

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/00

A61K 39/40 A61K 39/42

A61K 39/395 A61K 49/00

C07K 16/00 C12P 21/04

C12P 21/08 G01N 33/53

G01N 33/543 G01N 33/567



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00812776.X

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1450909A

[22] 申请日 2000.7.14 [21] 申请号 00812776.X

[30] 优先权

[32] 1999. 7. 15 [33] US [31] 09/353,348

[86] 国际申请 PCT/US00/19211 2000.7.14

[87] 国际公布 WO01/05426 英 2001.1.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.12

[71] 申请人 美国政府农业部

地址 美国华盛顿

[72] 发明人 K·I 奥洛克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 3 页 说明书 20 页 序列表 3 页

[54] 发明名称 用于检测作为传染性海绵状脑病指示的朊病毒蛋白的单克隆抗体和抗体混合物

[57] 摘要

描述了检测作为传染性海绵状脑病(TSE)指示的朊病毒蛋白或 PrP - Sc 蛋白的方法。一方面,本发明涉及特异结合朊病毒蛋白保守表位的单克隆抗体和使用所述抗体于免疫测定,以检测经固定或未经固定组织中作为存在 TSE 感染指示的 PrP - Sc。在另一方面,本发明涉及所述单克隆抗体与第二单克隆抗体组合的单克隆抗体混合物,所述第二单克隆抗体特异结合朊病毒蛋白的第二保守表位。所述混合物中的一种或两种单克隆抗体可以识别已经报道有自然 TSE 的所有哺乳动物物种和许多密切相关的物种中发现的表位。因此,尽管 PrP 蛋白在物种如反刍动物牲畜、猫、貂、人类和非人类灵长动物中有种间和种内变异,但所述抗体混合物提供了针对 PrP 蛋白的高灵敏度、确定的特异性和广谱反应性。

知识产权出版社出版

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

1. 一种单克隆抗体，所述单克隆抗体特异结合朊病毒蛋白的指明为 Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser 的保守表位，并且能够结合已经过处理以暴露 PrP-Sc 蛋白中的所述表位并消除 PrP-细胞相应表位的可及性的经固定或未经固定组织中的 PrP-Sc 蛋白。

2. 权利要求 1 的单克隆抗体，其中所述单克隆抗体与单克隆抗体 F99/97.6.1 所针对的表位结合。

3. 权利要求 2 的单克隆抗体，所述单克隆抗体指明为 F99/97.6.1。

4. 一种杂交瘤细胞系 ATCC HB-12696，所述杂交瘤细胞系产生并分泌单克隆抗体 F99/97.6.1，所述单克隆抗体特异结合朊病毒蛋白的指明为 Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser 的保守表位，而且结合已经过处理以暴露 PrP-Sc 蛋白中的所述表位并消除 PrP-细胞相应表位的可及性的经固定或未经固定组织中的 PrP-Sc 蛋白。

5. 一种单克隆抗体混合物，所述单克隆抗体混合物包含包括权利要求 1 的单克隆抗体的第一单克隆抗体与包括特异结合朊病毒蛋白的指明为 Ilr-His-Phe-Gly 的第二保守表位的第二单克隆抗体的组合，并且能够结合已经过处理以暴露 PrP-Sc 蛋白中的所述表位并消除 PrP-细胞相应表位的可及性的经固定或未经固定组织中的 PrP-Sc 蛋白。

6. 权利要求 5 的单克隆抗体混合物，其中所述第一单克隆抗体与单克隆抗体 F99/97.6.1 所针对的表位结合。

7. 权利要求 5 的单克隆抗体混合物，其中所述第二单克隆抗体与单克隆抗体 F89/160.1.5 所针对的表位结合。

8. 权利要求 5 的单克隆抗体混合物，其中所述第一单克隆抗体是 F99/97.6.1，而所述第二单克隆抗体是 F89/160.1.5 或 F89/193.1.5。

9. 一种用于检测动物或人类中的 PrP-Sc 蛋白的免疫检测方法，所述方法包括：

- (1) 从被测试的动物或人中获取组织;
 - (2) 固定或冷冻所述组织;
 - (3) 处理所述经固定或冷冻的组织, 以暴露针对 PrP-Sc 的表位并消除 PrP-细胞相应表位的可及性。
- 5 (4) 在如果 PrP-Sc 蛋白存在于所述组织中则可使包括(a)权利要求 1 的单克隆抗体或(b)权利要求 5 的单克隆抗体混合物的单克隆抗体结合 PrP-Sc 蛋白的条件下, 将所述经处理的组织与所述抗体接触, 和
- (5) 检测所述结合抗体的存在。
- 10 10. 权利要求 9 的方法, 其中所述组织是经固定的组织, 而且所述处理选自: (a)水合高压灭菌; (b)用甲酸处理, 之后进行或不进行水合高压灭菌; 和(c)用胰蛋白酶消化。
11. 权利要求 9 的方法, 其中所述组织是冷冻组织, 而且所述处理包括用蛋白酶 K 处理, 以消除 35K PrP-Sc 条带并显露蛋白酶 K 抗性 PrP-Sc 的特征性多个 28-32K 条带。
- 15 12. 权利要求 9 的方法, 其中所述单克隆抗体与单克隆抗体 F99/97.6.1 所针对的表位结合。
13. 权利要求 9 的方法, 其中所述单克隆抗体是 F99/97.6.1。
14. 权利要求 9 的方法, 其中所述抗体混合物包括与单克隆抗体 F99/97.6.1 所针对的表位结合的第一单克隆抗体和与单克隆抗体 F89/160.1.5 所针对的表位结合的第二单克隆抗体。
- 20 15. 权利要求 9 的方法, 其中所述第一单克隆抗体是 F99/97.6.1, 而所述第二单克隆抗体是 F89/160.1.5 或 F89/193.1.5。
16. 权利要求 9 的方法, 其中所述检测包括在使得可检测标记的抗小鼠免疫球蛋白试剂与所述抗体结合的条件下将所述抗体与所述试剂接触, 并且检测所述结合的试剂。
- 25 17. 权利要求 9 的方法, 其中所述检测包括:
- (a) 在使得可检测标记的抗小鼠免疫球蛋白试剂与所述抗体结合

的条件下，将所述抗体与所述试剂接触；

(b) 将所述试剂与酶-配体复合物接触，使得所述复合物与所述试剂上的所述标记结合；和

(c) 用显色底物检测所述酶-配体复合物。

5 18. 权利要求 9 的方法，其中所述动物选自反刍动物牲畜、猫、貂和非人类灵长动物。

 19. 权利要求 18 的方法，其中所述反刍动物牲畜选自绵羊、山羊、牛、黑尾鹿和马鹿。

10 20. 权利要求 9 的方法，其中所述组织是第三眼睑相关的淋巴组织、脑尸体解剖组织、淋巴结活组织检查组织或尸体解剖组织、或者脾活组织检查组织或尸体解剖组织。

用于检测作为传染性海绵状脑病指示的朊病毒蛋白 的单克隆抗体和抗体混合物

5

发明背景

1. 发明领域

本发明涉及作为传染性海绵状脑病(TSE)指示的朊病毒蛋白(也表示为 PrP-Sc 蛋白)的检测。具体地说, 本发明涉及(a)特异结合朊病毒蛋白保守表位的单克隆抗体, 和(b)所述单克隆抗体与特异结合朊病毒蛋白的第二保守表位的第二单克隆抗体组合的混合物。所述新的抗体和抗体混合物可用于免疫测定以检测反刍动物和自然发生 TSE 的其它物种或潜在暴露于 TSE 的相关物种中的朊病毒蛋白。

15

2. 领域描述

传染性海绵状脑病(TSE)是在人类、食草反刍动物、貂和猫中发生的一类异种致死性神经变性疾病。绵羊搔痒病是这一类的典型。TSE 的特征是在受感染个体的中枢神经系统中感染性形式的蛋白—朊病毒蛋白(也表示为 PrP-搔痒病或 PrP-Sc)的沉积。已经定义朊病毒为小的蛋白性感染性颗粒, 它抵抗通过修饰核酸的方法引起的失活。“朊病毒”一词是“蛋白质”和“感染”两词的缩写, 而且朊病毒如果不是仅由 PrP 基因编码的 PrP-Sc 分子组成, 则也是主要由其组成。因为受感染动物脑的死后显微镜下外观或组织病理学外观上, 在皮层和小脑中有大空泡, 所以朊病毒病经常称为海绵状脑病。朊病毒蛋白是正常哺乳动物糖蛋白(PrP-细胞的或 PrP-C)的翻译后修饰作用所产生的不溶性、蛋白酶抗性糖蛋白, 而 PrP-C 唾液酸糖蛋白的异常同种型 PrP-Sc 蛋白沉积在中枢神经系统中是 TSE 感染的可靠的标志。

25

在食用家畜中最广泛研究的 TSE 包括绵羊和山羊的搔痒病、牛的

牛海绵状脑病(BSE)(也称为“疯牛”病)以及黑尾鹿和马鹿的慢性消耗性疾病(CWD)。动物中的其它 TSE 包括貂的传染性貂脑病(TME)和家猫和非家猫的猫海绵状脑病(FSE)。最近,报道了法国动物园中非人类灵长类中的 TSE;这种疾病可能源自 BSE (Bons 等人, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4046-4051(1999))。也已经鉴定了人类的朊病毒疾病。这些包括:克-雅病(CJD); Gerstmann-Straussler-Scheinker 综合征(GSS); 致死性家族失眠症(FFI)和库鲁病。

这些疾病的感染性因子仍在争论之中。然而,如上所述,哺乳动物唾液酸糖蛋白(PrP-细胞或 PrP-C)的不溶性同种型(朊病毒或 PrP-Sc)是感染性物质中的主要成分。看来朊病毒蛋白的搔痒病同种型(PrP-Sc)是动物和人类传播性神经变性疾病的传播和发病所必需的(参见 S. B. Prusiner, *Science* 252:1515-1522 (1999)和 S. B. Prusiner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13363-13383 (1998))。主导的假设是朊病毒疾病是由于成核现象或聚合作用, PrP-C 转换为 PrP-Sc 的结果。

在英国和欧洲的牛中和在美国部分地区的黑尾鹿和马鹿中发生新的传染性海绵状脑病,已经加强了对可靠诊断测试的需求。而且,牛流行的 TSE 以及它与人类克-雅病新变种的假定关系(M. E. Bruce 等人, *Nature* 389:498-501 (1997)和 A. F. Hill 等人, *Nature* 389:448-450 (1997))已经增强了公众和科学界对这些相对罕见疾病的认识,并且已经突出了临床前检测 TSE 的需要。尽管在美国没有检测到 BSE 的病例,但是灵敏的免疫组织化学技术和临床前检测方法是检测、监视和控制 TSE 的基础。

朊病毒病可以有长的潜伏期。例如,在绵羊中从动物受感染时到首次呈现病征为止可以经历 3-5 年。牛海绵状脑病(BSE)从动物受感染时到首次呈现病征为止可以经历 2-8 年。受感染的动物和人类既没有疾病特异性免疫应答,也没有生物化学、血液学以及总体病理学的异

常。因此，传染性海绵状脑病的早期诊断可能依赖于临床体征、脑电图或采用脑活组织检查的侵入性方法。通过对可疑病例脑组织的死后显微镜检查或组织学检查完成 TSE 的证实。反刍动物 TSE 的死后组织病理学诊断基于神经元空泡化、海绵状变化、神经胶质增生和星形细胞增生的出现。然而，根据宿主物种、个体、宿主遗传学、疾病期和传染源，这些可以在强度上和解剖学位置上有所不同。因此，在早期病例中仅通过组织病理学诊断可能不明确，而且在自溶的组织中通常是不可能的。

朊病毒蛋白(PrP-Sc)在中枢神经系统中的沉积是 TSE 的可靠标志。因此免疫组织化学检测 PrP-Sc 是诊断、监视和控制 TSE 的组织病理学的重要的附加手段。单克隆抗体 263K 3F4 (美国专利号 4,806,627) 检测仓鼠和人类的 PrP-Sc，并已经在人类 TSE 的诊断测定和发病机理研究方面得到广泛应用。主要的缺点是它不能与来自绵羊和牛的 PrP 反应(R. J. Kascsak 等人, *Immunological Investigations* 26:259-268 (1997))。与反刍动物 PrP-Sc 反应的兔抗血清所具有的缺点是：由于数量和特异性的限制，它不能标准化以广泛应用。因为单克隆抗体在数量上不受限制，而且其特异性可以准确地限定在单一表位的水平上，所以单克隆抗体优于兔抗血清。然而，这种特异性对于含有多态 PrP 基因的物种可能是缺点。导致表位中一个氨基酸置换的单个碱基变化可以消除抗体结合。人类 PrP 基因至少含有 18 种导致遗传性朊病毒疾病的致病突变(J. Collinge 等人, *Philos. Trans. Royal Soc. Lond. [Biol.]* 343:371-378 (1994))，而且含有许多非致病突变，其中的一种(密码子 129)与医源性 CJD、散发性 CJD 和变异性 CJD 的素因有关(J. Collinge 等人, *Lancet* 337:1441-1442 (1991); M. S. Palmer 等人, *Nature* 352:340-342 (1991); M. Zeidler 等人, *Lancet* 350:668 (1997))。M. Horiuchi 等人(*Journal of General Virology* 76:2583-2587 (1995))描述了一组合成肽，所述合成肽产生在所选择的绵羊组织和牛组织的免疫印迹中与 PrP-细胞(非疾病相关蛋白)反应的单克隆抗体和多克隆抗体。

他们没有报道对于检测疾病相关的同种型 PrP-Sc 的有效性。另外，他们没有报道对于检测福尔马林固定的组织中 PrP-C 或 PrP-Sc 的有效性。

5 用组织学测定和免疫组织化学测定对脑组织进行朊病毒疾病的死后诊断。怀疑患有 CJD 的人的死前测试是通过脑活检组织的免疫组织化学和组织检查进行的。另外，患有与暴露于 BSE 有关的变异性 CJD 的个体在淋巴组织中 PrP-Sc 积聚(A. F. Hill 等人, *Lancet* 349:99 (1997))。淋巴组织中 PrP-Sc 的存在将变异性 CJD 与散发性疾病或家族性疾病区分。因为在反刍动物中脑活组织检查是不可行的，另一种基于 W. J. Hadlow 等人的观察(*The Journal of Infectious Diseases* 146:657-664 (1982))的方法一直是活组织检查所选择的淋巴结。Hadlow 等人证明，在某些淋巴结(咽后淋巴结、扁桃体、肠系膜淋巴结、肩胛骨前淋巴结、支气管-纵隔淋巴结和脾淋巴结)和感染搔痒病的绵羊的肠淋巴组织中可检测到感染性。在发现朊病毒蛋白之前进行的 Hadlow 研究，
10 通过小鼠接种检测到感染性。Race 等人(*American Journal of Veterinary Reserch* 53:883-889 (1992))，Ikegami 等人(*Veterinary Recard* 128:271-275 (1991))和 van Keulen 等人(*Journal of Clinical Microbiology* 34:1228-1231 (1996))采用多克隆抗血清通过对选定淋巴结的蛋白质免疫印迹或免疫组织测定，进行了相似的研究。活组织检查具有变异性
15 CJD 临床体征的人的扁桃体组织是侵入性比脑活组织检查小的方法，淋巴组织的免疫测定可以用于诊断变异性 CJD 并将它与家族性、医源性和散发性的 CJD 区分开。然而，在反刍动物牲畜中，扁桃体或淋巴组织取样的主要缺点包括：这些内部组织的取样需要昂贵的侵入性方法，包括具有其伴发的危险和恢复期的全身麻醉；绵羊淋巴组织经常
20 受细菌—假结核棒杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*)感染，该菌破坏该淋巴结的结构而限制它在这些测定中的应用；和扁桃体组织捕获环境抗原，包括真菌抗原，其中一些抗原与 PrP-Sc 有交叉反应，因而给出不明确或错误的阳性免疫组织化学反应，而这些必须通过在
25

技术上苛求的蛋白质印迹测定来解决。最近, O'Rourke 等人(The Veterinary Record, 1998年5月2日, 第489-491页)描述了采用瞬膜(第三眼睑)淋巴组织中临床前检测绵羊 PrP-Sc 的非侵入性诊断测定。

5 当前美国联邦准则要求毁灭感染搔痒病的绵羊, 一些州要求毁灭在随后诊断患有搔痒病的母羊分娩小羔羊后 60 天内出生的羊群中的所有绵羊。这样的根除方法对该产业来说很昂贵的。另外, 美国绵羊大、多肉而且长得快。许多国家为了遗传学的目的渴望购买美国绵羊, 但是因为存在搔痒病而被阻止这样做。

10 在英国和欧共体流行的 BSE 已经致使生产者和消费者由于直接的牲畜损失和间接的牛肉和牛肉副产品包括经济上很重要的药品的市场损失而蒙受了巨大损失。世界上绵羊和牛肉生产国进行昂贵监督和检疫计划, 以维持它们不发生 BSE 的状况。最重要的是来自几个科学调查机构的数据已经提供了强有力的证据, 证实在英国 BES 已经感染了人类。这种新的疾病的范围仍需检测。

15 所需要的是适合于检测来自人类、食用家畜、宠物和动物园的非驯养动物的组织中 PrP-Sc 的实用免疫测定试剂系统。这种测定试剂必须适合于检测每个物种中 PrP 基因型不同的个体的 PrP-Sc; 而且在各种各样的标准实验方法中使用时灵敏且具特异性。

20 发明概要

本发明涉及检测作为传染性海绵状脑病指示的朊病毒蛋白或 PrP-Sc 蛋白的方法。在一个实施方案中, 本发明包括特异结合朊病毒蛋白上鉴定为 Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser 的保守表位的单克隆抗体, 和采用所述抗体的免疫测定方法, 包括免疫组织化学测定和蛋白质印迹法。
25 所述抗体可用于检测经固定或未经固定的组织中作为存在 TSE 感染指示的 PrP-Sc。

在第二实施方案中, 本发明包括上述的单克隆抗体与第二单克隆抗体组合的单克隆抗体混合物, 所述第二单克隆抗体与朊病毒蛋白上

指明为 Ile-His-Phe-Gly 的第二保守表位特异结合。后一抗体在顺序号 08/950, 271 中描述。令人惊奇的是, 我们已经发现, 尽管 PrP 蛋白有种间和种内变异, 但针对 PrP 蛋白不重叠的、分离的表位的抗体组合(这里表示为单克隆抗体混合物)仍提供了针对 PrP 蛋白的高灵敏度、确定的特异性和广谱反应性的最佳组合。这种混合物中的一种或两种单克隆抗体可以识别在已经报道了自然 TSE 的所有哺乳动物物种和许多紧密相关的物种中发现的表位。

本发明还包括采用第一个实施方案的所述抗体和所述抗体混合物的免疫测定方法, 包括免疫组织化学测定、蛋白质印迹和斑点印迹。

第一个实施方案的所述抗体和本发明的所述抗体混合物可以用于采用第三眼睑淋巴组织检测 PrP-Sc 的非侵入性诊断测定, 如顺序号 08/950,271 所描述的那样。反刍动物的瞬膜或第三眼睑(瞬膜)由具有浅淋巴滤泡的软骨片和球表面结膜之下的浆粘液分泌腺组成。包括绵羊、山羊、黑尾鹿、马鹿和牛在内的反刍动物具有第三眼睑。瞬膜相关的淋巴组织样品可以通过外翻第三眼睑而容易收集。一般在更为苍白的腺组织上可见两丛淋巴组织。可以只采用局部麻醉进行淋巴结活组织检查。然后, 将收集的组织样品经受能够检测朊病毒或 PrP-Sc (如果在组织中存在的话)的免疫组织化学方法或其它蛋白检测方法。因此, 第三眼睑代表了易于从活的动物获得或在屠宰时从动物中取样获得的用于测试组织的样本。这种检测方法提供了非常需要的早期检测 PrP-Sc 的实用方法, 并且提供临床前诊断 TSE 的方法。

按照这一发现, 本发明的一个目的是提供识别朊病毒蛋白保守表位的单克隆抗体和一种泛特异性(pan-specific)抗体混合物, 所述泛特异性抗体混合物包含针对自然发生 TSE 的物种(人类、牛、绵羊、山羊、鹿、马鹿、貂、家猫和非家猫、几种非家畜反刍动物和动物园中的许多非人类灵长类动物)和潜在暴露于 TSE 感染的其它密切相关物种中的朊病毒蛋白上不重叠、分离的表位的单克隆抗体。所述抗体检测经固定、处理的组织中作为存在 TSE 感染指示的 PrP-Sc, 提供了诊断 TSE

的灵敏的试剂混合物。这些针对 PrP-Sc 上保守表位的单克隆抗体试剂提供了特异性的、可靠而灵活的准确诊断 TSE 的工具。所述抗体的应用包括作为用于标准化诊断测试的试剂和用于比较病理学研究的试剂。

5 本发明的再一个目的是提供检测作为 TSE 标志的朊病毒或 PrP-Sc 的方法，包括受感染活动物的临床前检测和死后检测方法。

本发明的另一个目的是提供基于第三眼睑淋巴组织活组织检查和 PrP-Sc 原位检测的作为早期检测 PrP-Sc 的实用方法的非侵入性诊断测定。

10 又一个目的包括可用于反刍动物和人类 TSE 诊断研究和发病机理研究以及可用于检测、监督和控制 TSE 的免疫测定方法。

本发明的其它目的和优点将在接着的描述中变得显而易见。

发明详述

15 在第一实施方案中，本发明包括特异结合朊病毒蛋白上鉴定为 Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser 的保守羧基表位的单克隆抗体。所述单克隆抗体与已经过处理以暴露 PrP-Sc 表位而且消除相应 PrP-C 表位的可及性的经固定或冷冻组织中 PrP 蛋白上的表位结合。为了本发明的目的，词语朊病毒或 PrP-Sc 定义为作为 TSE 标志的疾病相关蛋白。因为所述
20 抗体可检测经固定、处理的组织中或用蛋白酶 K 预处理以降解 PrP-C 的冷冻组织中作为存在 TSE 感染指示的 PrP-Sc，所以它们提供了诊断 TSE 的灵敏试剂。

如以下实施例 2 中描述的方法获取本发明的抗体。简单地说，合成代表羊残基 217-233 (牛残基 225-241) Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-
25 Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Gly-Ala 的肽，将其与马来酰亚胺活化的 KLH 偶联以用作免疫原。筛选与重组绵羊 PrP 具有反应性的来自接种小鼠的抗血清和单克隆抗体，以选择交叉反应性抗体。随后表明这些抗体具有与绵羊、黑尾鹿和马鹿、牛的福尔马林固定的、水合高压

灭菌的组织中 PrP-Sc 的反应性。

为了本发明的目的，本发明所包括的特异结合 PrP-Sc 所述保守表位的单克隆抗体，是对于 PrP 基因产物的所述表位(包括肽 Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser)具特异性的那些抗体，并可检测冷冻的、未经处理组织中的 PrP-C 和经固定的或冷冻的、处理组织中的 PrP-Sc。在经固定或未经固定的、处理组织中结合这种保守表位的单克隆抗体的例子是单克隆抗体 F99/97.6.1。所述抗体的同种型是 IgG1。

本发明也包括采用所述抗体的免疫测定方法，包括免疫组织化学测定和蛋白质印迹。所述抗体可用于检测经固定或未经固定的组织中作为存在 TSE 感染指示的 PrP-Sc。

在第二个实施方案中，本发明包括上述的单克隆抗体与特异结合绵羊、黑尾鹿、马鹿和牛中指明为 Ile-His-Phe-Gly 的 PrP 基因产物的第二保守表位的第二单克隆抗体组合的单克隆抗体混合物。这些单克隆抗体在顺序号 08/950,271 中详述，其内容通过引用全部结合到本文中。这种表位还被鉴定为包含所述羊(绵羊) PrP 基因产物的氨基酸 142-145，所述氨基酸与鹿(黑尾鹿和落矶山鹿) PrP 基因产物的氨基酸 142-145 和牛 PrP 基因产物的氨基酸 150-153 相同。所述抗体还有这样的特性，即它们检测固定的或冷冻的组织中 PrP-Sc 蛋白的暴露的表位，因此它们可用作在自然发生 TSE 的绵羊、山羊、牛、黑尾鹿和马鹿中诊断 TSE 的试剂。PrP-Sc 的存在指示受搔痒病、牛脑病或慢性消耗性疾病感染的动物。

与经固定的或冷冻的、处理的反刍动物组织中 PrP-Sc 保守表位 Ile-His-Phe-Gly 结合的所述单克隆抗体的例子是单克隆抗体 F89/160.1.5。这种抗体的同种型是 IgG1。单克隆抗体 F89/160.1.5 的免疫组织化学染色模式与搔痒病侵袭的绵羊的脑中采用针对绵羊或仓鼠 PrP 的多克隆兔抗血清描述的模式相似。特异结合单克隆抗体 F89/160.1.5 所针对的表位的另一种单克隆抗体的例子是单克隆抗体 F89/193.1.5。

已经报道了山羊中单克隆抗体 F89/160.1.5 和 F89/193.1.5 的所述表位中一个氨基酸残基的遗传变异(密码子 142 中 Ile 变为 Met) (W. Goldmann 等人, *Journal of General Virology* 77:2885-2891 (1996))和所述表位侧翼的绵羊基因密码子 141 中的一个突变(Phe 变为 Leu) (A. Bossers 等人, *Journal of General Virology* 77:2669-2673 (1996))。尽管这些变异只在这些物种的小亚群中发生,但是存在所述变异或尚未鉴定的其它变异可能阻止这些单克隆抗体与朊病毒蛋白结合的可能性,因此用于检测、监视和控制 TSE 包括遗传变异体的灵敏的免疫组织化学方法和临床前检测方法是重要的。

令人惊奇的是,我们已经发现,尽管 PrP 蛋白有种间和种内变异,但针对这两种不重叠的、分离的表位的抗体组合(这里表示为单克隆抗体混合物)提供了针对 PrP 蛋白的高灵敏度、确定的特异性和广谱反应性的最佳组合。本发明的所述单克隆抗体混合物似乎检测自然发生 TSE 的所有物种和所有已知的变异。所述抗体检测未经固定或经固定、处理的组织中作为 TSE 存在指示的 PrP-Sc,并提供用于诊断 TSE 的灵敏的试剂混合物。对存储在 GenBank 中的 PrP 序列(表 1)的检查表明,所述抗体混合物将检测绵羊、牛、人类、鹿、马鹿、貂、家猫和 56 种非家畜反刍动物和非人类灵长动物的 PrP 基因产物上的表位。所述抗体结合福尔马林固定的组织中不重叠的表位,而将任一种抗体浓度加倍的灵敏度比所述抗体以相同的浓度组合的灵敏度小。针对每种表位的抗体和所述抗体混合物可检测经固定或冷冻、处理组织中作为存在 TSE 感染指示的 PrP-Sc,提供用于诊断 TSE 的灵敏试剂。可用于测试 PrP-Sc 的组织样品包括第三眼睑相关的淋巴组织、脑尸体剖检组织、淋巴结活组织检查组织或尸体剖检组织、或脾活组织检查组织或尸体剖检组织。所述单克隆抗体形成抗原-抗体复合物,而通过免疫学方法如酶联免疫吸附测定、蛋白质印迹测定、斑点印迹测定、免疫装饰(immunodecoration)和免疫细胞化学来检测结合的抗体。

保藏声明。根据布达佩斯条约,产生和分泌单克隆抗体 F99/97.6.1

的连续细胞系(杂交瘤)于1999年4月6日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110-2209 USA, 并且已经指定保藏号为 ATCC HB-12696。根据布达佩斯条约, 产生和分泌单克隆抗体 F89/160.1.5 的连续细胞系(杂交瘤)于1997年9月24日保藏于 ATCC, 并且已经指定保藏号为 ATCC HB-12403。根据布达佩斯条约, 产生和分泌单克隆抗体 F89/193.1.5 的连续细胞系(杂交瘤)于1999年5月25日保藏于 ATCC, 并且已经指定保藏号为 PTA-114。

表 1: PrP 基因产物包含表位 Ile-His-Phe-Gly 和/或 Gln-Tyr-Gln-Arg-Gln-Ser 的物种

旋角羚(Addax nasomaculatus)	大猩猩(Gorilla gorilla)
非洲矮小山羊	
叉角羚(Antilocapra americana)	貂羚(Hippotragus niger)
夜猴(Aotus trivirgatus)	Homo sapiens (人), 所有报道的变异体
黑掌蛛猴(Ateles geoffroyi)	白掌长臂猿(Hylobates lar)
红脸蛛猴(Ateles paniscus) x 褐头蛛猴 (ateles fusciceps)	马来亚长臂猿(Hylobates syndactylus)
欧洲野牛(Bison bonasus)	短尾猴(Macaca arctoides)
爪哇野牛(Bos javanicus)	食蟹猴(Macaca fascicularis)
原始牛(Bos primigenius)	日本猴(Macaca fuscata)
原牛(Bos Taurus) (牛)	猕猴(Macaca mulatta)
羚羊(Budorcas taxicolor)	豚尾猴(Macaca nemestrina)
暗黑伶猴(Callicebus moloch)	叟猴(Macaca sylvanus)
狨(Callithrix jacchus)	Mandrillus sphinx
单峰驼(Camelus dromedarius)	长爪沙鼠(Meriones unguiculatus)
家犬(Canis familiaris)	小家鼠(Mus musculus)
家山羊(Capra hircus) (山羊), 两种报道 的变异体	Mustela spp (貂)
努比亚北山羊(Capra ibex nubiana)	林鼬(Mustela putorius)
卷尾猴(Cebus apella)	Odocoileus hemionus hemionus (黑尾鹿)
Cercocebus aterrimus	Odocoileus virginianus (弗吉尼亚鹿)
白颌白眉猴(Cercocebus torquatus atys)	穴兔(Oryctolagus cuniculus)
黛安娜长尾猴(Cercopithecus diana)	麝牛(Ovibos moschatus)
加纳长尾猴(Cercopithecus mona)	土耳其盘羊(Ovis aries) (家绵羊), 所有 报道的
德氏长尾猴(Cercopithecus neglectus)	黑猩猩(Pan troglodytes)
Cercopithecus patas	埃及狒狒(Papio Hamadryas)
Cervus elaphus spp (马鹿)	猩猩(Pongo pygmaeus)
梅花鹿(Cervus Nippon dybowskii)	黑叶猴(Presbytis francoisi)
Chlorocebus aethiops	松鼠猴(Saimiri sciureus)
东黑白疣猴(Colobus guereza)	茶腹棉鼠(Sigmodon fulviventer)
野马(Equus caballus)	Sigmodon hispidus
Equus przewalskii	野猪(Sus scrofa)
Felis catus	狮尾狒(Theropithecus gelada)
鹅喉羚(Gazella subgutturosa)	扭角林羚(Tragelaphus strepsiceros)
长颈鹿(Giraffa camelopardalis)	帚尾袋貂(Trichosurus vulpecula)

采用所述抗体的免疫测定方法也包括于本发明中。简单地说, 为

了检测 PrP-Sc, 从被试者获取组织样品; 固定所述组织, 例如, 通过本领域熟知的在福尔马林或多聚甲醛中保存。接着, 处理所固定的组织切片, 以暴露 PrP-Sc 的表位并消除在正常动物的组织中表达的 PrP-细胞相应表位的可及性。这可以通过以下步骤方便地进行: (a)水合高压灭菌, 例如通过将在水或缓冲液中水合的切片于 121°C, 20-30 分钟进行高压灭菌, 然后冷却; (b)用 95-99%的甲酸处理 5-30 分钟, 之后进行或不进行水合高压灭菌, 或(c)用胰蛋白酶消化(例如在 tris HCL 缓冲液 pH 7.6 中 0.1%的胰蛋白酶, 37°C处理 20 分钟)。使经固定、处理的组织与一定量本发明的所述单克隆抗体或单克隆抗体混合物在有效结合 PrP-Sc 蛋白(如果组织中存在 PrP-Sc)的条件下接触。如实施例中所指出的, 组织样品与约 3-5 $\mu\text{g/ml}$ 的任一种所述单克隆抗体或与每种单克隆抗体约 3-5 $\mu\text{g/ml}$ 的混合物在合适的缓冲液中温育 30 分钟, 使所述抗体结合于所述保守的 PrP-Sc 表位上。通过本领域熟知的方法检测所结合的抗体。在一个方面, 如下检测结合于组织上的所述单克隆抗体: 通过将它与可检测标记的(酶、放射性或荧光检测分子或生物素分子)抗小鼠免疫球蛋白(例如 IgG1)试剂在使得标记的抗小鼠免疫球蛋白试剂与所述单克隆抗体结合的条件下接触, 并且随后可以通过酶标记、放射性标记或荧光标记的活性或通过将生物素标记与用酶分子、放射性分子或荧光分子标记的抗生物素蛋白/链霉抗生物素分子的结合, 来检测结合于组织上的所述单克隆抗体。在优选的实施方案中, 通过抗小鼠免疫球蛋白试剂如生物素化抗小鼠 IgG 和辣根过氧化酶标记的链霉抗生物素试剂的顺序温育, 以及在缓冲液如 Tris-HCL-Tween 20 中间插洗涤, 而进行检测。加入指示剂色原体如 AEC 以检测结合的抗体。

或者, 在去垢剂中将冷冻的组织匀浆, 用蛋白酶 K 处理以消除 35K PrP-C 条带并显露蛋白酶 K 抗性 PrP-Sc 片段的特征性多个 28-32K 条带。在聚丙烯酰胺凝胶上分离所处理的蛋白并将其转移到滤膜上。让滤膜与一定量的本发明单克隆抗体或本发明的所述单克隆抗体混合物

在有效结合 PrP-Sc 蛋白(如果组织中存在 PrP-Sc)的条件下接触。如上所述检测所述抗体或抗体混合物，只是优选的最后检测步骤包含化学发光底物。

5 如上所讨论的，本发明的抗体可用于 TSE 的诊断和发病机理研究。

实施例

下面的实施例只想进一步说明本发明，而不是想限制权利要求中确定的本发明的范围。

10

实施例 1

以下的实施例描述采用本发明的所述混合物对羊淋巴组织进行的 PrP-Sc 检测测定。

所测试的动物。通过瞬膜淋巴组织的活组织检查，从来自无已知暴露于搔痒病感染的母羊的羊群的 27 头萨福克羊或亲缘黑脸品种取
15 样。从来自暴露于搔痒病的羊群的 47 头绵羊中尸体剖检取样；至少收集脑、咽后淋巴结和扁桃体。通过免疫组织化学检测，所有组织均为 PrP-Sc 阴性，并且没有一个表现出搔痒病特征性的病变。对 45 头绵羊在其活着时取样，然后在尸体剖检时再次取样，或只在观察到搔痒病的临床体征后安乐死的时候取样。至少收集脑和瞬膜淋巴组织。来自
20 全部 45 头绵羊的脑样品为脑中 PrP-Sc 积聚阳性，并诊断为患有如 National Veterinary Services Laboratories, Ames IA 所定义的搔痒病。

简单地说，采用常规组织病理学方法制备来自瞬膜和/或咽后淋巴结的淋巴组织，只是在包埋之前用甲酸(99% 1 小时)净化大部分组织。将三个显微切片固定在玻片上。将所述切片编码，并提交给三个实验
25 室进行免疫染色。为所有实验室提供终浓度为每种抗体 0.5mg/ml 的单克隆抗体 F89/160.1.5 和 F99/97.6.1 的混合物。样品也在 Department of Agriculture、Agricultural Research Servies、Animal Disease Research Unit (USDA、ARS、ADRU)重测试。采用 Ventana Medical Systems, Inc.

的自动免疫染色仪和厂家推荐用于辣根过氧化酶/AEC 检测(ADRU)或碱性磷酸酶/固红检测(实验室 1)的试剂,测定 ADRU 和实验室 1 的样品。实验室 2 用 DAKO 试剂包采用 DAKO 自动免疫染色仪对切片进行染色,实验室 3 用先前描述的试剂(J. M. Miller 等人, *Journal of Veterinary Diagnosis Investigation* 6:366-368 (1994))采用自动毛细管间隙免疫染色仪(capillary gap immunostainer)染色。结果在 ADRU 制成表格。

在无已知暴露于搔痒病的 27 头绵羊中,26 个样品被所有实验室记录为阴性;一个样品被一个实验室(实验室 3)记录为阳性。在暴露搔痒病、但在 ADRU 采用免疫染色测定在脑或淋巴结中没有显示 PrP-Sc 迹象的 47 头绵羊中,42 个样品被所有三个实验室记录为阴性。5 个样品被实验室 3 记录为阳性。在患有搔痒病、诊断为脑 PrP-Sc 免疫染色阳性的 45 头绵羊中,44 个样品在 ADRU 重测试时为阳性,43 个样品在实验室 2 和 3 为阳性。

总的来说,这项研究说明,单克隆抗体 F89/160.1.5 和单克隆抗体 F99/97.6.1 的混合物在多种常规实验条件下可检测绵羊的淋巴组织中的 PrP-Sc。第三眼睑淋巴组织免疫组织化学测定是灵敏(93%)且特异性(100%)的羊瘙痒病诊断测试。大约在潜伏期的 1/3 时可以鉴别受感染的绵羊。所述测定也可用于遗传易感性、传播途径和发病机理的研究。单克隆抗体 F89/160.1.5 和 F99/97.6.1 的广谱物种反应性使这种试剂混合物适宜用于来自自然发生 TSE 的所有物种的神经组织和周围神经组织的免疫组织化学和免疫印迹测定,并且适宜用于监视在野外环境下和动物园中暴露于 TSE 的相关物种。

25

实施例 2

下面的实施例描述特异结合反刍动物和其它动物以及人类中 PrP-Sc 的保守表位的单克隆抗体的制备及其表征。

简单地讲,用代表羊 PrP 基因产物的氨基酸 217-233 (牛 PrP 基因

产物的氨基酸 225-241)的 KLH 缀合合成肽免疫 5 只小鼠。如顺序号 08/950,271 所描述, 采用重组绵羊 PrP 融合蛋白为抗原, 通过 ELISA 筛选抗血清和杂交瘤上清液。细胞系 99/97 产生 ELISA 反应性抗体, 并被选择用于通过有限稀释进行两轮克隆。将来自两度克隆的系 (F99/97.6.1) 的杂交瘤细胞转移到体外人工毛细管细胞培养生产系统。含浓度为 2-4mg/ml 的单克隆抗体 F99/97.6.1 (IgG1) 的组织培养上清液通过表位作图、免疫印迹分析和免疫组织化学进一步鉴定。

抗原制备和单克隆抗体生产。合成代表牛朊病毒基因(Horiuchi 等人)的残基 225-241 的肽 $\text{NH}_2\text{-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Gly-Ala-COOH}$, 并将其与马来酰亚胺活化的匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)(Pierce Chemical Company)偶联。采用在 200 μl 弗氏完全佐剂中乳化的总共 10 μg 的缀合肽在两处皮下接种 5 只 6 周龄 BALB/c 小鼠。以 14 天的间隔, 给予两次在 200 μl 弗氏不完全佐剂中乳化的 10 μg 的缀合肽加强接种。采用重组羊 PrP-C 为抗原, 通过 ELISA 测定经尾静脉静脉穿刺收集的血清(见下述)。在细胞融合前三天, 采用不含佐剂的磷酸盐缓冲液(PBS)中的 10 μg 缀合肽静脉内免疫小鼠。按照标准方案通过有限稀释进行细胞融合和克隆(W. M. Yokoyama, 载于: J. E. Coligan (编辑), *Current Protocols in Immunology*, Wiley intersciences, 纽约, 第 2.2.1-2.5.17 页(1994))。通过重组羊 PrP-C ELISA, 筛选原代杂交瘤和克隆杂交瘤的上清液。选择来自细胞系 F99/97 的克隆 6.1, 并将其转移到人工毛细管细胞培养系统(CellMax, CellCoLnc.)中, 用于体外生产单克隆抗体上清液。每天收集并且合并上清液。通过 ELISA 鉴别重链同种型, 并通过免疫扩散测定单克隆抗体浓度。

在大肠杆菌中生产重组绵羊 PrP-C。从萨福克羊的外周血单核细胞中分离基因组 DNA。用经修饰以加入 *EcoRI* 限制位点的侧翼引物扩增 PrP 可读框(D. Westaway 等人, *Genes Devel.* 8:959-969 (1994)):

正向引物: 5'-ATCGAATTCAAGAAGCGACCAAAAC-3'

反向引物: 5'-ATCGAATTCAGACACCACCACT-3'。

用 *EcoRI* 消化 700bp PCR 产物, 在琼脂糖凝胶上纯化, 并连接到 pMal-cRI 载体中。按照常规技术转化大肠杆菌菌株。通过采用克隆引物对菌落小量制备物进行 PCR, 筛选转化子。选择一种阳性克隆 (shPrP-pMal-l) 用于大规模融合蛋白表达。通过在直链淀粉树脂柱上亲和层析从细菌溶菌液中分离融合产物 ShPrP-MBP, 并用 10mM 麦芽糖洗脱。采用针对 PrP 肽 NH₂-Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Asn-Gln-Trp-Asn-Lys-Pro-Ser-Lys-COOH (R2843) (K. I. O'Rourke 等人, *J. Gen. Virol.* 75:1511-1514 (1994)) 的兔抗血清, 通过蛋白质免疫印迹筛选流分。

酶联免疫吸附测定(ELISA)。用在 50 μ l 0.05M 碳酸盐缓冲液 pH 9.6 中的 6.25 μ g/孔的重组 ShPrP-MBP 融化蛋白包被 Immulon 2 平板, 在 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 1:15 稀释的市售的基于牛奶的封闭剂(KPL, Gaithersburg, MD)封闭所述平板 1 小时。在室温下, 将 50 μ l 抗血清或杂交瘤上清液在每个孔板中温育 30 分钟。平板用山羊抗小鼠辣根过氧化物酶和 2,2'-连氮-双-[3-乙基-苯并噻唑啉磺酸]显色(R. Fatzer 等人, *Zentralbl. Veterinarmed. A.* 43:23-29 (1996)) (ABTS) (KPL, Gaithersburg, MD)。在 405nm 读取光密度。阴性对照包括未接种小鼠的血清, 不相关特异性的同种型匹配的单克隆抗体的上清液或调节为 15%胎牛血清的组织培养基。阳性对照孔与兔抗 PrP 肽抗血清(R2843)一起温育, 并用山羊抗兔-HRPO 和 ABTS 显色。阳性孔的 OD₄₀₅ 高于 4 个阴性对照孔的平均值之上的两个标准偏差。

单克隆抗体 F99/97.6.1 所结合表位的确定。采用本领域熟知的常规技术(Sigma-Genosys), 在膜支持体上合成跨越 Val-Glu-Gln-Met-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Gly-Ala-Ser-Val-Ile-Leu-Phe 的一组重叠的肽, 每种肽含有 6 个氨基酸。在与抗小鼠-IgG-辣根过氧化物酶和化学发光底物一起温育并将滤膜对 Kodak X-omat 胶片曝光之后, 目测单克隆抗体 F99/197.6.1 结合各种肽的能力。

自然发生 TSE 的食草反刍动物的来源以及 PrP 基因序列。通过免疫组织化学,测试来自 34 头具有搔痒病组织病理学损害的绵羊的脑组织与单克隆抗体 F99/97.6.1 的反应性。已经采用兔抗仓鼠 PrP 多克隆抗血清在这些样品的 20 个样品中经免疫组织化学检测到 PrP-Sc, 而通过免疫印迹在这 20 个样品的 6 个样品中检测到 PrP-Sc (J. M. Miller, *Diagn Invent.* 5:309-316 (1993))。将无搔痒病组织损害且在蛋白质印迹分析中没有检测到 PrP-Sc 的三头绵羊用作阴性对照。这些组织由兽医药学院(veterinary medical colleges)和国家诊断实验室(state diagnostic laboratories)的病理学者或由 USDA Animal and Plant Health Inspection Service 的人员提供。自然发生 CWD 的 10 头黑尾鹿(*Odocoileus hemionus hemionus*)和 4 头马鹿(*Cervus elaphus nelsoni*)的脑样品由科罗拉多州诊断实验室(Colorado State Diagnostic Laboratory)和科罗拉多州野生动物局(Colorado Division of Wildlife)提供。来自 10 头患有 BSE 的牛和 5 头 BSE 阴性牛的未经染色的切片由 the Pathobiology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories, USDA-APHIS, Ames, IA 提供。这些切片的石蜡封闭物来源是英国的 Gerald Wells 博士, 农业、渔业和食品部中心兽医实验室(Ministry of Agriculture, Fishers and Food, Central Veterinary Laboratory), New Haw, Surrey, United Kingdom。

用于 PrP 基因型分析的冷冻脑组织可从 34 头搔痒病阳性绵羊中的 12 头、全部 10 头患有 CWD 的黑尾鹿和 42 头 CED 侵袭的马鹿中获得。血样也可从 150 头健康的黑尾鹿和 244 头健康的马鹿中获得。通过上述的聚合酶链反应,扩增所述绵羊的 PrP 基因可读框,并通过自动荧光染色标记的双脱氧链终止法,在两条链上对密码子 112-240 的多态区测序(K. I. O'Rourke 等人, *Anim. Biotech.* 7:15-162 (1996))。采用种特异性引物:

正向 5'CTGCAAGAAGCGACCAAAACC

反向 5'CACAGGAGGGGAGGAGAAGAGGAT

在标准条件下(只是将 Mg^{+2} 的浓度提高到 2.5mM)对 100-800ng 黑尾鹿

或马鹿的基因组 DNA 进行扩增。采用通常产生密码子 106-224 信息的正向引物 5'GGCTATCCACCTCAGGGAG

反向引物 5'TCACACTTGCCCCCTCTTTGGT

在两条链上对 PCR 产物测序。

5 免疫印迹分析。如 Race 等人所描述的(参见上文),通过从 Sarkosyl 缓冲液差速离心,从具有搔痒病临床体征的绵羊的脑中分离 PrP-Sc。通常,采用超声处理将 0.3g 脑在 50mM Tris-HCl、5mM MgCl₂, pH 7.4 中匀浆。将匀浆调至 80 μg/ml 的核糖核酸酶和 20 μg/ml 的脱氧核糖核酸酶,并在 37°C 温育 1 小时。加入等体积的 20%(w/v)的 Sarkosyl,并
10 在室温下温育 1.5 小时。在 20°C 下经过 2,000xg 离心 30 分钟后,取出上清液并在 20°C 下 200,000xg 离心 2.5 小时。沉淀的材料在 300 μl 50mM 的 Tris-HCl, pH 7.4 中通过超声处理重悬浮。在 37°C 下将悬浮液调至 10 μg/ml 的蛋白酶 K 达 1 小时,以水解 PrP-C。加入 Pefaloc (Boehringer Mannheim)终止酶活性后,在 20°C 下将所述悬浮液于
15 200,000xg 离心 1 小时。所述沉淀在 300 μl SDS 样品缓冲液中煮沸用于免疫印迹分析。在 15%的聚丙烯酰胺凝胶上分离不同的量并将其转移到 PVDF 膜(Millipore)上。所述膜用 3 μg/ml 的 F99/97.6.1、同种型的对照单克隆抗体或用 100 倍摩尔浓度的过量的肽 Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Gly-Ala 预吸附以特异性消除
20 单克隆抗体反应性的 3 μg/ml 的 F99/97.6.1 显色。用辣根过氧化酶缀合山羊抗小鼠 IgG1 (Caltag Laboratores)检测结合的抗体,并用化学发光底物(ECL, Amersham)显现结合的抗体。将滤膜对胶片(Amersham Hyperfilm)曝光 20-120 分钟。

25 免疫组织化学。通过浸入和包埋于石蜡中,将脑于 10%的缓冲福尔马林中固定。用苏木精和曙红对每个组织块的一个切片染色,用于常规组织病理学分析。将另外的组织切片固定在硅烷处理的玻片上,用于免疫组织化学分析。将切片脱蜡并水合。将切片在 99%的甲酸中温育 5 分钟,然后冲洗,用 0.1M Tris-HCl, pH 7.6 中和。在高压灭菌

器或高压锅于改良的柠檬酸盐缓冲液 pH 6.1 (DAKO TR 缓冲液)中在 121°C 热处理切片 20 分钟。将玻片顺序在以下物质中温育：过氧化氢缓冲液，以封闭内源辣根过氧化酶；单克隆抗体混合物 F89/160.1.5 和 F99/97.6.1，在 Tris-casein 稀释液中每种 3 µg/ml (37°C，32 分钟)；生物素化山羊抗小鼠 IgG (37°C，8 分钟)；链霉抗生物素-辣根过氧化酶(37°C，8 分钟)；AEC/过氧化氢(37°C，8 分钟)；然后用苏木精复染。将组织固定在水性固定介质中以加上盖玻片。阴性对照包括(1)用相似浓度的相同同种型(IgG1)的不相关单克隆抗体代替所述单克隆抗体混合物，和(2)如组织病理学和蛋白质印迹分析中所指出的，将所述单克隆抗体与无搔痒病的绵羊的脑和淋病组织一起温育。

黑尾鹿和马鹿 PrP 基因序列。鉴定出所述黑尾鹿 PrP 序列的三个等位基因。等位基因 138S2 (GenBank 登记号 AF009180)和 138N1 (登记号 U97331)在密码子 138 编码 Ser 和 Asn。等位基因 S1 (登记号 AF009181)与等位基因 S2 的不同之处是一个沉默突变。发现马鹿 PrP 基因的两个等位基因(GenBank AF016227、AF016228)，它们在密码子 132 编码 M→N 的取代。

结果

表位作图和序列测定。采用一组重叠肽，将单克隆抗体 F99/97.6.1 所识别的表位作图。发现残基 220-225 (Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser)足以满足抗体结合。这种序列在牛、黑尾鹿、马鹿、山羊、人类和绵羊以及在具有患 TSE 风险的 32 种物种中的等位基因的推断的氨基酸序列是保守的。在 F89/160.1.5 的结合部位具有多态性的变异的土耳其盘羊(山羊)等位基因(GenBank X91999)和紧接 F89/160.1.5 的表位之前具有多态性的变异的土耳其盘羊(绵羊)等位基因上发现所述表位(在 A. Bossers 等人, *Archives of Virology* 144:829-834 (1999)中有引述)。

与来自 TSE-侵袭的绵羊的 PrP-Sc 的免疫印迹反应性。通过蛋白质印迹分析来自患有自然搔痒病的绵羊以及正常绵羊的 PrP-Sc 制备

物，评价单克隆抗体 F99/97.6.1 的特异性。在搔痒病侵袭的绵羊脑的提取物中检测到表观分子量在 28-35K 之间的肽条带。在正常绵羊脑的提取物中或当使用同种型匹配的对照单克隆抗体时或当 F99/97.6.1 被包含其结合表位的所述肽吸附时，不能检测到条带。

5 来自正常反刍动物和 TSE 侵袭的反刍动物的组织的免疫组织化学。通过免疫组织化学，进一步评价单克隆抗体 F99/97.6.1 对按常规加工用于组织病理学检测的福尔马林固定的石蜡包埋脑组织的反应性。所有 TSE 侵袭的动物在所选择的脑干和中脑核中有神经纤维网海绵形成、神经元内空泡和神经胶质增生，这些是 TSE 的诊断性损害。
10 至少选择中脑(在吻丘水平)和末脑(在脑干水平)用于免疫组织化学检测。需要通过高压灭菌热处理以暴露结合单克隆抗体 F99/97.6.1 的 PrP-Sc 表位。

 检测患有自然搔痒病的绵羊、患有 CWD 的黑尾鹿和马鹿以及患有 BES 的牛的脑中的阳性染色。反应性限制在中脑和脑干中的灰质，
15 集中在受侵袭的核中，并且存在于神经纤维网中和神经元及神经胶质细胞内。大多数免疫染色由神经灰质神经纤维网中的致密颗粒或随机的斑组成。PrP-Sc 经常聚集在邻近神经胶质细胞核的地方，并在组织病理学上鉴定为小胶质细胞(没有可识别的细胞质的小的、椭圆形至有角的含染色质多的核)的神经胶质细胞周围以分支模式积聚。PrP-Sc 偶
20 尔在血管周围和室管膜下形成边状，暗示有星形胶质细胞足突。神经元反应性包括在神经元胞体中的点状免疫染色、或在神经元膜中或者在血管周围的神经胶质细胞突起中 PrP-Sc 给神经元细胞明显装边。有
25 和没有神经元内空泡的神经元都具有 PrP-Sc 反应性。在用所述单克隆抗体 F99/97.6.1 免疫染色的未受侵袭的绵羊、鹿、马鹿或牛的脑中或在用同种型对照单克隆抗体免疫染色的受搔痒病侵袭的绵羊或 BSE 阳性的牛的脑中，没有检测到反应性。

 人们理解，给出前面的描述只是为了说明，可以在不偏离于本发明的精神和范围的情况下作出多种修改和改变。

-
- <110> O' Rourke, Katherine I.
- 5 <120> 用于检测作为传染性海绵状脑病指示的朊病毒蛋白的单克隆抗体和抗体混合物
- <130> ORourke
- <140> 09/353, 348
- 10 <141> 1999-07-15
- <160> 11
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- 15 <210> 1
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Ovis aries
- 20 <400> 1
- Gln Tyr Gln Arg Glu Ser
- 1 5
- 25 <210> 2
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Bos taurus
- 30 <400> 2
- Ile His Phe Gly
- 1
- 35 <210> 3
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Ovis aries
- 40

<400> 3
 Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly
 1 5 10 15

5 Ala

<210> 4
 <211> 25
 10 <212> DNA
 <213> *Ovis aries*

<400> 4
 atcgaattca agaagegacc aaaac 25
 15

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 20 <213> *Ovis aries*

<400> 5
 atcgaattca gacaccacca ct 22
 25

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mesocricetus auratus*
 30

<400> 6
 Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys
 1 5 10 15

35 <210> 7
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> *Ovis aries*

40 <400> 7
 Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr

1	5	10	15
	Tyr Gln Arg Gly Ala Ser Val Ile Leu Phe		
	20	25	
5			
	<210> 8		
	<211> 21		
	<212> DNA		
10	<213> <i>Odocoileus hemionus hemionus</i>		
	<400> 8		
	ctgcaagaag cgacaaaac c		21
15			
	<210> 9		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> <i>Odocoileus hemionus hemionus</i>		
20			
	<400> 9		
	cacaggaggg gaggagaaga ggat		24
25			
	<210> 10		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> <i>Odocoileus hemionus hemionus</i>		
30			
	<400> 10		
	ggctatccac ctcaggag		19
35			
	<210> 11		
	<211> 22		
	<212> DNA		
	<213> <i>Odocoileus hemionus hemionus</i>		
40			
	<400> 11		
	tcacacttgc cccctctttg gt		22

专利名称(译)	用于检测作为传染性海绵状脑病指示的朊病毒蛋白的单克隆抗体和抗体混合物		
公开(公告)号	CN1450909A	公开(公告)日	2003-10-22
申请号	CN00812776.X	申请日	2000-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府农业部		
申请(专利权)人(译)	美国政府农业部		
当前申请(专利权)人(译)	美国政府农业部		
[标]发明人	KI奥洛克		
发明人	K·I奥洛克		
IPC分类号	A61P31/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/28 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/68 A61K39/00 A61K39/40 A61K39/42 A61K39/395 A61K49/00 C07K16/00 C12P21/04 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	G01N2800/2828 C07K16/2872 C07K2317/34 C07K14/47 G01N2333/4709 G01N2333/70596 G01N33/6896 A61P31/00		
代理人(译)	刘玥		
优先权	09/353348 1999-07-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了检测作为传染性海绵状脑病(TSE)指示的朊病毒蛋白或PrP - Sc蛋白的方法。一方面,本发明涉及特异结合朊病毒蛋白保守表位的单克隆抗体和使用所述抗体于免疫测定,以检测经固定或未经固定组织中作为存在TSE感染指示的PrP - Sc。在另一方面,本发明涉及所述单克隆抗体与第二单克隆抗体组合的单克隆抗体混合物,所述第二单克隆抗体特异结合朊病毒蛋白的第二保守表位。所述混合物中的一种或两种单克隆抗体可以识别已经报道有自然TSE的所有哺乳动物物种和许多密切相关的物种中发现的表位。因此,尽管PrP蛋白在物种如反刍动物牲畜、猫、貂、人类和非人类灵长动物中有种间和种内变异,但所述抗体混合物提供了针对PrP蛋白的高灵敏度、确定的特异性和广谱反应性。