗或治疗性疫苗，包括：1) PrP^{Sc} 序列的单体或多聚体，2) 与可促进所述表位聚集、促进其提呈或加工的额外序列(例如 I/II 类靶向序列)和/或增强 PrP^{Sc} 特异性表位的免疫原性或作为增强所述疫苗效能的一种方法的额外抗体、T 辅助细胞或 CTL 表位连续或非连续组合，3) 进行化学修饰或与可增强所述疫苗的免疫原性或传递的因子(例如脂肪酸或酰基链、KLH、破伤风类毒素、霍乱毒素等)缀合，4) 上述组分的任何组合，5) 上述组分与佐剂(包括但不限于铝盐、皂甙或三萜、MPL 和霍乱毒素)和/或传递媒介(包括但不限于脂质体、VPL 或病毒样粒子、微乳状液、减毒或灭毒细菌和病毒载体以及可降解微球体)的组合，6) 通过任一途径给予或一种方法是用抗原离体加载细胞。

核酸型疫苗用作预防或治疗剂的实例包括：1) 任何编码表达(转录和/或翻译) PrP^{Sc} 特异性表位的核酸，2) 促进加工和提呈、聚集、分泌、靶向(针对特定细胞类型) PrP^{Sc} 特异性表位的额外核酸序列，为翻译融合物或独立转录单位，3) 用作佐剂/免疫调制剂的额外核酸序

列，为翻译融合物或独立转录单位，4)增加 PrP^{Sc} 特异性表位的免疫原性或疫苗效能的额外抗体、T 辅助细胞或 CTL 表位，为翻译融合物或者独立转录单位，5)上述组分的任何组合，6)采用任何途径或离体加载，以盐水(“裸”DNA)或与佐剂(例如铝盐、QS-21、MPL)、免疫调制剂(例如 rIL-2、rGM-CSF、rIL-12)和/或核酸传递因子(例如基于聚合物、脂质、肽的可降解粒子、微乳状液、VPL、减毒细菌或病毒载体)的组合给予上述组分。

减毒或灭活细菌或病毒载体可以用来传递抗原或编码表达所述抗原的 DNA/RNA。使用这些组分的一种方法也可以是用抗原离体加载细胞。

朊病毒净化

本文所述的方法和组合物可用于净化已知或怀疑污染朊病毒的生物样品，例如用于移植的生物样品。具体地说，可以将生物样品与抗 PrP^{Sc} 抗体一起温育，然后采用标准方法去除复合物。或者，可以将抗 PrP^{Sc} 抗体与生物样品一起温育，以与其形式复合物，由此抑制朊病毒的感染性。

朊病毒病治疗药物

本发明的方法和组合物也提供治疗或预防哺乳动物朊病毒病的方法，所述哺乳动物包括但不限于人、绵羊、猪、牛、山羊、狗、猫和宠物。如上所述，PrP 转换成 PrP^{Sc} 时，酪氨酸二聚体中酪氨酸侧链取向变化或 YYX 表位(例如 YYR/D/Q)的成簇可能导致 PrP 的物理化学特性改变，例如疏水性和趋向聚集。这些残基也可能在 PrP^C 至 PrP^{Sc} 的转换反应中是重要的。如果这一点能得到证实，则治疗朊病毒病可以基于破坏、抑制、减弱或中和与 PrP^C 转换成 PrP^{Sc} 相关的生物学事件的拮抗剂。YYX (例如 YYR)肽免疫主动产生的抗体或被动转移的抗 YYX 多克隆抗体或单克隆抗体可用于治疗这些疾病。此

外，本发明不仅包括完整单克隆抗体，而且包括免疫活性抗体片段。这种片段的实例包括 Fab 片段或(Fab)₂ 片段、基因工程改造的单链 F_v 分子和嵌合抗体(例如“人源化”抗体)。本文所用的术语“人源化抗体”是指这样的抗体分子：改变非抗原结合区的氨基酸序列，使得
5 所述抗体更类似于人类抗体，而仍保留其原结合能力。按照本领域已知的标准方法，例如描述于以下文献的方法：Kutemeier 等 (*Biotechniques* 17:242-246, 1994); Major 等 (*Hum. Antibodies Hybridomas* 5:9-17, 1994); Jolliffe (*Int. Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993); Carter 等(*Biotechnology* 10:163-167, 1992); Miyachi 等(*J. Clin. Lab. Anal.*
10 6:343-50)和 Leung 等(*Mol. Immunol.* 32:1413-1427, 1995)，构建和特征鉴定人源化型非人类(例如小鼠)抗体。人源化抗体可能具有较低免疫原性并可用于被动免疫疗法。此外，本发明的嵌合抗体可以包括(如果需要)非人类抗体的可变区(例如小鼠可变区)和人类抗体的恒定区。在本发明的某些实施方案中，将抗体或抗体片段与可检测标记
15 连接。可检测标记的实例包括放射性标记、非放射性同位素标记、荧光标记、酶标记和比色标记。

此外，YYR 表位结构衍生的小分子(包括但不限于酪氨酸侧链衍生物)可以阻断所述转换反应。最后，直接化学修饰关键残基，例如酶解酪氨酸环，或用大量取代共价衍生酪氨酸环也可以破坏 PrP^C 至
20 PrP^{Sc} 的转换反应，如果证实 YYR 表位中的氨基酸在转换过程中是关键的话。

例如，这样的化合物可以采用本发明的抗体进行鉴定。因此，按照标准方法(例如平衡透析、Biacore 分析或竞争性抑制)，筛选组合文库或小分子文库或两者(参见下文)，鉴定具有抑制一种或多种抗
25 YYX 抗体与 YYX 表位结合作用的能力的化合物。抑制这种抗体结合的化合物可用于本发明的疗法中。鉴定后测试这类化合物抵抗任何合适模型系统朊病毒病的能力。

评价试验拮抗剂是否对朊病毒病的体内发生产生保护作用一般

涉及采用已知罹患这种疾病的动物(例如, Chandler, *Lancet* 6:1378-1379, 1961; Eklund 等, *J. Infectious Disease* 117:15-22, 1967; Field, *Brit. J. Exp. Path.* 8:129-239, 1969)。按照标准方法, 用试验化合物处理一种合适的动物(例如小鼠或仓鼠), 与未处理对照动物相比, 朊病毒相关疾病的发病率降低或发病或病程延迟, 则说明产生了保护作用。将试验化合物给予先前已注射朊病毒因子的动物, 或者, 使朊病毒和所述化合物预温育, 然后将朊病毒/化合物混合物注射到试验动物, 从而测试试验化合物中和朊病毒因子的能力。用于治疗或预防朊病毒病的分子(例如, 如上所述的拮抗剂)被称为“抗朊病毒治疗药物”。

另一方面, PrP^{Sc} 反应性循环抗体可能通过稳定 PrP^{Sc} 的构象而起恶化所述疾病的作用。因此, 阻断这些内源性抗体的作用可以减慢所述疾病的进程或具有其它有益效应。YYR 特异性单克隆抗体可以用作产生对 YYR 特异性抗体结合部位反应的另一组单克隆抗体的底物。第二组这些抗体被称为抗独特型抗体。抗独特型抗体可用于中和循环 PrP^{Sc} 反应性抗体。

按照本发明的抗朊病毒治疗药物可以与药学上可接受的稀释剂、载体、或赋形剂一起以单位剂型给予。例如, 可以使用常规药理学操作提供合适的制剂或组合物, 将这样的抗朊病毒治疗药物给予罹患朊病毒病或朊病毒病前症状或朊病毒病风险的动物。可以使用任何合适给药途径, 例如, 胃肠外、静脉内、皮下、肌内、颅内、眼眶内、眼、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、鼻内、气雾剂或经口给药。

用于制备制剂的本领域熟知的方法可在例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”中找到。用于胃肠外给药的制剂可以含有例如赋形剂、无菌水、或盐水、聚亚烷基二醇(例如聚乙二醇)、植物油或氢化萘。生物相容的、生物降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可以用于控制所述化合物的释放。用于抗朊病毒治疗化合物的其它潜在有效的胃肠外传递系统包

括乙烯乙酸乙烯酯共聚物粒子、渗透泵、植入输注系统和脂质体。吸入制剂可以含有赋形剂(例如乳糖),或可以为含有例如聚氧乙烯-9-十二烷基醚、甘胆酸盐和脱氧胆酸盐的水溶液,或可以为滴鼻剂形式或凝胶的油性溶液。

5 本发明的方法可以用于缓解或预防任何动物的本文所述疾病,所述动物例如人、家养宠物或家畜。当治疗非人类动物时,所使用的抗朊病毒治疗药物最好是该物种专有的治疗药物。

10 本说明书中所提及的所有出版物和专利申请通过引用结合到本文中,其引用程度与每个单独出版物或专利申请通过引用具体而单独地结合到本文中的程度一样。

其它实施方案在以下权利要求书的范围内。

序 列 表

- <110> 卡普利昂药品公司(Caprion Pharmaceuticals, Inc.)
- 5 <120> 朊病毒蛋白肽及其应用
- <130> 50111/002W02
- 10 <150> 60/140,634
 <151> 1999-06-23
- <160> 34
- 15 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
- 20 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 合成肽
- 25 <221> 变异体
 <222> (1)... (4)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
- 30 <400> 1
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1
- 35 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 40 <220>
 <223> 合成肽
- <221> 变异体
- 45 <222> (1)... (7)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 2
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5

5

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

10

<220>
 <223> 合成肽

15

<221> 变异体
 <222> (1)... (10)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

20

<400> 3
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10

25

<210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

30

<220>
 <223> 合成肽

35

<221> 变异体
 <222> (1)... (13)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

40

<400> 4
 Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10

45

<210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<221> 变异体
 <222> (1)... (16)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

5

<400> 5
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15

10

<210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

15

<220>
 <223> 合成肽

20

<221> 变异体
 <222> (1)... (19)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 6
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa

25

30

<210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

35

<220>
 <223> 合成肽

40

<221> 变异体
 <222> (1)... (22)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 7
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20

45

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 5 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 10
 <221> 变异体
 <222> (1)... (25)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

 15 <400> 8
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25

 20

 <210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 25 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 30
 <221> 变异体
 <222> (1)... (28)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

 35 <400> 9
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25

 40

 <210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 45 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

<221> 变异体
 <222> (1)... (31)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
 5
 <400> 10
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa
 10 20 25 30

 <210> 11
 <211> 34
 15 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽
 20

 <221> 变异体
 <222> (1)... (34)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
 25
 <400> 11
 Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr
 30 20 25 30
 Tyr Xaa

 35 <210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 40 <220>
 <223> 合成肽

 45 <221> 变异体
 <222> (1)... (4)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

 <400> 12
 Xaa Tyr Tyr Arg

1

- 5 <210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 10 <220>
 <223> 合成肽
- 15 <221> 变异体
 <222> (1)... (4)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
- 20 <400> 13
 Xaa Tyr Tyr Gln
 1
- 25 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 30 <220>
 <223> 合成肽
- 35 <221> 变异体
 <222> (1)... (4)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
- 35 <400> 14
 Xaa Tyr Tyr Asp
 1
- 40 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- 45 <220>
 <223> 合成肽
- <221> 变异体

<222> (1)... (13)

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 15

5 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa
1 5 10

<210> 16

10 <211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

15 <223> 合成肽

<221> 变形体

<222> (1)... (16)

20 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 16

25 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

30 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

35

<221> 变形体

<222> (1)... (19)

<223> Xaa = 任何氨基酸

40 <400> 17

Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
1 5 10 15
Tyr Tyr Xaa

45

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 5
 <221> 变异体
 <222> (1)... (22)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
 10
 <400> 18
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 15 20
 <210> 19
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 20
 <220>
 <223> 合成肽
 25
 <221> 变异体
 <222> (1)... (25)
 <223> Xaa = 任何氨基酸
 30
 <400> 19
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35 20 25
 <210> 20
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 40
 <220>
 <223> 合成肽
 45
 <221> 变异体
 <222> (1)... (28)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 20
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 5 Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 20 25

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<221> 变形体
 <222> (1)... (31)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 21
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 25 Tyr Tyr Xaa
 20 25 30

<210> 22
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<221> 变形体
 <222> (1)... (34)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 22
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 45 Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa

<210> 23
 <211> 37
 <212> PRT
 5 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成肽

 10
 <221> 变异体
 <222> (1)... (37)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

 15 <400> 23
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 20 Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35

 <210> 24
 25 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 30 <223> 合成肽

 <221> 变异体
 <222> (1)... (40)
 35 <223> Xaa = 任何氨基酸

 <400> 24
 Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 1 5 10 15
 40 Tyr Tyr Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa
 35 40

 45
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

5
<221> 变异体
<222> (1)... (10)
<223> Xaa = 任何氨基酸

10 <400> 25
Xaa Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
1 5 10

15 <210> 26
<211> 264
<212> PRT
<213> 牛(Bos taurus)

20 <400> 26
Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
1 5 10 15
Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
20 25 30
25 Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
35 40 45
Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60
30 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
65 70 75 80
Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys
100 105 110
35 Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala
115 120 125
Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala
130 135 140
40 Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr
145 150 155 160
Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro
165 170 175
Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn
180 185 190
45 Ile Thr Val Lys Glu His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn
195 200 205
Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met
210 215 220
Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly

<212> PRT

<213> 绵羊(Ovis aries)

<400> 28

5 Met Val Lys Ser His Ile Gly Ser Trp Ile Leu Val Leu Phe Val Ala
1 5 10 15
Met Trp Ser Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly
20 25 30
10 Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly
35 40 45
Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
50 55 60
Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His
65 70 75 80
15 Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly
85 90 95
Gly Ser His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met
100 105 110
20 Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu
115 120 125
Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His Phe
130 135 140
Gly Asn Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr
145 150 155 160
25 Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Arg Tyr Ser Asn Gln Asn
165 170 175
Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Gln His Thr Val
180 185 190
30 Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile
195 200 205
Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu
210 215 220
Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe Ser Ser
225 230 235 240
35 Pro Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly
245 250 255

<210> 29

40 <211> 254

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 29

45 Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
1 5 10 15
Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn
20 25 30
Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg

Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr
115 120 125
Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Met Met His Phe Gly Asn Asp
130 135 140
5 Trp Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Asn Arg Tyr Pro Asn Gln
145 150 155 160
Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Asn Asn Gln Asn Asn Phe Val
165 170 175
10 His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr
180 185 190
Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Ile Met Glu Arg
195 200 205
Val Val Glu Gln Met Cys Thr Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala
210 215 220
15 Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ala Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro
225 230 235 240
Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Met Val Gly
245 250

20
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

25
<220>
<223> 合成肽

30
<400> 31
Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
1 5

35
<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

40
<220>
<223> 合成肽

45
<400> 32
Cys Tyr Tyr Arg
1

<210> 33

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

5 <220>
<223> 合成肽

<400> 33
10 Cys Tyr Tyr Arg Arg Tyr Tyr Arg Tyr Tyr
1 5 10

15 <210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

20 <220>
<223> 合成肽

<400> 34
25 Cys Lys Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu
1 5 10

图 1A

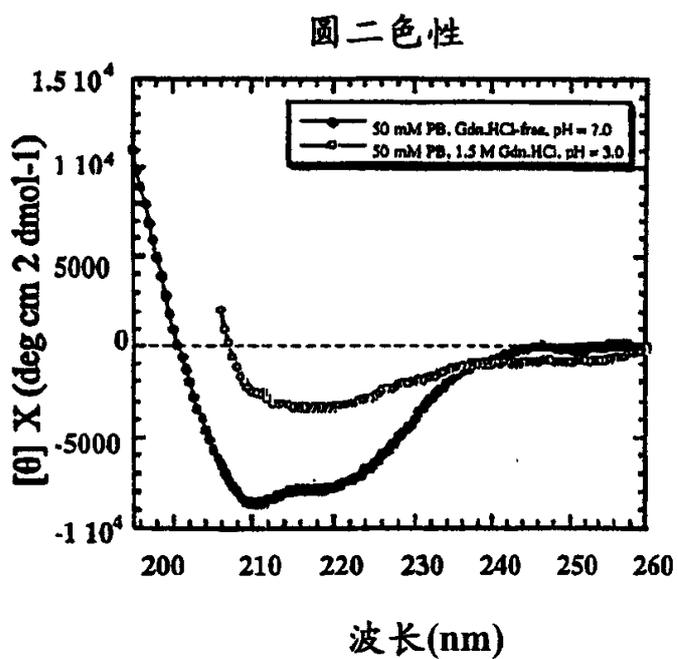
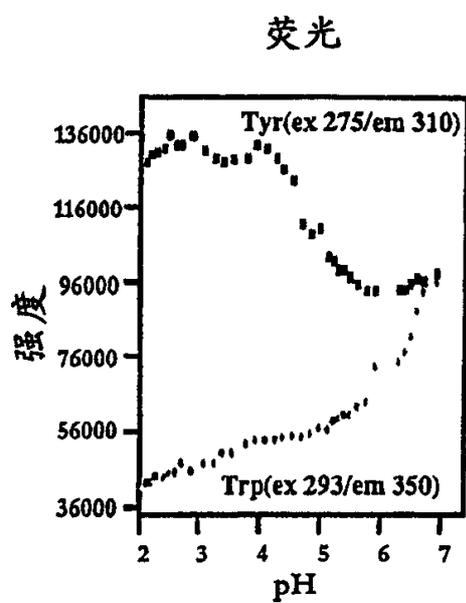


图 1B



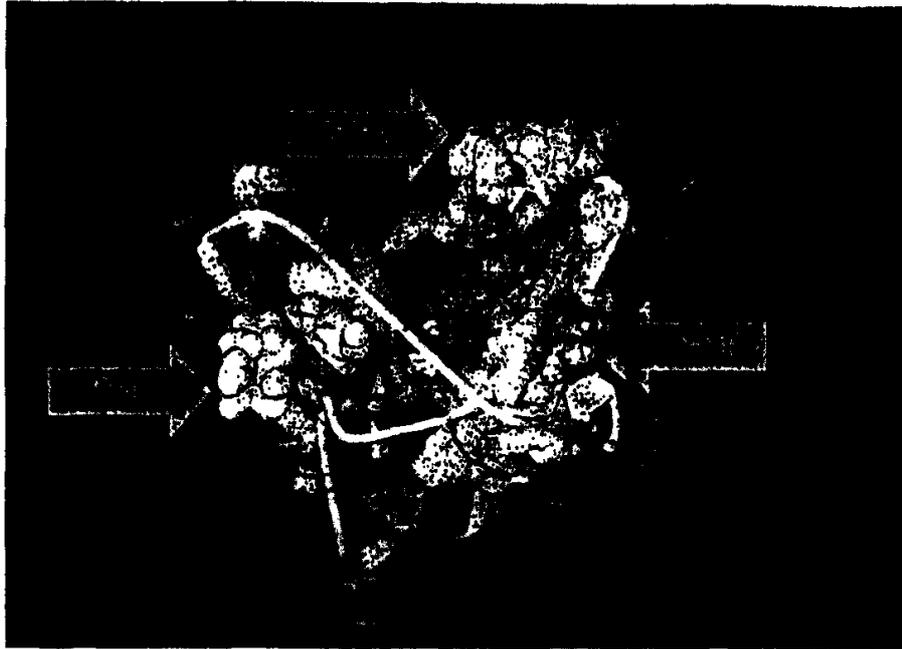
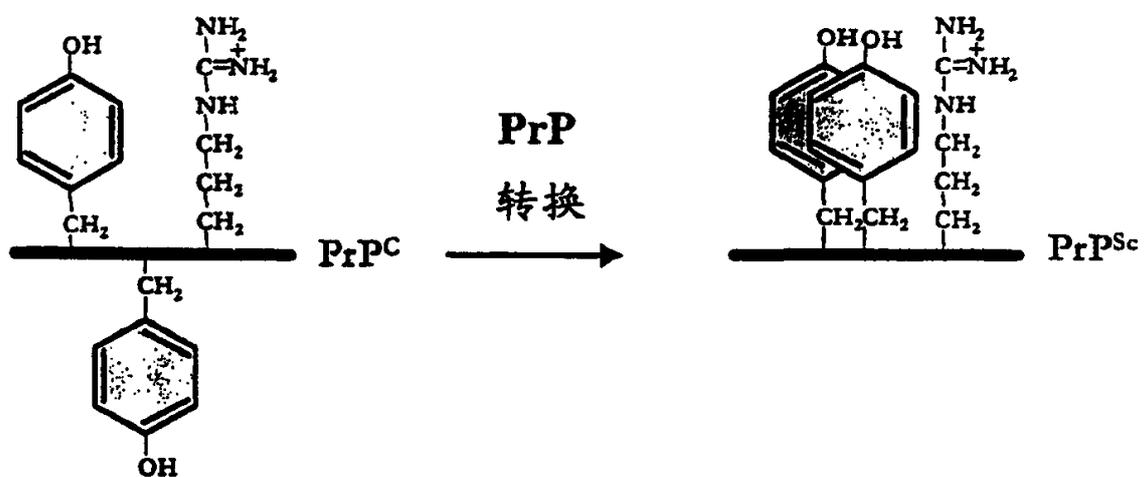


图 3

溶剂可及



溶剂不可及

图 4

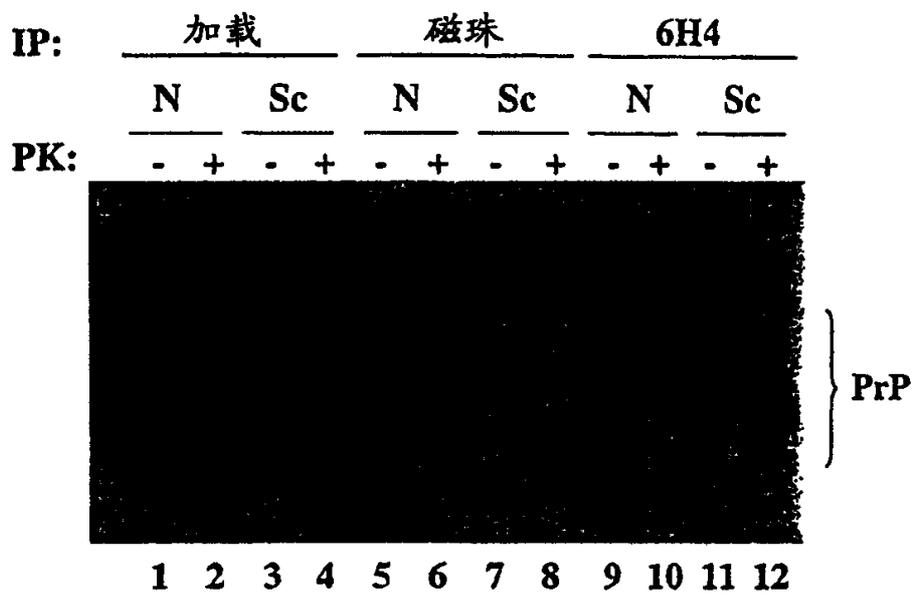


图 5

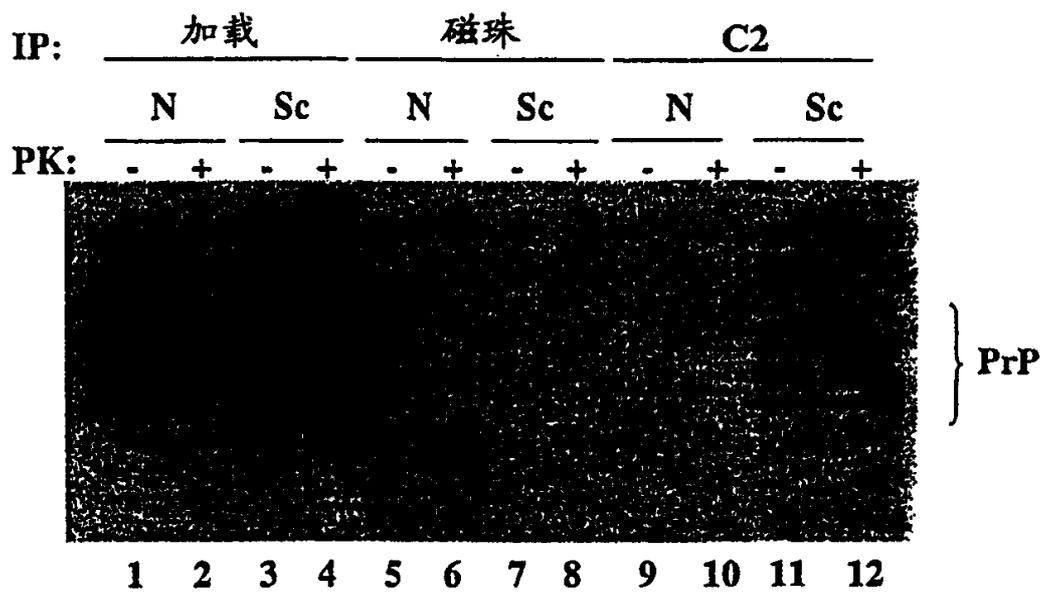


图 6

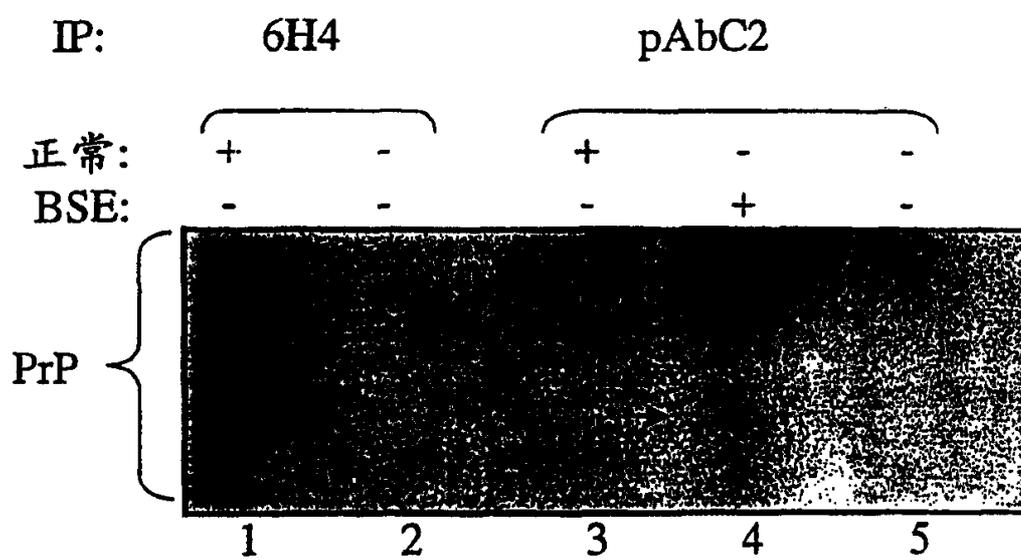


图 7

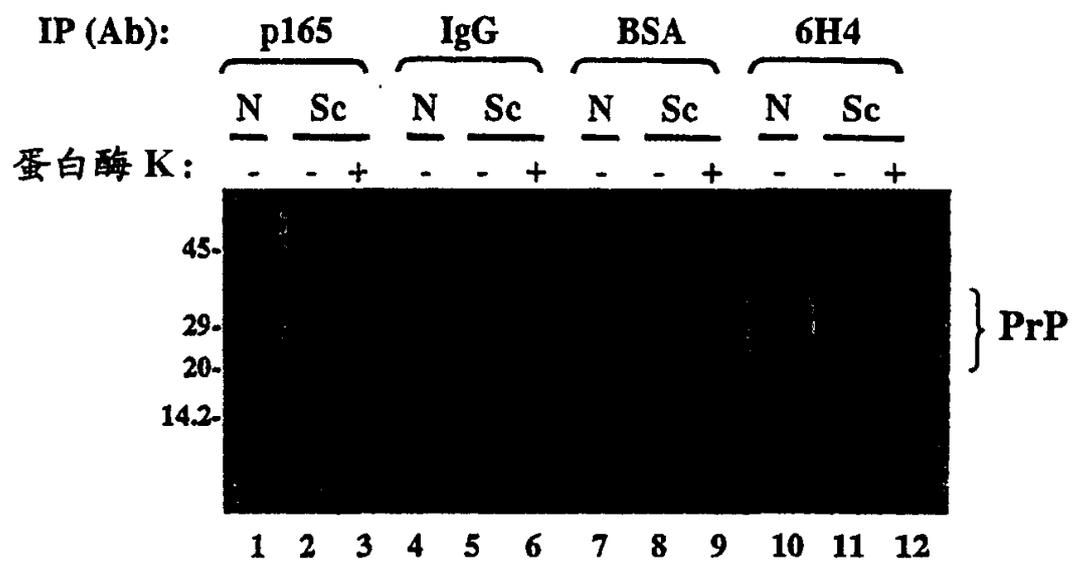


图 8

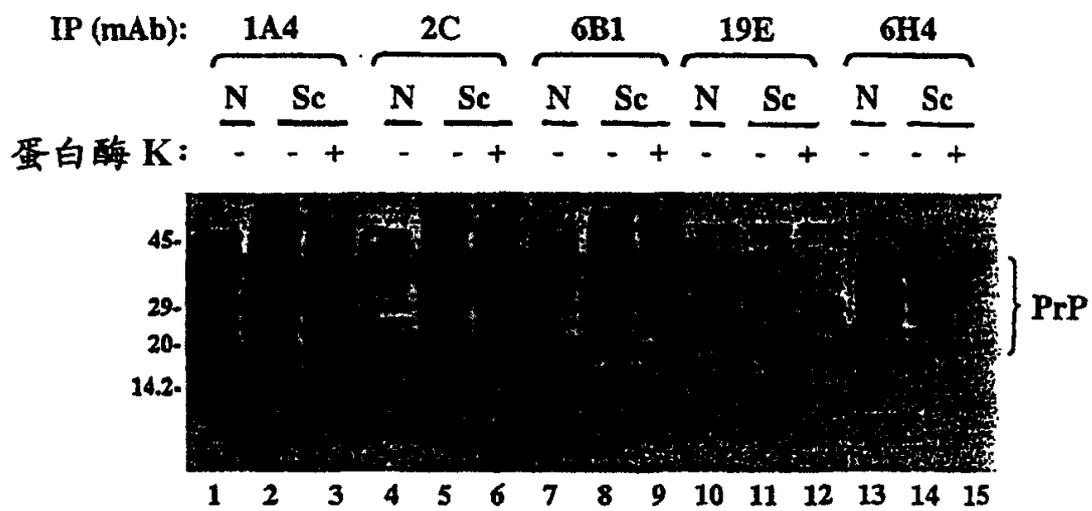


图 9

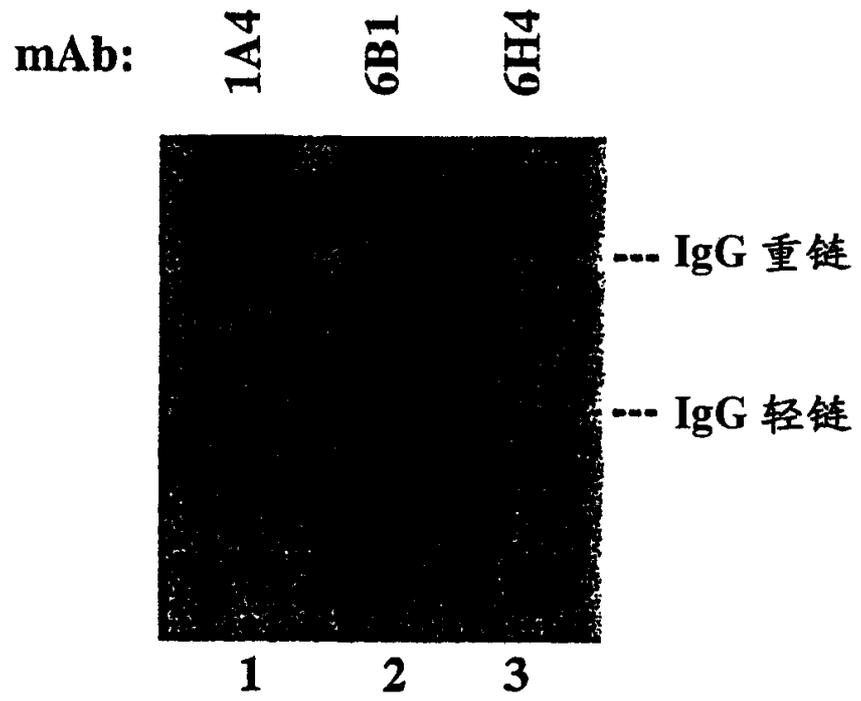


图 10

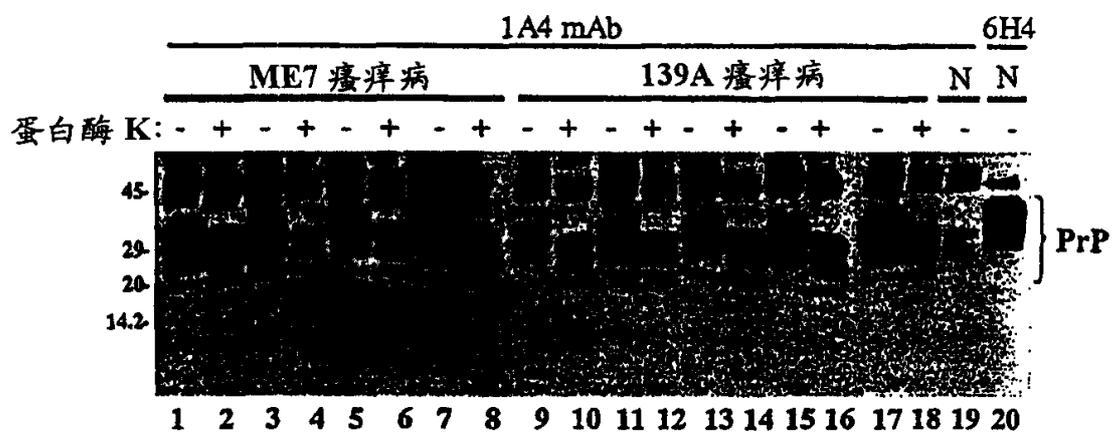


图 11

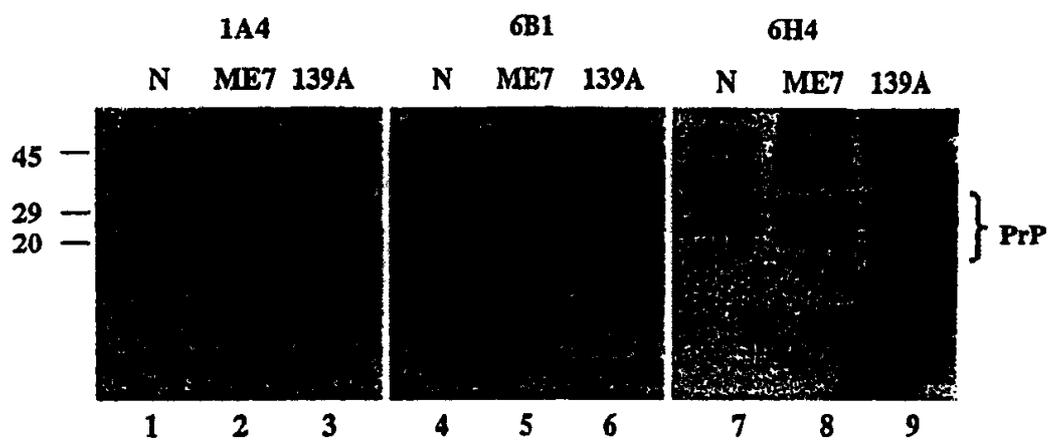
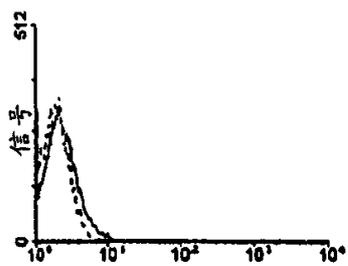
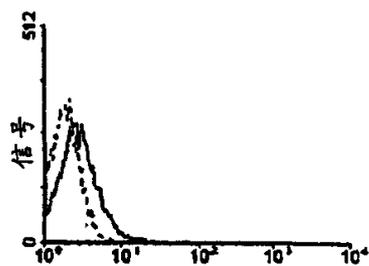


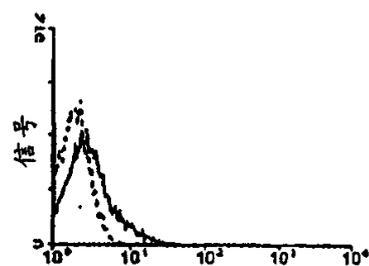
图 12



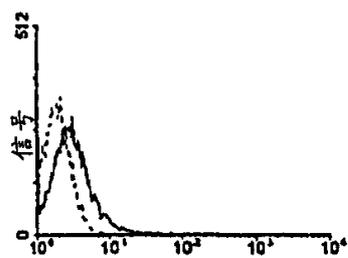
1A4-FITC



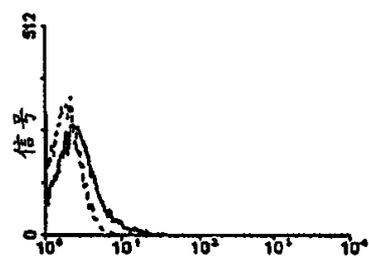
2B5-FITC



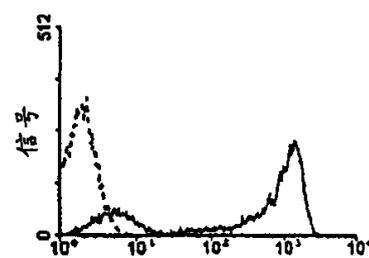
6B1-FITC



17B-FITC



18B-FITC



GAM Ig-FITC

图 13

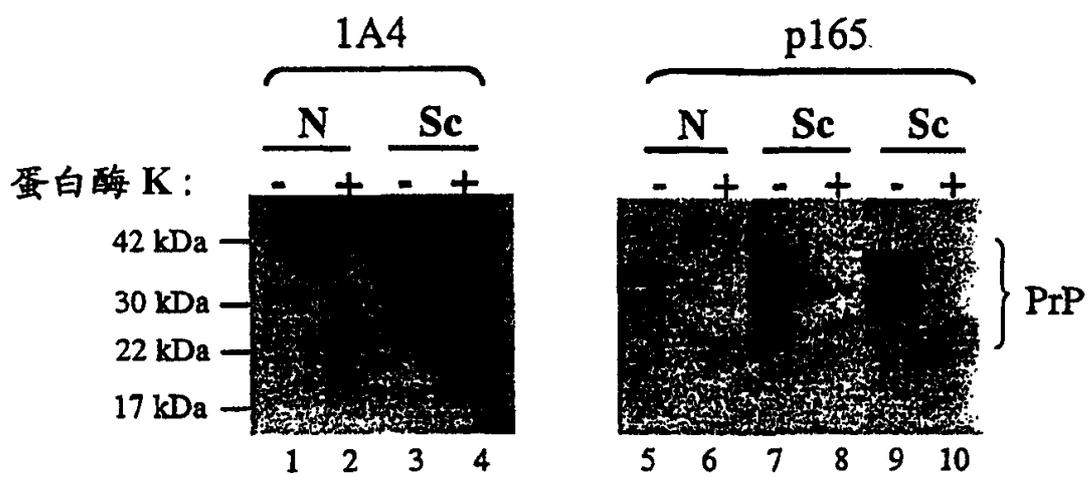


图 14

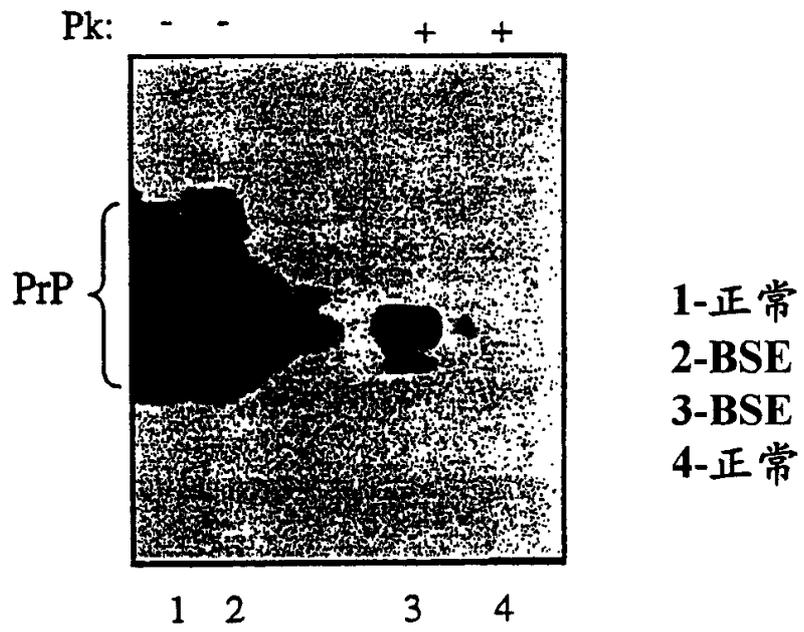


图 15

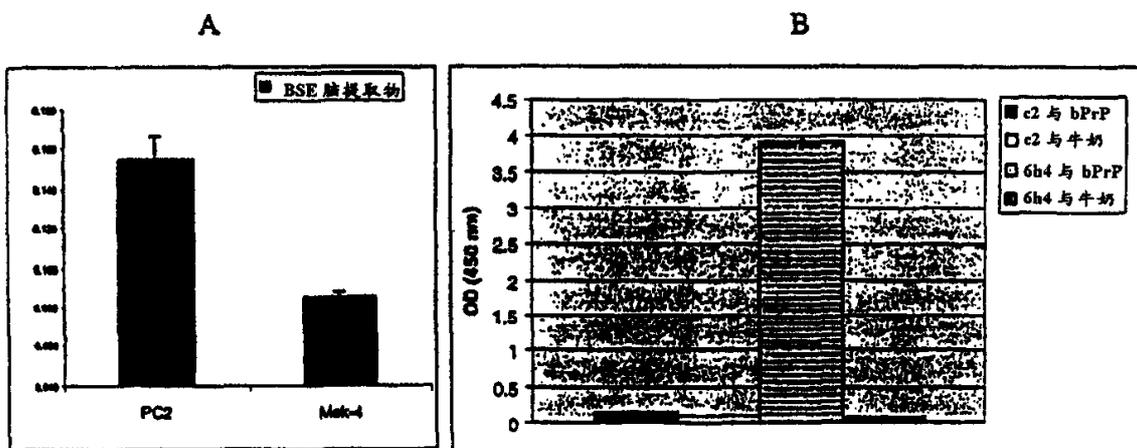


图 16

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 朊病毒蛋白肽及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN1370078A | 公开(公告)日 | 2002-09-18 |
| 申请号 | CN00811803.5 | 申请日 | 2000-06-23 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 卡普利昂药品公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 卡普利昂药品公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 卡普利昂药品公司 | | |
| [标]发明人 | NR卡斯曼 E帕拉米蒂奥蒂斯 A哈希哈特 M皮纳德 T劳顿 | | |
| 发明人 | N·R·卡斯曼 E·帕拉米蒂奥蒂斯 J·斯伦-乌萨基维茨 A·哈希哈特 M·皮纳德 T·劳顿 | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61P25/28 A61P31/00 A61P43/00 C07K5/087 C07K5/10 C07K7/00 C07K7/06 C07K14/00 C07K14/47 C07K14/76 C07K14/765 C07K14/795 C07K16/00 C07K16/18 C07K16/44 C07K19/00 C12N5/10 C12N9/36 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/577 A61K39/40 A61K39/395 A61K38/06 C12N5/06 | | |
| CPC分类号 | A61K39/00 A61K2039/505 A61P25/28 A61P31/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K5/1008 C07K5/1013 C07K7/06 C07K14/47 C07K16/18 C07K2317/52 | | |
| 代理人(译) | 姜建成 | | |
| 优先权 | 60/140634 1999-06-23 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

总的来讲本发明的特征在于PrPSc特异性抗体及其诊断、治疗和净化用途。本发明的特征还在于可用作制备PrPSc特异性抗体的免疫原以及用作治疗朊病毒病治疗药物的合成肽。

圖二色性

