[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580005514.5

[43] 公开日 2007 年 2 月 28 日

[11] 公开号 CN 1922491A

[22] 申请日 2005.1.27
[21] 申请号 200580005514.5
[30] 优先权
[32] 2004. 1.30 [33] GB [31] 0402123.4
[86] 国际申请 PCT/GB2005/000328 2005.1.27
[87] 国际公布 WO2005/073731 英 2005.8.11
[85] 进入国家阶段日期 2006.8.21
[71] 申请人 普罗塞瑞克斯分子设计有限公司
地址 英国柴郡
[72] 发明人 M·R·唐尼安姆 J·F·格洛弗
R·E·汉尼利
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 程 泳

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

CJD 朊病毒的检测

[57] 摘要

本发明提供检测哺乳动物研究对象的样品中传染性朊病毒蛋白质的检验方法。 所述方法包括：从所述研究对象中获得含有朊病毒蛋白质的样品；将所述样品与含有用于消化非传染性朊病毒蛋白质和用于部分消化传染性朊病毒蛋白质的物质相接触，以产生朊病毒蛋白质多肽残基；用抗体接触消化后的样品，该抗体可以与具有氨基酸序列 Vc 的多肽结合(Gly－Gly－Gly－Trp)－Gly－Gln－Gly－Gly－R1－R2－His－R3－Gln－Trp－Asn－Lys－Pro－R4－Lys－Pro－Lys－Thr－R5－R6－Lys(－His－R7－Ala－Gly)(Vc)，并检测所述抗体和所述朊病毒蛋白质多肽残基的缀合物；本方法的特征在于对所述缀合物的检测包括对可检测物的化学、生物或生物化学扩增，以及对扩增物的检测。

1.用于检测哺乳动物研究对象的样品中传染性朊病毒蛋白质的检验方法，所述方法包括：从所述研究对象中获得含有朊病毒蛋白质的样品；将所述样品与用于消化非传染性朊病毒蛋白质和用于部分消化传染性朊病毒蛋白质的物质接触，以产生朊病毒蛋白质多肽残基；用抗体与所述消化的样品接触，该抗体能够结合带有如下氨基酸序列 Vc 的多肽 (Gly-Gly-Gly-Trp)-Gly-Gln-Gly-Gly-R_1-R_2-His-R_3-Gln-TrpAsn-Lys-Pro-R_4-Lys-Pro-Lys-Thr-R_5-R_6-Lys (-His-R_7-Ala-Gly) (Vc)

（其中 R_1 是甘氨酸或者缺失；

R_2 是苏氨酸或者丝氨酸；

R_3 是选自甘氨酸、丝氨酸和天冬酰胺的氨基酸残基；

R_4 和 R_5 彼此独立的是天冬酰胺或者丝氨酸；

R_6 是选自甲硫氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的氨基酸残基；

R_7 是缬氨酸或者甲硫氨酸；并且其中括号内的一个或者多个残基可以存在或者不存在，条件是如果它们存在的话它们与序列中肽的剩余部分相连接）；以及

检测所述抗体和所述朊病毒蛋白质多肽残基的缀合物；

特征在于对所述缀合物的检测包括对可检测物的化学、生物或生物化学扩增，以及对该扩增物的检测。

2. 如权利要求 1 中的方法，其中所述研究对象为人，优选为有生命的。

3. 如权利要求 1 和权利要求 2 中任一项的方法，用于检测与 CJD，nvCJD 或 kuru 相关的传染性朊病毒蛋白质。

4. 用于权利要求 1-3 中任一项检验方法的试剂盒，所述试剂盒包含：

（i）Vc-结合抗体；

（ii）任选地 Va-结合抗体；

（iii）任选地蛋白酶 K；

（iv）能够进行可检测物的化学、生物或生物化学扩增和检测、或能够引起可检测物化学、生物或生物化学扩增的物质，所述物质任选地与抗体（i）缀合；且

（v）任选地，用于进行所述检验方法的说明。

5. iPrP 结合抗体在制备用于治疗人类 TSE 的药物中的用途。

CJD朊病毒的检测

本发明涉及哺乳动物研究对象中传播性海绵状脑病 （TSE）的检验方法及其方法的改进。

海绵状脑病是一组变性性神经疾病。在许多种哺乳动物中已经发现该病的实例，包括羊（称为瘙痒病）、牛（BSE）和人类（克-雅病 CJD 、新型克-雅病变种（nvCJD）和库鲁病(kuru)）。已经有关于在实验室条件下，TSE 可以从一种哺乳动物传播到另一种哺乳动物的报道。这种传染性物质对不同物种之间壁垒的跨越，引起了人们对人类能够通过摄取来自被感染的动物性食品的物质，尤其是牛源性物质，而被感染的广泛担心。

TSE 的特征是在漫长的潜伏期后，出现表现为精神状态进行性退化的临床症状，包括攻击性和缺乏协调性。验尸显示脑组织空泡化的特征模式，这是由于神经细胞被破坏和异常蛋白质纤维沉淀所致。

虽然在羊中发现海绵状脑病形式已知许多年了，但是随着牛的 BSE 和人类的 nvCJD 的出现，该病变得更为突出。

人们认为 TSE 的致病物质是所谓“朊病毒”，一种只包含蛋白质而没有核酸的传染性物质。在 TSE 中，一种特殊蛋白质（称为朊病毒蛋白，PrP）被确定为传染性物质。PrP 是一种天然存在的细胞蛋白质，它以两种同功型存在，这两种同功型的差异在于其三级结构的不同，这样可以通过它们对酶降解（如，蛋白酶 K）的不同反应来区别它们。结果是，非传染性同功型 niPrP 完全被蛋白酶 K 消化，而传染性同功型 iPrP 被降解为可以检测到的多肽残基 PrP27-30。

许多哺乳动物的 PrP 的氨基酸序列是已知的，并可以从例如 SwissProt 得到。残基 PrP27-30 的氨基酸序列也同样已知。不同哺乳动物的 PrP 序列之间有很高的同源性。

几家公司已经研发了一些用于尸检诊断 TSE 的检验方法，这些方

法通常基于与来自蛋白水解消化的脑组织样品之 PrP27-30 结合的抗体的使用。

从爱尔兰都柏林的 Enfer 可以得到一个这类检验方法，它使用 EP-B-616613 中所描述的技术。更特别的是， Enfer 检测方法使用两种多克隆抗体，所述抗体针对的免疫原性缀合物之多肽序列对应于(i) PrP27-30 的节段和(ii) PrP27-30 部分以外的 PrP 节段。这些节段在 EP-B- 616613 中分别被称为 Vc 和 Va。

虽然商业性检验方法取得一些成功，始终仍需要对 TSE 检验方法不断改进，尤其是用于临死前或者不需要脑组织样品的检验方法。

本发明恰恰提供了这样的改进了的检验方法。

因此，从一方面看，本发明提供了从哺乳动物研究对象样品中检测传染性朊病毒蛋白质的检验方法。所述方法包括：从所述研究对象中获得含有朊病毒蛋白质的样品；用所述样品与可以消化非传染性朊病毒蛋白质和部分地消化传染性朊病毒蛋白质的物质接触，以产生朊病毒蛋白质多肽残基；用消化后的样品接触抗体，该抗体可以与具有如下氨基酸序列 Vc 的多肽结合，(Gly-Gly-Gly-Trp)-Gly-Gln-Gly-Gly-R_1-R_2-His-R_3-Gln-Trp-Asn-Lys-Pro-R_4-Lys-Pro-Lys-Thr-R_5-R6-Lys (-His-R_7-Ala-Gly) (Vc) (其中 R_1 是甘氨酸或者缺失；R_2 是苏氨酸或者丝氨酸；R_3 是选自甘氨酸、丝氨酸和天冬酰胺缺失的氨基酸残基；R_4 和 R_5 彼此独立，是天冬酰胺或者丝氨酸；R_6 是选自甲硫氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的氨基酸残基；R_7 是缬氨酸或者甲硫氨酸；并且其中括号内的一个或者更多残基可以存在或者不存在，条件是如果它们存在的话它们与序列中肽的剩余部分相连接)；以及检测所述抗体和所述朊病毒蛋白质多肽残基的缀合物；本方法的特征在于对所述缀合物的检测包括对可检测物的化学、生物或生物化学扩增，尤其优选生物化学或生物学扩增，以及对所扩增物的检测。

能够结合 Vc 的抗体优选是针对氨基酸序列 Vc 的合成多肽的免疫原性缀合物(或者更优选如以下描述的 Vc')产生的抗体，例如通过

使用上述免疫原性缀合物免疫接种哺乳动物并收集血清或者 Vc-结合 IgG。

在本发明的方法中所使用的含朊病毒蛋白质的样品可以是含朊病毒蛋白质的任何身体组织、液体或物质的样品，如，肌肉、扁桃体、脑、血液、尿液、粪便，等等。所述样品也可以是来自血库的血液、血清或者血浆、血液产物（如，凝集因子）、组织产物、含有哺乳动物产物的培养基（如 BSA）、来自哺乳动物的药物组分（如肝素）等。对于验尸检验，理想地是使用脑组织，这是由于脑组织中朊病毒含量高。对于临死前检验，样品优选是活检组织样品、血液、尿液或者粪便。样品优选进行预处理以裂解其中的细胞，例如，通过匀浆或其它组织破碎方法。

然后用朊病毒蛋白质消化物质（如，蛋白酶 K），在一定条件下接触该样品足够长时间，来消化非传染性朊病毒蛋白质。这些处理方法、处理条件和持续时间为本领域公知。

如果需要的话，可以在消化前和/或消化后处理样品（例如，通过离心、层析等）以分离出除了未消化的或部分消化的朊病毒蛋白质以外的样品组分和/或消化产物。

消化之后，用 Vc-结合抗体接触样品。这步可以按 EP-B-616613 中描述的制备。特别优选地，用带有一个免疫原性载体（如，破伤风类毒素、卵白蛋白等）的具有 GQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVGC (Vc′)序列的多肽缀合物来制备该抗体。可以用标准的连接物质，例如，间马来酰亚胺-苯甲酰基-N-羟基硫基琥珀酰亚胺酯（SMBS）等来实现缀合。该抗体优选为多克隆抗体。可以使用标准的抗体制备技术。

用常规蛋白质固定技术，可以把 Vc-结合抗体固定在基质上（如平的表面、选择性地，超顺磁性珠、棒、网孔、管等）。

作为选择，可以使用非固定化的 Vc-结合抗体。

检验方法的检测阶段中的一系列精确步骤取决于使用的是固定化还是非固定化的 Vc-结合抗体，以及对化学、生物或生物化学扩增技术的选择。

进行化学扩增意味着使用非生物化学的化学反应（如，用通常在生物学环境中找不到的化学物质来催化反应）来产生可检测物，可检测物存在与否是抗体：朊病毒蛋白质多肽残基缀合物存在的指征。

进行生物学扩增意味着使用微生物来产生可检测物（如，化学物质、微生物等）。可检测物的存在与否是抗体：朊病毒蛋白质多肽残基缀合物存在的指征。

进行生物化学扩增意味着使用生物化学反应（如，酶促反应或核酸扩增，如，PCR）来产生可检测物（如，化学物质）。可检测物存在与否是抗体：朊病毒蛋白质多肽残基缀合物存在的指征。

被扩增物或引发扩增物质可以与所述 Vc-结合抗体或另一个能够结合抗体：残基缀合物的物质（如，第二抗体）缀合。在该物质与所述 Vc-结合抗体缀合时，其行使功能的能力可能不会受到与 PrP27-30 缀合的影响，或者它可以被这种缀合活化或失活。其结果是，没有反应的抗体可以或不必从抗体：残基缀合物中分离出去。这在免疫检测过程中是常规的，并且本领域普通技术人员会很容易理解应该采用的所述步骤。当被扩增或引起扩增的物质从 Vc-结合抗体中分离后，一般需要从所述抗体：残基缀合物中分离出未缀合的抗体。在免疫检测过程序中这也是常规的，并且本领域普通技术人员将很容易理解应该采用的所述步骤。

所述被扩增或者引发扩增物可以包含一种以上组分。在这种情况下，组分之一可以与所述 Vc-结合抗体缀合，另一种组分可以与能够结合所述抗体：残基缀合物的单独物质相缀合。同样，本领域普通技术人员清楚是否需要从抗体：残基缀合物中分离没有缀合的 Vc-结合抗体。当使用这种两个或更多组分系统时，优选的情况是不同组分一起引起一个不同于单一组分自己引起的扩增效应，如，它们可以是催化多步反应的不同步骤的催化剂（如，酶）或者可以是对相同或不同目标微生物有不同效应的病毒物质。

当本发明的检验方法中使用第二种结合物质时，它优选地也是抗体。然而，如果需要的话，可以使用其它结合物质。

除非另有说明，如这里所使用的，术语抗体可以是这样的抗体或者其功能性片段（例如 Fab 片段）、单链抗体或寡聚体抗体构建体。这些物质可以按常规工艺制备。

为了避免不必要的假阴性，本发明的检验方法也优选包括检测原始样品的一部分之 PrP 含量。这可以便利的做到，例如，象所述的 BSE 商业检测方法使用 PrP 结合抗体。

在这种情况下，所述 PrP 结合抗体应该能够结合于 iPrP 和/或 niPrP 或其通过变性或部分消化所暴露出的片段。在文献中有关于这类抗体的描述。

然而在优选的实施方案中，对非 PK 消化的样品（即与 Vc-结合抗体类似，省略了 niPrP 的消化步骤），使用 Va-结合抗体，。特别优选地，使用的抗体是如下文所定义的 Va 结合抗体。尤其优选地，这种抗体是针对氨基酸序列 Va 的合成多肽的免疫原性缀合物(或者更优选如以下描述的 Va' ）的抗体，例如，通过使用上述免疫原性缀合物免疫接种哺乳动物并收集血清或者 Va-结合 IgG。

Va-结合抗体是指能够结合如下序列多肽的抗体 (Pro-Gly-Gly-R_8)-Trp-Asn-Thr-Gly-Gly-Ser-Arg-Tyr-Pro-Gly-Gln-Gly-Ser-Pro-Gly-Gly-Asn-Arg-Tyr-Pro-Pro-Gln-Gly-(Gly-R_9-R_{10}-Trp) (Va)。

其中 R_8和 R_9彼此独立，是甘氨酸或缺失；R_{10}是甘氨酸或苏氨酸；并且其中括号内的一个或者更多残基可以存在或者不存在，条件是如果它们存在的话它们与序列中肽的剩余部分相连接。

这个 Va-结合抗体可以按 EP-B-616613 中描述的制备。特别优选地，用多肽序列的缀合物制备抗体。这可以按 EP-B-616613 中描述的制备。特别优选地，用带有一个免疫原性载体（如，破伤风类毒素、卵白蛋白等）、具有 GGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGC (Va′)序列的多肽缀合物来制备抗体。可以用标准的连接物质（例如，SMBS）来实现缀合。该抗体优选为多克隆抗体。可以使用标准的抗体制备技术。

如果临死前 TSE 检测结果是阳性的，优选使用包含 Vc-结合抗体

的治疗性物质处理研究对象。这可以只是抗体或者是该抗体与一种物质的缀合物，该物质起阻碍 niPrP 向 iPrP 转化或降解 iPrP 的作用。在人类 TSE 的情况下，该治疗性抗体优选是所选抗体（即，如上文定义的抗-Vc 或抗-Va 抗体）。给药方式优选为注射或灌注入，例如，进入 CSF。给药剂量可以使用 TSE 感染的动物模型按常规确定。这种治疗性使用形式是本发明的另一个方面。

从更进一步方面看，本发明提供了用于本发明中所述检验方法的试剂盒。所述试剂盒包括:

（i）Vc-结合抗体;

（ii）任选地且优选的 Va-结合抗体;

（iii）任选地且优选的蛋白酶 K;

（iv）能够进行可检测物化学、生物或生物化学扩增、优选生物或生物化学扩增和检测的物质，或者能够引起可检测物化学、生物或生物化学扩增、优选生物或生物化学扩增的物质，所述物质任选地与抗体（i）缀合；且

（v）任选地且优选地，用于进行所述检验方法的说明。

尽管该物质（iv）可以是酶或其它催化剂，其优选是在扩增过程中自我复制的物质。

参考以下非结合实施例，将进一步描述本发明。

实施例 1

样品制备

用合适的方法打碎初始组织，如，使用杵和离心管在去垢剂缓冲液中匀浆，以得到粗的匀浆物，其可以通过离心使之澄清。用可以用于蛋白酶 K 消化的适宜缓冲液稀释该组织匀浆样品至工作浓度。

实施例 2

朊病毒蛋白质消化

为了将 iPrP 和 niPrP 区别开，该检测系统依赖于 iPrP 对该蛋白酶 K(PK)消化的相对耐受性(见 Kretzschmar, Clin Lab Med. P109-128 (2003)。PK 处理的一般条件是将稀释的匀浆样品分为两等份，向其中一等份中加入 PK 并进行温育（如，37℃，30 分钟）。

实施例 3

Vc- 结合抗体添加

从用 Vc 肽缀合物疫苗免疫的动物血液中制备血清或纯化的 IgG。然后，将这些血清稀释到工作浓度， 接触上述 PK 消化的匀浆样品并进行温育（如，20-25℃，1 小时）。

实施例 4

信号扩增和检测

信号扩增一般需要应用生物化学技术、分子或缀合第二抗体技术。缀合生物素分子的抗体温育（如，20-25 ℃，1 小时）是个例子。通过添加与马的辣根过氧化物酶缀合的卵白素（生物素结合物质）而被扩增（如，20-25℃，1 小时），并用生色底物检测、在分光光度计上读取特定吸收。

实施例 5

抗体效力

分别用 Vc’ 和 Va’ 的抗原性缀合物免疫动物所制备的 Vc-结合和 Va-结合多克隆抗体，在存在或者不存在蛋白酶 K 消化的条件下，与如上文所述制备的来自 CJD 感染的和未感染的人脑匀浆物接触。然后将该样品进行 Western 印迹分析，结果示于附图 1 和图 2。图 1 和图 2 分别是 Va-结合抗体和 Vc-结合抗体。在每个图中，泳道 1 为未感染的匀浆物，泳道 2 为 PK 处理的未感染的匀浆物，泳道 3 是感染的匀浆物，泳道 4 是 PK 处理的感染的匀浆物。

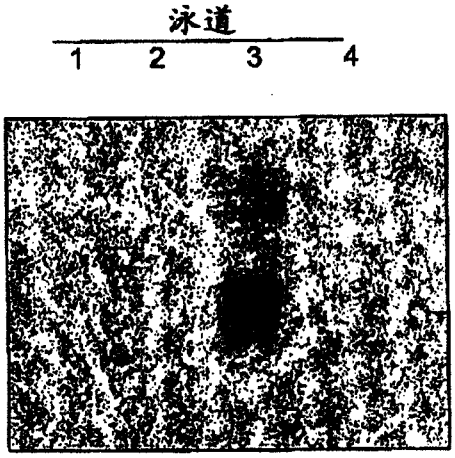


图1

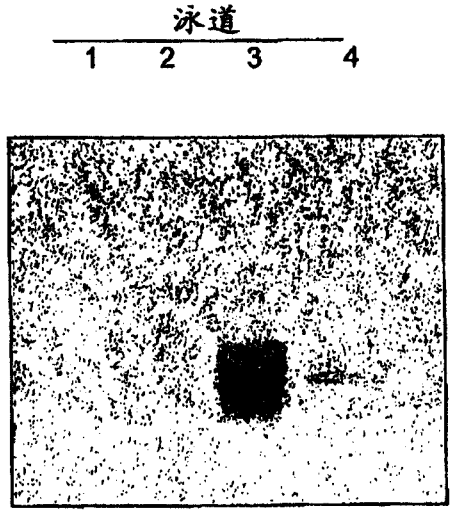


图2