



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101166976 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 200680006225.1

(22) 申请日 2006.01.13

(30) 优先权数据

60/644,314 2005.01.13 US

60/652,493 2005.02.11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.08.27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/001437 2006.01.13

(87) PCT申请的公布数据

W02006/076687 EN 2006.07.20

(73) 专利权人 诺华疫苗和诊断公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·佩列兹 M·米切利特谢 C·胡

X·王 M·高 M·科诺利 T·霍恩

R·楚克曼 D·基恩

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 2004005920 A2, 2004.01.15, 全文.

W0 2005016127 A2, 2005.02.24, 全文.

Jing-Gang Lee et al..Simulation of pH elution in high-performance affinity chromatography using non-porous adsorbents.《Chemical Engineering Journal》.1997,第65卷175-186.

M.A. Firer.Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography.《J. Biochem. Biophys. Methods》.2001,第49卷433-442.

Pierce Biotechnology.Optimize elution conditions for immunoaffinity purification.《TECHNICAL RESOURCE》.2004,(第TR0027.1期),1-2.

审查员 李娟娟

权利要求书3页 说明书54页 附图14页

(54) 发明名称

利用朊病毒特异性肽试剂的 ELISA 试验

(57) 摘要

本发明描述了能优先与 PrP^{sc}形式的朊病毒蛋白相互作用的肽制剂可用于检测生物学样品中的 PrP^{sc}。具体地说,描述了 ELISA 试验。

1. 一种用于检测样品中是否存在致病性朊病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有一种或多种肽试剂和其它所需试剂,其中,所述肽试剂选自:

(i) SEQ ID NO:66、67、68、72、96、97、98、104-108 和 119-126 任一所示的肽,或所述肽的多聚体;和

(ii) 由(i)所示的肽与选自标记物和接头的分子组成的肽试剂,或所述肽试剂的多聚体。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述肽试剂提供在第一固体支持物上。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述肽试剂提供在第一固体支持物上,且其中所述试剂盒用于检测所述致病性朊病毒是否存在的方法中,所述方法包括:

(a) 提供包含肽试剂的所述第一固体支持物;

(b) 在样品中存在的致病性朊病毒蛋白与所述肽试剂结合的条件下使所述第一固体支持物与样品接触以形成第一复合物;

(c) 除去未结合的样品材料;

(d) 使致病性朊病毒蛋白与所述第一复合物解离;和

(e) 利用朊病毒-结合试剂检测解离的致病性朊病毒。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述肽试剂提供在第一固体支持物上,且其中所述试剂盒用于检测所述致病性朊病毒是否存在的方法中,所述方法包括:

(a) 提供包含所述肽试剂的所述第一固体支持物;

(b) 在样品中存在的致病性朊病毒蛋白与所述肽试剂结合的条件下使所述第一固体支持物与样品接触以形成第一复合物;

(c) 除去未结合的样品材料;

(d) 使致病性朊病毒蛋白与所述第一复合物解离;

(e) 分离解离的致病性朊病毒蛋白与所述第一固体支持物;

(f) 在解离的朊病毒蛋白与第二固体支持物附着的条件下使解离的朊病毒蛋白与第二固体支持物接触;和

(g) 利用朊病毒结合试剂检测附着在所述第二固体支持物上的致病性朊病毒。

5. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述肽试剂提供在第一固体支持物上,且其中所述试剂盒用于检测所述致病性朊病毒是否存在的方法中,所述方法包括:

(a) 提供包含所述肽试剂的所述第一固体支持物;

(b) 在样品中存在的致病性朊病毒蛋白与所述肽试剂结合的条件下使所述第一固体支持物与样品接触以形成第一复合物;

(c) 除去未结合的样品材料;

(d) 使致病性朊病毒蛋白与所述第一复合物解离,藉此使致病性朊病毒蛋白变性;

(e) 分离解离变性的致病性朊病毒蛋白与所述第一固体支持物;

(f) 在解离的朊病毒蛋白能与抗-朊病毒第一抗体结合的条件下使解离变性的致病性朊病毒蛋白与包含抗-朊病毒第一抗体的第二固体支持物接触;和

(g) 利用抗-朊病毒第二抗体检测结合在所述第二固体支持物上的朊病毒蛋白。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含盐或离液剂。

7. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于,所述离液剂包括硫氰酸胍 (GdnSCN) 或盐酸胍 (GdnHCl)。

8. 如权利要求 1—5 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括使用说明书。

9. 如权利要求 7 所述的试剂盒,其特征在于,所述 GdnSCN 或 GdnHCl 的使用浓度在 3M-6M 之间。

10. 如权利要求 1—5 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括高或低 pH 试剂。

11. 如权利要求 10 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有 NaOH。

12. 如权利要求 3—5 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述方法还包括使结合的致病性朊病毒蛋白接触高或低 pH,以解离所述结合的致病性朊病毒蛋白,从而使该解离的致病性朊病毒蛋白变性。

13. 如权利要求 12 所述的试剂盒,其特征在于,所述 pH 高于 12 或低于 2。

14. 如权利要求 13 所述的试剂盒,其特征在于,所述 pH 在 12.5-13.0 之间。

15. 如权利要求 12 所述的试剂盒,其特征在于,通过加入 NaOH 至浓度 0.05N-0.15N 使结合的致病性朊病毒蛋白接触高 pH。

16. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述标记物是选自刚果红和硫磺素淀粉状蛋白特异性染料。

17. 如权利要求 11 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包含磷酸或其钠盐。

18. 如权利要求 12 所述的试剂盒,其特征在于,所述方法还包括将变性并解离的致病性朊病毒蛋白的 pH 中和至 7.0-7.5 之间。

19. 如权利要求 18 所述的试剂盒,其特征在于,通过加入磷酸或其钠盐来中和 pH。

20. 如权利要求 2-5 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一固体支持物包括磁珠。

21. 如权利要求 2-5 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述第一或第二固体支持物包括微量滴定板或磁珠。

22. 如权利要求 3-4 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括抗朊病毒抗体作为朊病毒-结合试剂。

23. 如权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括第一和第二抗-朊病毒抗体。

24. 如权利要求 22 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗-朊病毒抗体与变性形式的朊病毒蛋白结合。

25. 如权利要求 23 所述的试剂盒,其特征在于,所述至少一种所述抗-朊病毒抗体与变性形式的朊病毒蛋白结合。

26. 如权利要求 24 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗-朊病毒抗体识别朊病毒蛋白氨基末端中的表位。

27. 如权利要求 25 所述的试剂盒,其特征在于,所述至少一种所述抗-朊病毒抗体识别朊病毒蛋白氨基末端中的表位。

28. 如权利要求 26 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗-朊病毒识别朊病毒蛋白残基

23-90 内的表位。

29. 如权利要求 27 所述的试剂盒,其特征在于,所述至少一种所述抗-朊病毒抗体识别朊病毒蛋白残基 23-90 内的表位。

30. 如权利要求 26 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗-朊病毒抗体选自 Fab D18、3F4、SAF-32、6H4。

31. 肽试剂在制备权利要求 1—30 中任一项所述的试剂盒中的用途,其特征在于,所述肽试剂选自:

(i) SEQ ID NO:66、67、68、72、96、97、98、104-108 和 119-126 任一所示的肽,或所述肽的多聚体;和

(ii) 由(i)所示的肽与选自标记物和接头的分子组成的肽试剂,或所述肽试剂的多聚体。

32. 如权利要求 31 所述的用途,其特征在于,所述标记物是选自刚果红和硫磺素淀粉状蛋白特异性染料。

利用朊病毒特异性肽试剂的 ELISA 试验

发明领域

[0001] 本发明涉及能与朊病毒蛋白相互作用的肽试剂 (peptide reagent)、编码这些肽试剂的多核苷酸、利用这种肽试剂和多核苷酸产生抗体的方法和采用这些方法产生的抗体。本发明还涉及利用这些肽试剂检测样品中是否存在朊病毒的方法和将这些肽试剂用作治疗性或预防性组合物组分的方法。

[0002] 背景

[0003] 蛋白质构象疾病 (protein conformational disease) 包括各种不相关的疾病, 包括传染性海绵样脑病 (transmissible spongiform encephalopathies), 该疾病因蛋白质构象异常转换所致, 进而造成异常形式蛋白质自身结合随后发生组织沉积和损伤。这些疾病在临床表现上也惊人相似, 通常经历时间长度不同的潜伏期后从诊断快速发展为死亡。

[0004] 一组构象疾病称为“朊病毒疾病”或“传染性海绵样脑病 (TSE)”。在人中, 这些疾病包括克罗伊茨费尔特-雅各布病 (CJD)、Gerstmann-Straussler-Scheinker 综合征 (GSS)、致命性家族性失眠症和库鲁病 (参见, 例如 Harrison's Principles of Internal Medicine (《哈里森内科学原理》), Isselbacher 等编, McGraw-Hill, Inc., 纽约, (1994); Medori 等, (1992), N. Engl. J. Med., 326:444-9)。在动物中, TSE 包括绵羊瘙痒症、牛海绵样脑病 (BSE)、传染性水貂脑病和捕获的黑尾鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病 (Gajdusek, (1990), Subacute Spongiform Encephalopathies: Transmissible Cerebral Amyloidoses Caused by Unconventional Viruses (亚急性海绵样脑病: 非寻常病毒导致的传染性大脑淀粉样变性), 第 2289-2324 页。刊于: Virology (《病毒学》), Fields 编, 纽约: Raven Press, Ltd)。传染性海绵样脑病的特征是有相同的特点: 存在构象异常的朊病毒蛋白 (富含 β -折叠 (beta-rich), 蛋白酶 K 耐受), 当将其接种于实验动物 (包括灵长类动物、啮齿类动物和转基因小鼠) 中时能传染疾病。

[0005] 近年来, 牛海绵样脑病的快速传播及其与人海绵样脑病发生率升高有关导致对检测非人哺乳动物传染性海绵样脑病的兴趣明显上升。偶然传染这些疾病的悲剧性后果 (参见, 例如 Gajdusek, Infectious Amyloids, and Prusiner Prions (传染性淀粉样变性和 Prusiner 朊病毒), 刊于 Fields Virology (菲尔兹病毒学), Fields 等编, Lippincott-Ravin, Pub., 费城, (1996); Brown 等, (1992), Lancet, 340:24-27)、消除污染困难 (Asher 等, (1986), 第 59-71 页, 刊于: Laboratory Safety: Principles and Practices (《实验室安全: 原理和规范》), Miller 编, Am. Soc. Microb.) 和近来对牛海绵样脑病的关注 (British Med. J. (1995) 311:1415-1421) 迫切需要建立鉴定患传染性海绵样脑病的人和动物的诊断检验及治疗受感染对象。

[0006] 朊病毒是导致海绵样脑病 (朊病毒疾病) 的传染性病原体。朊病毒与细菌、病毒和类病毒差别显著。主要的假说是它与所有其它传染性病原体不同, 朊病毒蛋白的异常构象导致了感染, 该蛋白起着模板作用并将正常朊病毒构象转变为异常构象。20 世纪 80 年代早期首次特征鉴定到朊病毒蛋白 (参见, 例如 Bolton, McKinley 等, (1982), Science, 218:1309-1311; Prusiner, Bolton 等, (1982), Biochemistry, 21:6942-6950; McKinley, Bolton

等, (1983), Cell, 35 :57-62)。自那时起已克隆、测序并在转基因动物中表达了完整的朊病毒蛋白编码基因。参见, 例如 Basler, Oesch 等, (1986), Cell, 46 :417-428。

[0007] 朊病毒疾病的关键特征是正常(细胞或非致病性)形式的朊病毒蛋白(PrP^{C})形成了形状异常的蛋白(PrP^{Sc}), 也称为瘙痒症蛋白。参见, 例如 Zhang 等, (1997), Biochem., 36(12) :3543-3553 ;Cohen 和 Prusiner, (1998), Ann Rev. Biochem., 67 :793-819 ;Pan 等, (1993), Proc Natl Acad Sci USA, 90 :10962-10966 ;Safar 等, (1993), J Biol Chem, 268 :20276-20284。光谱学和晶体学研究表明与主要为 α -螺旋折叠非疾病形式相比, 朊病毒的疾病相关形式基本上均富含 β -片层结构。参见, 例如 Wille 等, (2001), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 99 :3563-3568 ;Peretz 等, (1997), J. Mol. Biol., 273 :614-622 ;Cohen 和 Prusiner, 第 5 章 :Structural Studies of Prion Proteins(朊病毒蛋白的结构研究), 刊于 PRION BIOLOGY AND DISEASES(《朊病毒生物学和疾病》), S. Prusiner 编, 冷泉港实验室出版社, 1999, 第 191-228 页)。看来结构发生变化后生物化学特性也改变 : PrP^{C} 可溶于非变性洗涤剂, PrP^{Sc} 不可溶 ;蛋白酶易消化 PrP^{C} , 而 PrP^{Sc} 部分耐受, 形成称为“ PrPres ”(Baldwin 等, (1995) ;Cohen 和 Prusiner, (1995) ;Safar 等, (1998), Nat. Med. 4(10) :1157-1165)、“ $\text{PrP}27-30$ ”(27-30kDa)或“PK-耐受”(蛋白酶 K 耐受)形式的 N-末端截短片段。此外, PrP^{Sc} 可将 PrP^{C} 转变为致病性构象。参见, 例如 Kaneko 等, (1995), Proc. Natl Acad. Sci. USA, 92 :11160-11164 ;Caughey, (2003), Br Med Bull., 66 :109-20。

[0008] 已证实难于在活对象中和从活对象取得的样品中检测到构象疾病蛋白的致病性同种型。因此, 在对象死亡前对包含上述情况在内的这些传染性和淀粉样变性的明确诊断和姑息疗法基本上是仍未解决的难题。脑组织活检的组织病理学检验对于对象有风险, 可能会因活组织检查样品的获取部位而错失病损和淀粉样沉积的检测。然而, 风险还涉及活组织检查的动物、患者和卫生保健人员。此外, 除非动物已变为食物供应, 否则通常不能获得动物脑检验的结果。另外, 产生的大多数抗朊病毒肽抗体能识别变性的 PrP^{Sc} 和 PrP^{C} , 虽然报道有对天然 PrP^{Sc} 特异的抗体。(参见, 例如 Matsunaga 等, (2001), PROTEINS : Structure, Function and Genetics(蛋白质 :结构、功能和遗传学), 44 :110-118 ;美国专利 5,846,533 和 6,765,088)。

[0009] 可用许多 TSE 检验(参见, Soto, C., (2004), Nature Reviews Microbiol., 2 :809 ;Biffiger 等, (2002), J. Virol. Meth., 101 :79 ;Safar 等, (2002), Nature Biotech., 20 :1147 ;Schaller 等, Acta Neuropathol., (1999), 98 :437 ;Lane 等, (2003), Clin. Chem., 49 :1774)。然而, 所有这些检验利用脑组织样品并只适用于死后检验。大多数这些检验也需要用蛋白酶 K 处理样品, 这样做耗时, PrP^{C} 消化不完全可导致假阳性结果以及消化对蛋白酶敏感的 PrP^{Sc} 可导致假阴性结果。

[0010] 因此, 需要能检测各种样品, 例如取自血液供给, 农用动物和其它人和动物食品供给的活对象的样品中是否存在致病性朊病毒蛋白的组合物和方法。此外, 需要能诊断和治疗朊病毒相关疾病的方法和组合物。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明人开发了一种检测致病性朊病毒蛋白的灵敏方法。该方法足够灵敏从而能检测可能存在于患朊病毒相关疾病个体生物学液体中的低水平致病性朊病毒。因此, 该方法可用作死前诊断检验或用于筛检献血样品等。

[0013] 本发明部分涉及能与朊病毒蛋白相互作用的肽试剂。更具体地说,这些肽试剂能优先与朊病毒蛋白的致病性同种型相互作用。以下共有专利申请描述了这种肽试剂:2004年8月13日提交的美国系列号 10/917,646;2005年2月11日提交的美国系列号 11/056,950;2004年8月13日提交的 PCT 申请号 PCT/US2004/026363;所有这些申请纳入本文作为参考。这些肽试剂用于浓缩和分离检验样品中的致病性朊病毒蛋白。与以前描述的 PrP^{Sc} 试验不同,本发明方法不需要蛋白酶处理样品来除去 PrP^C。在本发明方法中,可联用肽试剂与灵敏的 ELISA 来检测浓缩和分离的朊病毒蛋白。

[0014] 在一实施方式中,本发明提供检测样品中是否存在致病性朊病毒的方法,该方法包括:

[0015] (a) 提供包含能优先与朊病毒的病原形式相互作用的肽试剂的第一固体支持物;

[0016] (b) 在样品中存在的致病性朊病毒蛋白能与肽试剂结合的条件下使所述第一固体支持物与样品接触;

[0017] (c) 除去未结合的样品;

[0018] (d) 使致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离;和

[0019] (e) 利用朊病毒-结合试剂检测解离的致病性朊病毒。

[0020] 所述肽试剂最好衍生自具有选自 SEQ ID NO:12-260 所示序列的肽,以下共有的专利申请详述了这些肽试剂:2004年8月13日提交的美国系列号 10/917,646;2005年2月11日提交的美国系列号 11/056,950;2004年8月13日提交的 PCT 申请号 PCT/US2004/026363。除去任何未结合的样品后,致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离。致病性朊病毒蛋白通常在解离过程中变性。利用离液剂(例如,硫氰酸胍或盐酸胍)或高盐浓度或优选通过改变 pH 来实现解离。低 pH(例如,低于 pH2)和高 pH(高于 pH12)均可用,虽然优选高 pH。利用抗朊病毒抗体,采用免疫测定,优选 ELISA,更优选夹心 ELISA 检测解离的和变性的朊病毒蛋白。

[0021] 本发明也提供实施该方法的试剂盒,这些试剂盒装有一种或多种在固体支持物上提供的肽试剂和任选的一种或多种抗-朊病毒抗体。可标记抗-朊病毒抗体和/或可在固体支持物上提供。如使用说明书(所述),试剂盒中可任选装有所述方法使用的缓冲液、洗涤溶液、变性剂和其它组分。

[0022] 这些肽试剂应用广泛,包括用作分离致病性朊病毒或检测样品中是否存在致病性朊病毒的工具,用作治疗性或预防性组合物的组分和/或用于产生朊病毒特异性抗体。例如,与 PrP^C 相比,能优先与 PrP^{Sc} 相互作用的肽试剂可用于直接检测从对象活体取得的样品中的致病性形式,例如用于诊断疾病或筛检献血样品或筛检器官捐献的器官。

[0023] 本文所述的肽试剂可以是部分或完全合成的,例如可包含一种或多种以下部分:环状残基或肽、肽的多聚体、标记物和/或其它化学部分。合适肽试剂的例子包括衍生自 SEQ ID NO:12-260 所示肽的那些,例如,SEQ ID NO:66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、133、134、135、136、56、57、65、82 或 84 所示的肽及其类似物和衍生物。本文所述的肽试剂可与任何构象疾病蛋白,例如朊病毒蛋白(如,致病性蛋白 PrP^{Sc} 和非致病性形式 PrP^C) 相互作用。在某些实施方式中,与 PrP^C 相比,该肽试剂能优先与 PrP^{Sc} 相互作用。这些肽试剂通常对多种物种的 PrP^{Sc}

具有特异性,但也可对一种物种的 PrP^{Sc} 具有特异性。

[0024] 另一实施方式提供的肽试剂衍生自本文所述任何序列所示的肽。在某些实施方式中,这些肽试剂衍生自朊病毒蛋白质的各区域,例如利用对应于残基 23-43 或 85-156 (如,按照 SEQ ID NO :2 所示小鼠朊病毒序列编号的 23-30、86-111、89-112、97-107、113-135 和 136-156) 的那些区域。为方便起见,以上所示的氨基酸残基编号对应于 SEQ ID NO :2 所示小鼠朊病毒蛋白序列的那些编号;本领域普通技术人员不难根据本领域已知的序列和本文提供的指导鉴定其它物种朊病毒蛋白中的相应区域。示范性肽试剂包括衍生自 SEQ ID NO :66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、134 或 135 所示肽;或 SEQ ID NO :14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、129、130、131、132、133 或 128 所示的肽;或 SEQ ID NO :56、57、65、82、84 或 136 所示肽的那些试剂。

[0025] 一方面提供了检测是否存在朊病毒蛋白的方法。该检测方法可与诊断朊病毒相关疾病(例如,在人或非人动物对象中),确保血液供给、血制品供给或食物供给中基本上无 PrP^{Sc},分析移植用器官和组织样品,监测外科工具和装置消毒以及知道是否存在致病性朊病毒至关重要的任何其它情况的方法联用。

[0026] 检测方法依赖于该肽试剂与致病性朊病毒同种型优先相互作用。某些实施方式提供了检测生物学样品中致病性朊病毒的方法。

[0027] 在一实施方式中,该方法包括在该肽试剂能与致病性朊病毒(如果存在的话)相互作用的条件下使怀疑含致病性朊病毒的样品与本文所述一种或多种肽试剂接触;通过致病性朊病毒与该肽试剂的结合检测样品中是否存在致病性朊病毒。肽试剂与致病性朊病毒的相互作用可以在溶液中进行,或者可在固相上提供一种或多种反应物。可利用该肽试剂作为捕捉试剂、检测试剂或二者进行夹心型试验。在优选实施方式中,在该方面可联用其它朊病毒结合试剂(例如,能与变性的朊病毒蛋白结合的抗体和其它结合分子)与本发明肽试剂。

[0028] 在该实施方式的一个方面,在固体支持物上提供本发明一种或多种肽试剂,在致病性朊病毒(如果存在的话)能与该肽试剂结合的条件下使之与怀疑含致病性朊病毒的样品接触。可以除去样品中未结合的物质,包括任何非致病性朊病毒,可检测维持与该肽试剂结合或与该肽试剂解离后的致病性朊病毒。可利用含可检测标记的肽试剂(与本发明用来“捕捉”致病性朊病毒的同一肽试剂或第二种肽试剂)或含可检测标记的抗朊病毒抗体或其它朊病毒结合试剂检测致病性朊病毒。该抗体或朊病毒结合试剂无需对朊病毒的致病性形式特异。

[0029] 在该实施方式的其它方面,致病性朊病毒与该肽试剂解离,变性并用抗朊病毒抗体以夹心型试验检测。

[0030] 在另一实施方式中,该方法包括在该肽试剂能与致病性朊病毒(如果存在的话)结合的条件下使怀疑含致病性朊病毒的样品与选自 SEQ ID NO :12-260 所示肽及其类似物和衍生物的一种或多种肽试剂接触;通过致病性朊病毒与该肽试剂的结合检测样品中是否存在致病性朊病毒。在优选的实施方式中,样品与选自具有 SEQ ID NO :66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、133、134、

135、56、57、65、82、136 或 84 所示序列的肽及其类似物和衍生物的一种或多种肽试剂接触。

[0031] 诊断朊病毒相关疾病的方法可用以上检测致病性朊病毒的任一方法。

[0032] 在所有提供含一种或多种本发明肽试剂的固体支持物的上述实施方式中,考虑了先将该肽试剂与样品接触再与固体支持物结合的其它实施方式。在这些实施方式中,该肽试剂包含结合对的一个成员,而固体支持物含该结合对的第二成员。例如,本发明肽试剂可含有或经修饰含有生物素。使生物素化的肽试剂在该肽试剂能与致病性朊病毒结合的条件下与怀疑含致病性朊病毒的样品接触。然后使含亲和素或链霉亲和素的固体支持物与该生物素化的肽试剂接触。本文描述了其它合适的结合对物质。

[0033] 在用本文所述固体支持物的任一方法中,固体支持物可以是,例如硝酸纤维素、聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶、聚氟乙烯、重氮化纸、尼龙膜、活化珠和 / 或磁性反应珠、聚氯乙烯;聚丙烯、聚苯乙烯乳胶、聚碳酸酯、尼龙、葡萄糖、甲壳质、沙子、二氧化硅、浮石粉、琼脂糖、纤维素、玻璃、金属、聚丙烯酰胺、硅、橡胶、多糖、重氮化纸;活化珠和 / 或磁性反应珠和常规用于固相合成、亲和分离、纯化、杂交反应、免疫测定和其它这种应用的任何物质。支持物可以是粒子或者可以是连续表面的形式,包括膜、筛网、平板、小球、载玻片、圆碟、毛细管、中空纤维、针头、大头针、芯片、固体纤维、凝胶(例如硅胶)和珠或颗粒(例如,多孔玻璃珠、硅胶、任选与二乙烯基苯交联的聚苯乙烯珠、接枝共聚珠、聚丙烯酰胺珠、乳胶珠、任选与 N-N'-二-丙烯酰基乙二胺交联的二甲基丙烯酰胺珠、氧化铁磁珠和用疏水性聚合物包被的玻璃颗粒)。术语“固体支持物”和“固体表面”可互换使用。

[0034] 此外,在本文所述的任一方法中,样品可以是生物学样品,即从活的或曾经活的生物获得或衍生的样品,例如器官、全血、血液成分、血液组分、血浆、血小板、血清、脑脊液(CSF)、脑组织、神经系统组织、肌肉组织、骨髓、尿、眼泪、非神经系统组织、器官和 / 或活检或尸检。在优选的实施方式中,生物学样品包括血液、血液成分或血液组分。所述样品可以是非生物学样品。

[0035] 在另一方面,本发明提供通过本文所述任一检测方法检测所述对象的生物学样品中是否存在致病性朊病毒来诊断朊病毒相关疾病的方法。

[0036] 在另一方面,本发明包括制备基本上不含致病性朊病毒的血液供给的方法,该方法包括以下步骤:通过本文所述任一方法筛检所收集血液的等份血样(例如,全血、血浆、血小板或血清);排除检测到致病性朊病毒的任何样品;以及合并未检测到致病性朊病毒的样品来提供基本上不含致病性朊病毒的血液供给。

[0037] 在还有另一方面,本发明包括制备基本上不含致病性朊病毒的食品供给,特别是肉供给(例如,人用或动物消耗的牛肉、羔羊肉、羊肉或猪肉)的方法,该方法包括以下步骤:采用本文所述任一方法筛检从要进入食品供给的食品收集的样品;鉴定检测到致病性朊病毒的样品;和从食品供给中除去在其样品中检测到致病性朊病毒的任何活的或死的生物或要进入食品供给的食品;从而提供基本上不含致病性朊病毒的食物。

[0038] 在另一方面,本发明包括检测样品中是否存在致病性朊病毒、从样品中分离致病性朊病毒、从样品中除去致病性朊病毒的各种试剂盒,所述试剂盒装有:本文所述的一种或多种肽试剂;和 / 或含一种或多种本文所述肽试剂的任何固体支持物;抗朊病毒抗体和其它所需试剂及任选的阳性和阴性对照和 / 或替代阳性对照。本发明也提供可用作本文所述试验阳性对照的替代分子。

[0039] 本领域技术人员鉴于本文内容不难想到本发明的这些和其它实施方式。

[0040] 附图简述

[0041] 图 1 描述了人 (SEQ ID NO :1) 和小鼠 (SEQ ID NO :2) 朊病毒蛋白的氨基酸序列。

[0042] 图 2 描述了以下物种的朊病毒蛋白质的比对情况 :人 (SEQ ID NO :3)、金黄仓鼠 (仓鼠) (SEQ ID NO :4)、牛 (SEQ ID NO :5)、绵羊 (SEQ ID NO :6)、小鼠 (SEQ ID NO :7)、麋鹿 (SEQ ID NO :8)、扁角鹿 (fallow deer) (扁角鹿) (SEQ ID NO :9)、黑尾鹿 (黑尾鹿) (SEQ ID NO :10) 和白尾鹿 (white tailed deer) (白尾鹿) (SEQ ID NO :11)。麋鹿、扁角鹿、黑尾鹿和白尾鹿彼此只有两个残基 (S/N128 和 Q/E226 (以粗体字显示)) 不同。

[0043] 图 3, A-F 图描述了用示范性拟肽取代来制备本文所述任何肽试剂。各图中拟肽画有圆圈, 本文所述的示范性肽试剂 (SEQ ID NO :14, QWNKPSKPKTN) 显示, 其中用 N- 取代的甘氨酸 (拟肽) 残基替代了脯氨酸残基 (SEQ ID NO :14 的残基 8)。A 图显示其中脯氨酸残基被拟肽残基 :N-(S)-(1- 苯基乙基) 甘氨酸取代的肽试剂 ;B 图显示其中脯氨酸残基被拟肽残基 :N-(4- 羟基苯基) 甘氨酸取代的肽试剂 ;C 图显示其中脯氨酸残基被拟肽残基 :N-(环丙基甲基) 甘氨酸取代的肽试剂 ;D 图显示其中脯氨酸残基被拟肽残基 :N-(异丙基) 甘氨酸取代的肽试剂 ;E 图显示其中脯氨酸残基被拟肽残基 :N-(3,5- 二甲氧基苄基) 甘氨酸取代的肽试剂 ;和 F 图显示其中脯氨酸残基被拟肽残基 :N- 氨基丁基甘氨酸取代的肽试剂。图 4 描述了实施例 2 所述的蛋白质印迹实验的结果。泳道 1 和 2 显示正常小鼠脑匀浆液 (泳道 1, 标记为“C”) 和变性的受感染小鼠脑匀浆液 (泳道, 标记为“Sc”) 中存在朊病毒蛋白。泳道 3、4 和 5 显示了人血浆中存在本文所述肽试剂 (SEQ ID NO :68) 与致病性朊病毒形式的特异性结合。具体地说, 泳道 3 是人血浆对照, 泳道 4 是正常小鼠脑匀浆液样品。泳道 5 显示了该肽试剂与受感染的小鼠脑匀浆液样品中的 PrP^{Sc} 有强烈结合。

[0044] 图 5 描述了本文所述示范性 PEG- 连接的肽试剂的结构。

[0045] 图 6 描述了 (QWNKPSKPKTN) 2K (SEQ ID NO :133) 的结构。

[0046] 图 7, A-C 图描述了示范性的 PrP^{Sc} 检测试验。图 7A 显示了用包被有本文所述 PrP^{Sc} 特异性肽试剂的磁珠捕捉 PrP^{Sc}。用磁场吸下 (pull down) 磁珠和结合的 PrP^{Sc} 并洗涤。图 7B 显示了 PrP^{Sc} 的洗脱、变性及将变性的 PrP^{Sc} 包被到 ELISA 的板孔上。图 7C 显示了通过双抗体 ELISA 检测包被到各孔上的 PrP^{Sc}。

[0047] 图 8 描述了用正常小鼠脑匀浆液作不同稀释的小鼠 PrP^{Sc} 脑匀浆液的 ELISA 检测。

[0048] 图 9, A 和 B 图描述了掺加入人血浆样品中的小鼠 PrP^{Sc} 的 ELISA 检测。图 9A 描述了用 QWNKPSKPKTN- 生物素 (SEQ ID NO :14) 进行的 ELISA 检测。图 9B 描述了用生物素 -GGGKRPKPGG (SEQ ID NO :68) 进行的 ELISA 检测。

[0049] 图 10, A 和 B 图分别描述了 ELISA 和蛋白质印迹检测, 其中图 10A 描述了正常和感染瘙痒症的金黄仓鼠 (SHa) 中 PrP^{Sc} 的 ELISA 检测。图 10A 描述了用 QWNKPSKPKTN- 生物素 (SEQ ID NO :14) (黑柱) 或生物素 -GGGKRPKPGG (SEQ ID NO :68) (白柱) 对不用蛋白酶 K 消化的吸下 PrP^{Sc} 的 ELISA 检测。图 10B 描述了对 PK 消化样品的蛋白质印迹分析。“MW” 指蛋白质分子量。泳道 1 和 2 显示对正常 SHa 脑匀浆液的两份不同样品的分析。泳道 3 和 4 显示对 PrP^{Sc} SHa 脑匀浆液的两份不同样品的分析。泳道 5 显示对正常小鼠脑匀浆液的分析。泳道 6 显示对 PrP^{Sc} 小鼠脑匀浆液的分析。

[0050] 图 11 描述了从正常和受感染的鹿 PrP 基因转基因小鼠获得样品的 ELISA

结果。利用 QWNKPSKPKN-生物素 (SEQ ID NO:14) (黑色和浅灰色矩形)、生物素-KKKAGAAAAGAVVGLGG-CONH₂ (SEQ ID NO:136) (浅灰色矩形) 和 GGGKRPKPGG (SEQ ID NO:68) (灰色矩形) 吸下 PrP^{Sc}, 通过 ELISA 检测。

[0051] 图 12, A 和 B 图分别描述了蛋白质印迹和 ELISA 检测, 其中图 12A 描述了 CJD (sCJD, vCJD, 感染的 SHa) 的蛋白质印迹分析检测。图 12B 描述了 ELISA 检测用蛋白酶 K 消化的吸下的 CJD。

[0052] 图 13 描述了用本文所述各种肽试剂作 ELISA 检测人 vCJD 脑匀浆液的 PrP^{Sc}。肽病毒特异性试剂如下: QWNKPSKPKN-生物素 (SEQ ID NO:14); QWNKPSKTTKTNGGGQWNKPSKPKN-生物素 (SEQ ID NO:51); 生物素-QWNKPSKPKN, 其中 P5 用 N-(3,5-二甲氧基苄基) 甘氨酸取代 (SEQ ID NO:117); 生物素-QWNKPSKPKN, 其中 P5 用 N-氨基丁基甘氨酸取代 (SEQ ID NO:118); 生物素-QWNKPSKPKN, 其中 P8 用 N-(环丙基甲基) 甘氨酸取代 (SEQ ID NO:111); 生物素-QWNKPSKPKN, 其中 P8 用 N-氨基丁基甘氨酸取代 (SEQ ID NO:114); 生物素-QWNKPSKPKN, 其中 P5 用 N-(环丙基甲基) 甘氨酸取代和 P8 用 N-氨基丁基甘氨酸取代 (SEQ ID NO:131); 生物素-QWNKPSKPKN, 其中 P5 用 N-(异丙基) 甘氨酸取代和 P8 用 N-(环丙基甲基) 甘氨酸取代 (SEQ ID NO:132); QWNKPSKPKN₂K-生物素 (SEQ ID NO:133); 生物素-GGGKRPKPGG (SEQ ID NO:68); 生物素-KKRPKPGG, 其中 P6 用 N-(环丙基甲基) 甘氨酸取代 (SEQ ID NO:122); 生物素-GGGKRPKPGGGQWNKPSKPKN (SEQ ID NO:81); 4-支链 MAPS-GGGKRPKPGGWNTGGG-生物素 (SEQ ID NO:134); 8-支链 MAPS-GGGKRPKPGGWNTGGG-生物素 (SEQ ID NO:135); 生物素-KKKAGAAAAGAVVGLGGYMLGSAM (SEQ ID NO:57); 生物素-KKKAGAAAAGAVVGLGG-CONH₂ (SEQ ID NO:136); 和生物素-GGGKKKKKKK (SEQ ID NO:85)。

[0053] 图 14 描述了将肽试剂与样品培育后包被珠进行检测与先将肽试剂包被到珠上然后与怀疑含致病性朊病毒的样品培育进行的检测作比较。先包被 (黑圈) 比培育后包被 (白圈) 的检测效率高约 100 倍。

[0054] 详述

[0055] 本发明提供能优先与致病性朊病毒蛋白 (与非致病性朊病毒蛋白相比) 相互作用的肽试剂与改进的 ELISA 方法联用来检测致病性朊病毒蛋白的方法。

[0056] 本发明涉及可用较小的肽 (长度小于 50-100 个氨基酸, 优选长度小于 50 个氨基酸, 甚至更优选长度小于约 30 个氨基酸) 来区分非致病性和致病性朊病毒蛋白这一惊人和出乎意料的发现。因此, 本发明内容涉及以下惊人的发现, 即这些肽及其衍生物 (统称为“肽试剂”) 能以不同的特异性和 / 或亲和力与致病性和非致病性的蛋白质结合, 因而其本身可用作诊断性 / 检测试剂或治疗性组合物的组分。在本发明之前, 据信只有较大的分子 (例如, 抗体、PrP、 α -形式的 rPrP 和血纤蛋白溶酶原) 可用于区分致病性和非致病性形式。同样, 可利用以前描述的抗原性肽产生抗体来评估它们区分致病性和非致病性形式的能力。然而, 由于朊病毒蛋白的相对而言无免疫原性本质, 已证实难以产生对致病性形式特异的抗体。参见, 例如 R. A. Williamson 等, “Antibodies as Tools to Probe Prion Protein Biology” (抗体可作为检测朊病毒蛋白质生物学性质的工具), 刊于 PRION BIOLOGY AND DISEASES (《朊病毒生物学和疾病》), S. Prusiner 编, 冷泉港实验室出版社,

1999, 第 717-741 页。

[0057] 发现本文所述的某些肽能优先与致病性 (PrP^{Sc}) 朊病毒蛋白相互作用从而能开发用于诊断、检测试验和治疗等的新试剂。因此, 本发明涉及肽试剂, 此外, 本发明涉及利用这些肽试剂的检测试验和诊断试验, 利用这些肽试剂的纯化或分离方法和包含这些肽试剂的治疗性组合物。也提供了编码这些肽试剂的多核苷酸和利用这些肽试剂产生的抗体。本文所述的肽试剂、多核苷酸和 / 或抗体可用于检测, 例如生物学样品中是否存在致病性朊病毒的组合物和方法。此外, 本发明还涉及将这种肽试剂、抗体和 / 或多核苷酸用作治疗性或预防性组合物组分的方法。

[0058] 与非致病性同种型相比, 本发明所用的肽试剂包含能优先与致病性同种型相互作用的肽。例如, 在某些实施方式中, 本文所述肽试剂与构象疾病的致病性蛋白形式特异性结合, 而不与非致病性形式结合 (或结合程度较低)。例如, 可利用本文所述肽试剂产生抗体。这些抗体可识别致病性形式、非致病性形式或二者。这些分子可单独或以各种组合用于诊断性试验和 / 或预防性或治疗性组合物中。

[0059] 除非另有指明, 可采用本领域技术人员已知的化学、生物化学、分子生物学、免疫学和药学常规方法实施本发明。参考文献完整解释了这种技术。参见, 例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (《雷明顿药物科学》), 第 18 版 (Easton, 宾夕法尼亚 : Mack Publishing Company, 1990) ; Methods In Enzymology (《酶学方法》) (S. Colowick 和 N. Kaplan 编, Academic Press, Inc.) ; Handbook of Experimental Immunology (《实验免疫学手册》), 第 I-IV 卷, (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编, 1986, Blackwell Scientific Publications) ; Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (《分子克隆 : 实验室手册》) (第二版, 1989) ; Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (《表面和胶体化学手册》) (Birdi, K. S. 编, CRC Press, 1997) ; Short Protocols in Molecular Biology (《分子生物学简单方法》), 第四版, (Ausubel 等编, 1999, John Wiley & Sons) ; Molecular Biology Techniques : An Intensive Laboratory Course (《分子生物学技术 : 强化实验室课程》), (Ream 等编, 1998, Academic Press) ; PCR (Introduction to Biotechniques Series (生物技术丛书引言)), 第二版, (Newton 和 Graham 编, 1997, Springer Verlag) ; Peters 和 Dalrymple, Fields Virology (《菲尔兹病毒学》) (第二版), Fields 等编, B. N. Raven Press, 纽约, NY。

[0060] 应该知道本发明肽试剂、抗体和方法不限于具体试剂或方法参数, 因为这些当然可变。也应知道本文所用术语的目的只是为描述本发明的具体实施方式, 而非限制性的。

[0061] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请全文纳入本文作为参考。

[0062] I. 定义

[0063] 为便于理解本发明, 下文讨论了本申请选用的术语。

[0064] 术语“朊病毒”、“朊病毒蛋白”、“PrP 蛋白”和“PrP”在本文可互换使用, 指致病性蛋白形式 (各称为瘙痒症蛋白、致病性蛋白形式、致病性同种型、致病性朊病毒和 PrP^{Sc}) 和非致病性形式 (各称为细胞蛋白形式、细胞同种型、非致病性同种型、非致病性朊病毒蛋白和 PrP^C) 以及可能不具有致病性构象或正常细胞构象的朊病毒蛋白的变性形式或各种重组形式。致病性蛋白形式与人和动物的疾病状态有关 (海绵样脑病), 非致病性形式通常存在于动物细胞中, 在合适的条件下可能转化为致病性 PrP^{Sc} 构象。在各种哺乳动物种类, 包括

人、绵羊、牛和小鼠中会天然产生朊病毒。人朊病毒蛋白的代表性氨基酸序列见 SEQID NO : 1。小鼠朊病毒蛋白的代表性氨基酸序列见 SEQ ID NO : 2。其它代表性序列见图 2。

[0065] 本文所用的术语“致病性”可表示蛋白实际上导致了疾病或简单地表示该蛋白与疾病有关,因此存在疾病时即存在该蛋白。因此,连同本文内容所用的致病性蛋白不一定是疾病的特定致病因子。致病性形式可以是或不是传染性的。更具体地说,术语“致病性朊病毒形式”指哺乳动物、禽类或重组朊病毒蛋白的特定构象和 / 或富含 β -片层的构象。富含 β -片层的构象通常能耐受蛋白酶 K。对于构象疾病蛋白形式,术语“非致病性”和“细胞的”二者可互换使用,指存在与疾病无关的该蛋白质的正常同种型。

[0066] 此外,本文所用的“朊病毒蛋白”或“构象疾病蛋白”不限于具有本文所述确切序列的多肽。不难明白这些术语包括任何已鉴定或未鉴定的物种或疾病(例如,阿耳茨海默病、帕金森病等)的构象疾病蛋白。本领域普通技术人员通过本文和本领域的指导能采用例如序列比较程序(例如, BLAST 和本文所述的其它程序)或鉴定和比对结构特征或基序来确定对应于附图所示任何其它朊病毒蛋白序列的区域。本文利用术语“PrP 基因”描述表达朊病毒蛋白的任何遗传物质,包括已知的多态性和致病性突变。术语“PrP 基因”通常指任何物种的编码任何形式 PrP 蛋白的任何基因。Gabriel 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 9097-9101 (1992) 和美国专利号 5,565,186 ; 5,763,740 ; 5,792,901 和 W097/04814 描述了一些共知的 PrP 序列,这些纳入本文作为参考的文献公开和描述了这种序列。PrP 基因可来自任何动物,包括本文所述的“宿主”和“测试”动物并包括其任何和所有多态性和突变,应该知道这些术语包括尚未发现的其它这种 PrP 基因。这种基因表达的蛋白质可采取 PrP^C(非疾病)或 PrP^{Sc}(疾病)形式。

[0067] 本文所用的“朊病毒相关疾病”指完全或部分由致病性朊病毒蛋白(PrP^{Sc})导致的疾病。朊病毒相关疾病包括但不限于: 瘙痒、牛海绵样脑病(BSE)、疯牛病、猫海绵样脑病、库鲁病、克罗伊茨费尔特-雅各布病(CJD)、新变体克罗伊茨费尔特-雅各布病(nvCJD)、慢性消耗性疾病(CWD)、Gerstmann-Strassler-Scheinker 病(GSS)和致命性家族性失眠症(FPI)。

[0068] 本文所用的术语“肽试剂”通常指包含天然产生或合成的氨基酸聚合物或氨基酸样分子的任何化合物,包括但不限于只含有氨基和 / 或亚氨基分子的化合物。本发明肽试剂优先与致病性朊病毒蛋白相互作用,它们通常衍生自朊病毒蛋白的片段。术语“肽”可与“寡肽”或“多肽”互换使用,这些术语并未暗示具体大小。例如,该定义包括含有一个或多个氨基酸类似物(包括,例如非天然氨基酸、拟肽等)的肽,具有天然和非天然产生的(例如,合成)取代键以及本领域已知其它修饰的肽。因此,该定义包括合成肽、二聚体、多聚体(例如,串联重复、多抗原肽(MAP)形式、线性连接的肽)、环状、支链分子等。这些术语也包括含有一个或多个 N-取代甘氨酸残基(“拟肽”)和其它合成氨基酸或肽的分子(可参见,例如美国专利号 5,831,005 ; 5,877,278 和 5,977,301 ; Nguyen 等, (2000) Chem Biol. 7 (7) : 463-473 ; Simon 等, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (20) : 9367-9371)。适用于本发明肽的非限制性长度包括长为 3-5 个残基的肽、长为 6-10 个残基(或其中的任何整数)的肽、长为 11-20 个残基(或其中的任何整数)、长为 21-75 个残基(或其中的任何整数)、长为 75-100 个残基(或其中的任何整数)或长度大于 100 个残基的肽。本发明所用的肽通常可具有适用于所需应用的最大长度。肽的长度最好介于约 3-100 个残基之间。鉴于本文所

述本领域技术人员通常不难选择最大长度。此外,本文所述肽试剂(例如,合成肽)可包括其它分子,例如标记物、接头或其它化学部分(例如,生物素、淀粉状蛋白特异性染料,如 Control 红或硫磺素(Thioflavin))。这些部分能进一步提高肽与朊病毒蛋白的相互作用和/或检测朊病毒蛋白。

[0069] 肽试剂也包括具有一个或多个取代、添加和/或缺失(包括一个或多个非天然氨基酸)的本发明氨基酸序列衍生物。衍生物优选显示与任何野生型或参比序列有至少约 50% 相同性,优选至少约 70% 相同性,更优选与本文所述任何野生型或参比序列有至少约 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列相同性。可如下文所述测定序列(或百分比)相同性。这种衍生物可包含多肽的表达后修饰,例如糖基化、酰基化、磷酸化等。

[0070] 肽衍生物也可包含对天然序列的修饰,例如缺失、添加和取代(通常是保守性的),只要该多肽保留所需活性。这些修饰可以有意的,例如通过定点诱变,或者可以是意外的,例如通过产生蛋白质的宿主突变或 PCR 扩增所致的错误。此外,可作出修饰使之具有以下一种或多种效应:毒性降低;对朊病毒蛋白的亲合力和/或特异性提高;促进细胞加工(例如,分泌、抗原呈递等);和促进呈递至 B- 细胞和/或 T- 细胞。可重组、合成、从天然来源或组织培养物中纯化来制备本文所述多肽。

[0071] 本文所用的“片段”表示只由天然发现的完整全长蛋白质和结构的一部分构成的肽。例如,片段可包含蛋白的 C- 末端缺失和/或 N- 末端缺失。所述片段通常保留其所衍生的全长多肽序列的一个、一些或所有功能。片段通常含有天然蛋白的至少 5 个连续氨基酸残基;优选至少约 8 个连续氨基酸残基;更优选含天然蛋白的至少约 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个连续氨基酸残基。

[0072] 如本领域已知的,术语“多核苷酸”通常指核酸分子。“多核苷酸”可包括双链和单链序列,其指(但不限于)原核序列、真核 mRNA、病毒的 cDNA、原核或真核 mRNA、病毒(例如, RNA 和 DNA 病毒和逆转录病毒)的基因组 RNA 和 DNA 序列、原核 DNA 或真核(例如,哺乳动物)DNA,特别是合成的 DNA 序列。该术语也包括含有 DNA 和 RNA 的任何已知碱基类似物的序列,包括对天然序列的修饰,例如缺失、添加和取代(通常是保守性)。这些修饰可以有意的,例如通过定点诱变,或者可以是意外的,例如通过含有朊病毒编码多核苷酸的宿主突变。多核苷酸修饰可具有各种效果,包括例如促进宿主细胞表达多肽产物。

[0073] 多核苷酸可编码生物学活性(例如,免疫原性或治疗性)蛋白或多肽。根据多核苷酸所编码多肽的性质,多核苷酸可包含最少 10 个核苷酸,例如多核苷酸编码抗原或表位的情况下。所述多核苷酸通常编码至少 18、19、20、21、22、23、24、25、30 个或甚至更多个氨基酸的肽。

[0074] “多核苷酸编码序列”或“编码”所选择多肽的序列是在置于合适的调节序列(或“调控元件”)控制下时能在体内转录(以 DNA 为例)并翻译(以 mRNA 为例)为多肽的核酸分子。位于 5' (氨基)末端的起始密码子和 3' (羧基)末端的翻译终止密码子确定了编码序列的边界。转录终止序列可以位于编码序列的 3' 端。典型的“调控元件”包括但不限于转录调节子,例如启动子、转录增强元件、转录终止信号和聚腺苷酸序列;和翻译调节子,例如优化翻译启动的序列,如 Shine-Dalgarno(核糖体结合位点)序列、Kozak 序列(即,优化翻译的序列,例如位于编码序列的 5' 端)、前导序列(异源或天然的)、翻译起始密码

子（例如，ATG）和翻译终止序列。启动子可包括可诱导启动子（分析物、辅因子、调节蛋白等诱导与启动子操作性连接的多核苷酸序列表达）、可阻遏启动子（分析物、辅因子、调节蛋白等诱导与启动子操作性连接的多核苷酸序列表达）和组成型启动子。

[0075] “操作性连接”指配置元件中的所述各组能执行其常规功能。因此，与编码序列操作性连接的给定启动子在存在合适酶时能够实现该编码序列表达。启动子无需与编码序列毗连，只要它能起到指导其表达的功能。因此，例如启动子序列和编码序列之间可以存在间隔性不翻译但可转录的序列，启动子序列仍可认为与编码序列“操作性连接”。

[0076] 本文用于描述核酸分子的“重组”核酸分子表示基因组、cDNA、半合成或合成来源的多核苷酸，根据其来源或操作，这些核酸分子：(1) 不与其天然相连的全部或部分多核苷酸相连；和/或(2) 与除其天然连接的多核苷酸以外的多核苷酸相连。关于蛋白质或多肽所用的术语“重组”表示重组多核苷酸表达所产生的多肽。以单细胞实体培养的原核微生物或真核细胞系的“重组宿主细胞”、“宿主细胞”、“细胞”、“细胞系”、“细胞培养物”和其它这种术语可互换使用，它们表示可用作或已用作重组载体或其它转运 DNA 受者的细胞，包括已转染的原始细胞的后代。应该知道由于意外的和有意的突变，一个亲代细胞的后代在形态学或基因组或总 DNA 互补上不一定与原始亲代完全一样。该定义和上述术语要包括通过相对特性（例如存在编码所需肽的核苷酸序列）的特征鉴定与亲代细胞足够相似的亲代细胞后代。

[0077] 当“分离的”指多核苷酸或多肽时，其表示所述分子已与天然发现该分子的完整生物相分离，或者当多核苷酸或多肽在自然界中每发现时，其基本上不含其它生物大分子从而使得该多核苷酸或多肽可用于其所需目的。

[0078] 本领域已知的“抗体”包含能通过化学或物理方式与感兴趣多肽的表位结合或缔合的一种或多种生物学部分。例如，本发明抗体可优先与致病性构象朊病毒相互作用（例如，与之特异性结合）。术语“抗体”包括从多克隆和单克隆制品获得的抗体以及以下抗体：杂交（嵌合型）抗体分子（参见，例如 Winter 等，(1991)，Nature, 349:293-299；和美国专利号 4,816,567）；F(ab')₂ 和 F(ab) 片段；Fv 分子（非共价异质二聚体，参见例如 Inbar 等，(1972)，Proc Natl Acad Sci USA, 69:2659-2662；Ehrlich 等，(1980)，Biochem, 19:4091-4096）；单链 Fv 分子（sFv）（参见，例如 Huston 等，(1988)，Proc Natl Acad Sci USA, 85:5897-5883）；二聚和三聚抗体片段构建物；微小抗体（minibody）（参见，例如 Pack 等，(1992)，Biochem, 31:1579-1584；Cumber 等，(1992)，J Immunology, 149B:120-126）；人源化抗体分子（参见，例如 Riechmann 等，(1988)，Nature, 332:323-327；Verhoeyan 等，(1988)，Science, 239:1534-1536；和 1994 年 9 月 21 日公布的英国专利公布号 GB2,276,169）；从这种分子获得的任何功能片段，其中这种片段保留了亲代抗体分子的免疫学结合特性。术语“抗体”还包括通过非常规方法，例如噬菌体展示获得的抗体。

[0079] 本文所用的术语“单克隆抗体”指具有同源抗体群的抗体组合物。该术语不涉及抗体的种类或来源，也不限于其制备方式。因此，该术语包括小鼠杂交瘤获得的抗体以及利用人杂交瘤而不是小鼠杂交瘤获得的人单克隆抗体。参见，例如 Cote 等，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy（《单克隆抗体和癌症治疗》），Alan R. Liss, 1985，第 77 页。

[0080] 如果需要多克隆抗体，通常用免疫原性组合物（例如，本文所述的肽试剂）免疫

选择的哺乳动物（例如，小鼠、家兔、山羊、马等）。收集免疫动物的血清，按照已知方法处理。如果含针对所选肽试剂的多克隆抗体的血清含有针对其它抗原的抗体，可通过免疫亲和层析纯化这些多克隆抗体。产生和加工多克隆抗血清的技术是本领域已知的，参见，例如 Mayer 和 Walker 编，(1987)，IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY(《细胞和分子生物学的免疫化学方法》)，(Academic Press, 伦敦)。

[0081] 本领域技术人员也不难制备抗本文所述肽试剂的单克隆抗体。利用杂交瘤制备单克隆抗体的通用方法是熟知的。可通过细胞融合，也可通过其它技术，例如用致癌性 DNA 直接转化 B- 淋巴细胞或用 E-B 病毒转染来制备无限增殖的产抗体细胞系。参见，例如 M. Schreier 等，(1980)，HYBRIDOMATECHNIQUES(杂交瘤技术)；Hammerling 等，(1981)，MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS(单克隆抗体和 T-细胞杂交瘤)；Kennett 等，(1980)，MONOCLONAL ANTIBODIES(《单克隆抗体》)；也参见美国专利号 4,341,761；4,399,121；4,427,783；4,444,887；4,466,917；4,472,500；4,491,632 和 4,493,890。

[0082] 本文所用的“单结构域抗体”(dAb)是由能与指定的抗原特异性结合的 VH 结构域构成的抗体。dAb 不含 VL 结构域，但含已知抗体中存在的其它抗原结合结构域，例如 κ 和 λ 结构域。制备 dAb 的方法是本领域已知的。参见，例如 Ward 等，Nature, 341 :544, (1989)。

[0083] 抗体也可含有 VH 和 VL 结构域以及其它已知的抗原结合结构域。这些类型的抗体及其制备方法的例子是本领域已知的（参见，例如纳入本文作为参考的美国专利号 4,816,467），包括以下方法。例如，“脊椎动物抗体”指抗体是四聚体或其聚集体，包含通常聚集成“Y”构型的轻链和重链，各链之间可以具有或不具有共价键。无论在原位或体外（例如在杂交瘤中）产生，脊椎动物抗体中各链的氨基酸序列与脊椎动物所产生抗体中发现的那些序列同源。例如，脊椎动物抗体包括纯化的多克隆抗体和单克隆抗体，制备方法如下文所述。

[0084] “杂交抗体”是其中各链与哺乳动物抗体各链分别同源的抗体，“杂交抗体”代表了各链的新装配物，从而能利用四聚体或聚集体沉淀两种不同抗原。在杂交抗体中，一对重链和轻链与针对第一抗原产生的抗体中发现的那些（链）同源，而第二对链针对第二抗原产生的抗体中发现的那些（链）同源。这造成“二价”性能，即同时与两种抗原结合的能力。如下文所述，利用嵌合链也可形成这种杂交（抗体）。

[0085] “嵌合抗体”指其中重链和轻链是融合蛋白的抗体。该链氨基酸序列的一部分通常与衍生自特定物种或特定类型抗体的相应序列同源，而该链的其余区段与衍生自另一物种或类型的序列同源。重链和轻链的可变区通常模拟源自一种脊椎动物抗体的可变区，而恒定部分与源自另一种脊椎动物抗体的序列同源。然而，该定义不限于此具体实施例。也包括重链或轻链之一或二者由能模拟不同来源抗体序列的序列组合构成的任何抗体，而不论这些来源是不同的类别来源或不同的物种来源，也不论融合点是位于可变区 / 恒定区边界。因此，可产生恒定区或可变区均不模拟已知抗体序列的抗体。然后可能（例如）构建可变区对特定抗原的特异性亲和力较高，或恒定区能引发补体结合能力提高的抗体，或者可对具体恒定区所拥有的特性中作出其它改进。

[0086] 另一例子是“改变的抗体”，指改变了其中脊椎动物抗体的天然氨基酸序列的抗体。采用重组 DNA 技术可重新设计抗体从而获得所需特性。可有许多变化，从改变一个或多个氨基酸到完全重新设计某区域，例如恒定区。恒定区的变化通常能获得所需的细胞加

工特性,例如改变补体结合、与膜相互作用和其它效应器功能。可在可变区中作出变化以改变其抗原结合特性。也可工程改造抗体以促进将分子或物质特异性递送到特定细胞或组织部位。可通过已知的分子生物学技术,例如重组技术、定点诱变等作出所需变化。

[0087] 还有另一例子是“单价抗体”,它是由重链 / 轻链二聚体与第二重链的 Fc 区 (即, 茎) 结合构成的聚集体。该类型抗体逃避抗原性调节。参见,例如 Glennie 等, Nature 295 : 712 (1982)。此抗体定义也包括抗体的“Fab”片段。“Fab”区指重链和轻链中的部分,那些部分与含有重链和轻链的分支部分的序列大致相等或类似,其显示在免疫学上能结合特定抗原但缺乏效应器 Fc 部分。“Fab”包括能与指定抗原或抗原家族选择性反应的一条重链和一条轻链的聚集体 (通常称为 Fab') 以及含有 2H 和 2L 链的四聚体 (称为 F(ab)2)。Fab 抗体可类似地分为上述那些的亚组,即“脊椎动物 Fab”、“杂交 Fab”、“嵌合型 Fab”和“改变的 Fab”。本领域已知产生抗体的 Fab 片段的方法,包括,例如蛋白水解和通过重组技术合成。

[0088] “抗原-抗体复合物”指由抗原和能与抗原的表位特异性结合的抗体形成的复合物。

[0089] 如果肽 (或肽试剂) 与另一肽或蛋白质特异性、非特异性地结合或 (发生) 特异性和非特异性结合的某种组合,则称二者“相互作用”。如果肽 (或肽试剂) 与致病性形式结合的亲和力和 / 或特异性高于非致病性同种型,则称其与致病性朊病毒蛋白“优先相互作用”。能优先与致病性朊病毒蛋白相互作用的肽试剂在本文也称为致病性朊病毒特异性肽试剂。应该知道优先相互作用无需在特定氨基酸残基和 / 或各肽的基序之间相互作用。例如,在某些实施方式中,本文所述的肽试剂与致病性同种型优先相互作用,而非致病性同种型的结合水平弱但能检测到 (例如,显示是感兴趣多肽结合的 10% 或更低)。例如,利用合适的对照通常不难区分弱结合或背景结合与感兴趣化合物或多肽的优先相互作用。本发明肽一般能在有 10^6 - 倍过量的非致病性形式存在下结合致病性朊病毒。

[0090] 术语“亲和力”指结合强度,可以定量表示为解离常数 (K_d)。能优先与致病性同种型相互作用的肽 (或肽试剂) 与该致病性同种型相互作用的亲和力优选比与非致病性同种型相互作用的亲和力至少高 2 倍,更优选至少高 10 倍,甚至更优选至少高 100 倍。采用标准技术可测定结合亲和力 (即, K_d)。

[0091] 本领域熟知测定氨基酸序列“相似性”或“相同性百分比”的技术。“相似性”通常表示在合适位置对两条或多条多肽进行氨基酸与氨基酸的比较,在这些位置的氨基酸相同或具有相似的化学和 / 或物理特性,例如,电荷或疏水性。然后可测定所比较的多肽序列之间所谓的“相同性百分比”。本领域也熟知测定核酸和氨基酸序列相同性的技术,包括测定该基因的 mRNA 的核苷酸序列 (一般通过 cDNA 中间体) 和测定其所编码的氨基酸序列,并将该序列与第二氨基酸序列比较。“相同性”通常分别指两条多核苷酸或多肽序列的核苷酸与核苷酸或氨基酸与氨基酸的确切一致性。

[0092] 可通过测定两条或多条氨基酸或多核苷酸序列的“相同性百分比”来比较这些序列。相同性百分比可通过以下步骤直接比较两个分子 (参比序列和与该参比序列的相同性 % 未知的序列) 之间的序列信息来确定: 比对序列,记下两条比对序列之间的确切匹配数目,除以参比序列的长度并将结果乘以 100。可使用方便可用的计算机程序来帮助分析,例如 Dayhoff, M. O. 的 Atlas of Protein Sequence and Structure (《蛋白质序列和结构图

集》), (M. O. Dayhoff 编., 5 增刊 3:353-358, National biomedical Research Foundation, 华盛顿, 哥伦比亚特区) 中的 ALIGN, 该程序采用了 Smith 和 Waterman (Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981) 的局部同源性算法进行肽分析。确定核苷酸序列相同性的程序可用 Wisconsin Sequence Analysis Package (威斯康星序列分析包), 第八版 (得自 Genetics Computer Group, Madison, WI) 中, 例如 BESTFIT、FASTA 和 GAP 程序, 这些程序也依赖 Smith 和 Waterman 算法。这些程序可方便地使用生产商推荐的和以上威斯康星序列分析包中描述的默认参数。例如, 具体核苷酸序列与参比序列的相同性百分比可使用 Smith 和 Waterman 同源性算法确定, 该算法采用默认评分表和 6 个核苷酸位置的空位罚分。

[0093] 本发明内容中建立相同性百分比的另一方法是使用 John F. Collins 和 Shane S. Sturrok 开发, 爱丁堡大学版权所有的 MPSRCH™ 程序包, 该程序包可从多种来源获得, 例如因特网。这套程序包可使用 Smith-Waterman 算法, 其中评分表使用默认参数 (例如, 空位开放罚 12 分、空位延伸罚 1 分、一个空位罚 6 分)。产生“匹配”值的数据反映了“序列相同性”。计算序列之间相同性或类似性百分比的使用默认参数的其它合适程序一般是本领域已知的, 例如另一比对程序是 BLAST。例如, BLASTN 和 BLASTP 可以使用以下默认参数: 遗传密码=标准; 过滤器=无; 链=两条; 截断值=60; 预期值=10; 矩阵=BLOSUM62; 描述=50 条序列; 分类标准=高分; 数据库=非冗余, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 翻译+Swiss 蛋白+Spupdate+PIR。这些程序的细节不难获得。

[0094] 本文所用的“免疫原性组合物”指给予对象后能导致该对象产生体液和 / 或细胞免疫应答的任何组合物 (例如, 肽、抗体和 / 或多核苷酸)。免疫原性组合物可通过, 例如注射、吸入、口服、鼻内或任何其它胃肠外或粘膜 (如, 直肠内或阴道内) 给药途径直接引入受者对象中。

[0095] “表位”表示在抗原上能诱导特异性 B 细胞和 / 或 T 细胞应答反应赋予该分子免疫原性的位点, 包括能引发免疫学反应或能与生物学样品中存在的抗体反应的表位。该术语也可与“抗原决定簇”或“抗原决定簇位点”互换使用。表位可含有 3 个或更多个氨基酸, 这些氨基酸的空间构象为该表位所特有。表位通常由至少 5 个氨基酸构成, 更常由至少 8-10 个氨基酸构成。本领域已知测定氨基酸空间构象的方法, 包括, 例如 X-射线晶体学和二维核磁共振。此外, 采用本领域熟知的技术不难鉴定给定蛋白质的表位, 例如采用疏水性研究和定点血清学。也参见, Geysen 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:3998-4002 (快速合成肽来测定给定抗原中免疫原性表位位置的通用方法); 美国专利号 4,708,871 (鉴定和化学合成抗原的表位的方法); 和 Geysen 等, Molecular Immunology (1986) 23:709-715 (鉴定对给定抗体具有高亲和力的肽的技术)。可以用简单的显示一种抗体阻断另一抗体与靶抗原结合能力的免疫测定鉴定能识别同一表位的抗体。

[0096] 本文所用的“免疫学应答”或“免疫应答”是当本文所述某肽存在于疫苗组合物中时, 对象对其产生体液和 / 或细胞免疫应答。这些抗体也能中和感染和 / 或介导抗体-补体或依赖抗体的细胞毒性从而为受免疫宿主提供保护力。可采用本领域熟知的标准免疫测定, 例如竞争试验来测定免疫学反应。

[0097] “基因转移”或“基因递送”指可靠地将感兴趣的 DNA 插入宿主细胞的方法或系统。这种方法可导致非整合性转移的 DNA 瞬时表达, 转移复制子 (例如, 附加体) 的染色体外复制和表达, 或转移的遗传物质整合入宿主细胞的基因组 DNA 中。基因递送表达载体包括但

不限于源自甲病毒、痘病毒和牛痘病毒的载体。当用于免疫时,这种基因递送表达载体可称为疫苗或疫苗载体。

[0098] 术语“样品”包括生物学和非生物学样品。生物学样品是从活的或曾经活的生物获得或衍生的样品。非生物学样品不是从活的或曾经活的生物获得。生物学样品包括但不限于:从动物(活的或死的)获得的样品,例如器官(如大脑、肝脏、肾脏等)、全血、血液成分、血浆、脑脊液(CSF)、尿、眼泪、组织、器官、活检。非生物学样品的例子包括药物、食物、化妆品等。

[0099] 术语“标记物”和“可检测标记”指能检测的分子,包括但不限于:放射性同位素、荧光剂、发光剂(luminescer)、化学发光剂、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑试剂、生色团、染料、金属离子、金属液胶、配体(例如,生物素或半抗原)等。术语“荧光剂”指能显示可检测范围荧光的物质或其一部分。本发明可用的标记物具体例子包括但不限于:荧光素、罗丹明、丹酰、伞形酮、德克萨斯红、鲁米诺、吖啶酯(acridinium ester)、NADPH、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶和脲酶。标记物也可以是表位标签(例如,His-His标签)、抗体或可扩增的或其它可检测的寡核苷酸。

[0100] II. 概述

[0101] 本文描述了利用肽试剂检测样品中致病性朊病毒的方法,其中所述肽试剂能通过,例如优先结合一种形式而不结合另一种来区分朊病毒蛋白的致病性和非致病性同种型。本发明人利用这些肽试剂开发了检测样品中是否存在致病性朊病毒的灵敏方法。本文与以下共有专利申请均描述了这些肽试剂:2004年8月13日提交的美国系列号10/917,646;2005年2月11日提交的美国系列号11/056,950;2004年8月13日提交的PCT申请号PCT/US2004/026363。因为肽试剂优先与朊病毒的致病性形式相互作用,它们能从含有细胞(即,非致病性)朊病毒蛋白和致病性朊病毒蛋白的样品中有效分离和浓缩致病性朊病毒。与以前描述的检测PrP^{Sc}的方法不同,无需用蛋白酶K或其它蛋白酶消化。通常在固体支持物(优选磁力珠)上提供肽试剂,从而不难分离与肽试剂结合的致病性朊病毒蛋白与样品的其它组分,特别是非致病性朊病毒蛋白。可任选洗涤结合的致病性朊病毒以除去任何痕量的未结合物质。然后可通过加入离液剂或优选通过改变pH使结合的致病性朊病毒与肽试剂解离。

[0102] III. A. 肽试剂

[0103] 本发明部分依赖于本发明人发现朊病毒蛋白的较小片段能优先与朊病毒的致病性形式相互作用。这些片段无需是较大蛋白质结构的一部分或其它类型的支架分子,即能显示与致病性朊病毒同种型的这种优先相互作用。虽然不想遵循任何具体理论,看来这些肽片段可能是通过模拟非致病性同种型中存在的构象而自发采取能与致病性朊病毒同种型而不是非致病性朊病毒同种型结合的构象。不难将这种通用原理,即构象疾病蛋白的某些片段能优先与该构象疾病蛋白(本文证明是朊病毒)的致病性形式相互作用应用于其它构象疾病蛋白,从而产生能优先与致病性形式相互作用的肽试剂。本领域普通技术人员应知道,虽然这些片段提供了起始点(例如,就大小或序列特征而言),但可对这些片段作出许多修饰来产生具有更理想属性(例如,亲和力较高、稳定性较高、溶解性较高、蛋白酶敏感性较低、特异性较高、易于合成等)的肽试剂。

[0104] 本文所述肽试剂通常能优先与朊病毒蛋白的致病性形式相互作用。因此,用这些

肽试剂不难检测致病性朊病毒蛋白是否存在,进而在实际上任何生物学或非生物学样品中(包括活的或死的大脑、脊髓或其它神经系统组织以及血液)诊断朊病毒相关疾病。

[0105] 此外,可利用任何合适的信号放大系统来进一步促进检测,包括但不限于:利用支链 DNA 扩增信号(参见,例如美国专利号 5,681,697;5,424,413;5,451,503;5,4547,025;和 6,235,483);应用靶扩增技术,例如 PCR、滚环扩增、Third Wave 的侵入物(invader)(Arruda 等,2002Expert. Rev. Mol. Diagn. 2:487;美国专利号 6090606、5843669、5985557、6090543、5846717)、NASBA、TMA 等(美国专利号 6,511,809;EP0544212A1);和/或免疫-PCR 技术(参见,例如美国专利号 5,665,539;国际公布 W098/23962;W000/75663 和 W001/31056)。

[0106] 本文描述的肽试剂能与构象疾病蛋白的致病性形式相互作用。本文中构象疾病蛋白的例子是朊病毒蛋白。

[0107] 以下是与假定有两种或多种不同构象蛋白相关的疾病的非限制性列表。

[0108]

疾病	构象疾病蛋白
朊病毒疾病(例如,克罗伊茨费尔特-雅各布病、瘙痒症、牛海绵样脑病)	PrP ^{Sc}
阿尔茨海默病	APP, A* 肽, *1- 抗胰凝乳蛋白酶, tan, 非-A* 组分
ALS	SOD 和神经微丝
匹克病	匹克体
帕金森病	Lewy 体
I 型糖尿病	胰岛淀粉样多肽
多发性骨髓瘤-浆细胞失调症	IgGL- 链
家族性淀粉样多发性神经病(familial amyloidotic polyneuropathy)	运甲状腺素蛋白
甲状腺髓样瘤	原降钙素
慢性肾功能衰竭	B2- 球蛋白
充血性心力衰竭	心房钠因子
老年心脏和全身性淀粉样变性(senile cardiac and systemic amyloidosis)	运甲状腺素蛋白
慢性炎症	血清淀粉样蛋白 A
动脉粥样硬化	ApoA1
家族性淀粉样变性	凝溶胶蛋白

[0109] 此外,以上列出的构象疾病蛋白各包含许多变体或突变体,从而导致不同的蛋白品系(strain),这些蛋白品系均属于本发明。下文给出了小鼠朊病毒蛋白的各种区域和序列的功能分析。也参见 Priola(2001)Adv. Protein Chem. 57:1-27。按照标准方法和本文的指导不难测定对应于下文所述小鼠(Mo)、仓鼠(Ha)、人(Hu)、鸟(A)和绵羊(Sh)的其它物种的区域和残基。

[0110]

氨基酸	功能
Mo1-28	易位结构域(切割的)
22	推定的切割位点
23-28	与蛋白 X 结合位点可能相互作用的基本区域,因为其缺失会消除朊病毒蛋白的 C 末端中蛋白 X 相关突变的作用

23-88	八个重复区域 (1-9 个插入和 2 个缺失促进了疾病) ; 各重复中通过组氨酸铜配位
34-52	显示能形成聚脯氨酸螺旋, 也形成羟基脯氨酸的八 个重复部分
86-91	蛋白酶 K 消化时 PrP ^{Sc} 的切割位点
Hu82-146	在 GSS 患者的患病大脑中发现的 7Kda 片段 ; 对应 于该区域的合成肽形成离子通道
HuP102	GSS 相关的 P102L 突变显示不导致朊病毒蛋白自 发转变为蛋白酶耐受构象 ; 在检查的所有物种中脯 氨酸是保守的。
HuP105	GSS 相关的 P102L 突变显示不导致朊病毒蛋白自 发转变为蛋白酶耐受构象 ; 在检查的所有物种中脯 氨酸是保守的。
Hu102-105	PXXP 基序 ; 可能的聚脯氨酸 II 型螺旋
Mo_106	与疾病抵抗力相关
Hu106-126	提示形成铜调节离子通道的合成肽突变形式 ; G114 和 G119 显示降低了该肽的原纤维生成作用, 因为 当二者突变为 A 时更能促淀粉样变。
Mo_111	与疾病抵抗力相关的
Sh104-113	肽与 D13Fab 共结晶
Ha109-112	如晶体结构所示, D13 肽特异性识别的环 (M109 和 M112 插入 Fab 的结合袋中)
Hu113-120	回文序列 ; 完全保守的
A117V	回文序列中的致病性突变 ; 提高了含该区域的肽的 促淀粉样变特性
Ha129-131	PrPC 中的 β 片层 1
Hu129/Go132	与对朊病毒疾病的敏感性和 / 或抵抗力有关的多态 性
Ha136	绵羊中丙氨酸的多态性与有被小窝增加相关
Mo138/Go142	与对朊病毒疾病的敏感性和 / 或抵抗力有关的多态 性
Mo141-176	小鼠的小朊病毒 (miniprion) PrP106 中缺失的区域 (沿着 23-88) 没有作用 ; 提示该区域没有实质功能
Ha144-154	螺旋 A
Ha155	与对朊病毒疾病的敏感性和 / 或抵抗力有关的多态 性
Ha160-163	片层 2
MoV165	物种障碍 ; 当人转基因小鼠的这些残基突变回小鼠 序列时, 能得到更快的培育时间。
MoQ167	物种障碍 ; 当人转基因小鼠的这些残基突变回小鼠 序列时, 能得到更快的培育时间。
MoQ168	推定的蛋白质 X 结合位点 ; 当其突变时能保护抵御 朊病毒疾病
Sh171	与对朊病毒疾病的敏感性 / 抵抗力有关的多态性
MoQ172	推定的蛋白质 X 结合位点 ; 当其突变时能保护抵御 朊病毒疾病
176	二硫键连接的半胱氨酸
Ha173-194	螺旋 B
178	疾病相关突变

180	疾病相关突变 ;糖基化位点
196	糖基化位点
198	疾病相关突变
Ha200-228	螺旋 C
HuE200	与 Lybian 犹太人家族性 CJD 相关的突变为 K(组合 M129 多态性也增加了患病的机会)
208	疾病相关突变
210	疾病相关突变
MoQ219	推定的蛋白质 X 结合位点 ;当其突变时能保护抵御朊病毒疾病
232	疾病相关突变
232	GPI 锚
约 233	推定的 GPI 锚切割位点
233-254	从突变蛋白质中除去的部分

[0111] 也应注意具有相同氨基酸序列的朊病毒蛋白 (和其它构象疾病蛋白) 具有两种不同的三维构象。一种构象与疾病特征相关,通常不可溶 ;而另一构象与疾病特征无关,是可溶的。参见,例如 Wille 等,“Structural Studies of the Scrapie Prion Protein by Electron Crystallography”(通过电子晶体学研究搔痒症朊病毒蛋白的结构), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 99(6) :3563-3568 (2002)。虽然用朊病毒蛋白作了示范,但本发明不限于所列的疾病、蛋白质和蛋白品系。

[0112] 因此,在某些方面,本文描述的肽试剂包含衍生自天然蛋白质的氨基酸序列,例如构象疾病蛋白 (如朊病毒蛋白) 或含有显示与朊病毒蛋白同源的基序或序列的蛋白。具体地说,本发明肽试剂通常衍生自天然的朊病毒蛋白。肽试剂最好衍生自朊病毒蛋白某些区域的氨基酸序列。这些优选区域的例子是小鼠朊病毒序列 (SEQ ID NO :2), 氨基酸残基 23-43 和 85-156 的区域及其亚区域。本发明不限于衍生自小鼠序列的肽试剂,也包括以本文所述的类似方式衍生自任何物种 (包括人、牛、绵羊、鹿、麋鹿、仓鼠) 的朊病毒序列的肽试剂。当本文所述的肽试剂衍生自朊病毒蛋白时,其可包含聚脯氨酸 II 型螺旋基序。该基序含有通用序列 PxxP (例如,SEQ ID NO :1 的残基 102-105), 虽然有人提出其它序列,特别是丙氨酸四肽也能形成聚脯氨酸 II 型螺旋 (参见,例如 Nguyen 等, Chem Biol. 20007 :463 ; Nguyen 等, Science 1998 282 :2088 ;Schweitzer-Stenner 等, J. Am. Chem Soc. 2004 126 :2768)。在 PxxP 序列中,“x”可以是任何氨基酸,“P”在天然产生的序列中是脯氨酸,但在本发明肽试剂中可用脯氨酸替代品取代。这种脯氨酸替代品包括通常称为拟肽的 N- 取代甘氨酸。因此,在包含基于 PxxP 序列的聚脯氨酸 II 型螺旋的本发明肽试剂中,“P”代表脯氨酸或 N- 取代甘氨酸残基,“x”代表任何氨基酸或氨基酸类似物。特别优选的 N- 取代甘氨酸是本文所述的。

[0113] 此外,已知许多不同物种,包括人、小鼠、绵羊和牛产生的朊病毒蛋白的多核苷酸序列和氨基酸序列。各物种中也存在这些序列的变体。因此,本发明所用的肽试剂包含任何物种的氨基酸序列或变体的片段或衍生物。例如,在某些实施方式中,本文所述的肽试剂衍生自图 2 所示的任一序列 (SEQ ID No :3-11)。本文专门公开的肽试剂的序列通常以小鼠朊病毒序列为基础,然而本领域技术人员在适当的时候不难取代其它物种的相应序列。例如,如果需要诊断或治疗人,可方便地用相应的人序列替代小鼠序列。在一具体例子中,在衍生自约残基 85- 约残基 112 区域的肽试剂中 (例如,SEQ ID NO :35、36、37、40), 可用甲硫

氨酸替代对应于残基 109 位的亮氨酸,用甲硫氨酸替代对应于残基 112 位的缬氨酸,用丝氨酸替代对应于残基 97 位的天冬酰胺。类似地,如果需要诊断牛,可在公开的表位序列中作出合适取代以反映牛朊病毒序列。因此,接着上文衍生自约残基 85- 约残基 112 区域的肽试剂的例子,可用甲硫氨酸替代对应于残基 109 位的亮氨酸,用甘氨酸替代对应于残基 97 位的天冬酰胺。也可用这些序列含氨基酸取代、缺失、添加和其它突变的朊病毒蛋白衍生物。与朊病毒蛋白序列相比,任何氨基酸取代、添加和缺失最好不会影响该肽试剂与致病性形式相互作用的能力。

[0114] 应该知道无论本文所述肽试剂是何种来源,这些肽试剂不一定与已知的朊病毒蛋白序列相同。因此,与天然产生的朊病毒蛋白或本文公开的序列相比,本文所述肽试剂可包含一个或多个氨基酸取代、添加和缺失,只要它们保留了优先与构象疾病蛋白的致病性形式相互作用的能力。某些实施方式优选保守性氨基酸取代。保守性氨基酸取代是在侧链相似的氨基酸家族内的取代。遗传编码的氨基酸通常分为 4 个家族:(1) 酸性=天冬氨酸、谷氨酸;(2) 碱性=赖氨酸、精氨酸、组氨酸;(3) 非极性=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸;和(4) 无电荷极性=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、色氨酸、苏氨酸、酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时一起分类为芳族氨基酸。例如,可以合理地估计分别用异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸,用谷氨酰胺取代天冬酰胺,用丝氨酸取代苏氨酸,或用结构上相关的氨基酸类似地保守性取代某氨基酸对生物学活性不会产生大的影响。

[0115] 也应明白可利用天然氨基酸和非天然氨基酸的任何组合来制备本文所述肽试剂。经常遇到的非基因编码的氨基酸类似物包括但不限于:鸟氨酸(Orn);氨基异丁酸(Aib);苯并硫代苯丙氨酸(benzothiophenylalanine)(BtPhe);合欢氨酸(Abz);叔丁基甘氨酸(Tie);苯基甘氨酸(PhG);环己基丙氨酸(Cha);正亮氨酸(NIe);2- 萘基丙氨酸(2-Nal);1- 萘基丙氨酸(1-Nal);2- 噻吩丙氨酸(2-Thi);1,2,3,4- 四氢异喹啉-3- 羧酸(Tic);N- 甲基异亮氨酸(N-MeIle);高精氨酸(Har);N α - 甲基精氨酸(N-MeArg);磷酸酪氨酸(pTyr 或 pY);六氢吡啶羧酸(Pip);4- 氯苯丙氨酸(4-ClPhe);4- 氟苯丙氨酸(4-FPhe);1- 氨基环丙烷羧酸(1-NCPC);和肌氨酸(Sar)。本发明肽试剂中所用的任何氨基酸可以是 D- 同种型,或更典型是 L- 同种型。

[0116] 可用于形成本文所述肽试剂的其它非天然产生的氨基酸类似物包括拟肽和/或肽模拟化合物,例如生物学功能相同氨基酸的磺酸和硼酸类似物也可用于本发明化合物中,包括具有可任选用等构物取代的一个或多个酰胺键的化合物。例如,在本发明内容中,-CONH- 可由 --CH₂NH-、-NHCO-、-SO₂NH-、-CH₂O-、-CH₂CH₂-、-CH₂S-、-CH₂SO-、-CH=CH- (顺式或反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂- 和 1,5- 二取代的四唑取代,从而使得由这些等构物连接的键可维持与 -CONH- 连接键相似的取向。本文所述肽试剂中一个或多个残基可包含拟肽。

[0117] 因此,肽试剂也可包含一个或多个 N- 取代的甘氨酸残基(具有一个或多个 N- 取代的甘氨酸残基的肽可称为“拟肽”)。例如,在某些实施方式中,N- 取代的甘氨酸残基可替代本文所述任何肽试剂中一个或多个脯氨酸残基。在这点上。合适的特定 N- 取代甘氨酸包括但不限于:N-(S)-(1- 苯基乙基)甘氨酸;N-(4- 羟基苯基)甘氨酸;N-(环丙基甲基)甘氨酸;N-(异丙基)甘氨酸;N-(3,5- 二甲氧基苄基)甘氨酸;和 N- 氨基丁基甘氨酸(例如,图 3)。其它 N- 取代的甘氨酸也适合于替代本文所述肽试剂序列中的一个或多个氨基酸残

基。这些和其它氨基酸类似物和肽模拟物的综述可参见 Nguyen 等, (2000) Chem Biol. 7 (7) : 463-473 ; Spatola, A. F., 刊于 Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins (《氨基酸、肽和蛋白质的化学和生物化学》), B. Weinstein 编, Marcel Dekker, 纽约, 第 267 页, (1983)。也可参见 Spatola, A. F., Peptide Backbone Modifications (《肽骨架修饰》) (综述), Vega Data, 第 1 卷, 第 3 版, (1983 年 3 月) ; Morley, Trends Pharm Sci (综述), 第 463-468 页, (1980) ; Hudson, D. 等, Int J Pept Prot Res, 14 : 177-185 (1979) ($-\text{CH}_2\text{NH}-$, CH_2CH_2-) ; Spatola 等, Life Sci, 38 : 1243-1249 (1986) ($-\text{CH}_2-\text{S}-$) ; Hann J., Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307-314 (1982) ($-\text{CH}-\text{CH}-$, 顺式和反式) ; Almquist 等, J Med Chem, 23 : 1392-1398 (1980) ($-\text{COCH}_2-$) ; Jennings-White 等, Tetrahedron Lett, 23 : 2533 (1982) ($-\text{COCH}_2-$) ; Szelke 等, 欧洲申请 EP45665CA : 97 : 39405 (1982) ($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$) ; Holladay 等, Tetrahedron Lett, 24 : 4401-4404 (1983) ($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$) ; 和 Hruby, Life Sci, 31 : 189-199 (1982) ($-\text{CH}_2-\text{S}-$) ; 各篇文献纳入本文作为参考。可用硼酸 $-\text{B}(\text{OH})_2$ 或硼酸酯 $-\text{B}(\text{OR})_2\text{O}$ 或纳入本文作为参考的美国专利号 5, 288, 707 公开的其它硼酸衍生物替代 C- 末端羧酸。

[0118] 本文所述肽试剂可包含单体、多聚体、环化分子、支链分子、接头等。也考虑了本文所述任何序列的多聚体 (即, 二聚体、三聚体等) 或其生物学功能等价物。多聚体可以是均多聚体, 即由相同的单体构成, 例如各单体的肽序列相同。或者, 多聚体可以是杂多聚体, 表示所有构成多聚体的单体不都相同。

[0119] 可通过将单体直接彼此连接或与基质连接来形成多聚体, 包括例如多抗原肽 (MAPS) (如, 对称的 MAPS), 与聚合物支架, 如 PEG 支架相连的肽和 / 或含或不含间隔臂单元的串联连接肽。

[0120] 或者, 可将连接基团加入单体序列从而将各单体连接在一起进而形成多聚体。利用连接基团的多聚体的非限制性例子包括利用甘氨酸接头的串联重复 ; 通过接头与基质连接的 MAPS 和 / 或通过接头与支架相连的线性连接肽。本领域技术人员已知连接基团可包含双功能间隔臂单元 (同双功能或异双功能)。例如 (不限于) 利用诸如琥珀酰亚胺基 -4-(对马来酰亚胺基甲基) 环己烷 -1- 羧酸酯 (SMCC)、琥珀酰亚胺基 -4-(对马来酰亚胺基苯基) 丁酸酯等试剂掺入这种间隔臂单元将肽连接在一起的许多方法描述于 Pierce Immunotechnology Handbook (《皮尔斯免疫技术手册》) (Pierce Chemical Co., Rockville, 111.) 并可利用 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) 和 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.) 及 “Comprehensive Organic Transformations” (《综合有机化学转化》), VCK-Verlagsgesellschaft, Weinheim/ 德国 (1989) 描述的方法。可用于将单体序列连接在一起的连接基团的例子是 $-\text{Y}_1-\text{F}-\text{Y}_2$, 其中 Y_1 和 Y_2 相同或不同, 它们是 0-20 个, 优选 0-8 个, 更优选 0-3 个碳原子的亚烷基, F 是一个或多个官能团, 例如 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}-$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{O})-\text{NR}-$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{S})-\text{NR}-$ 、 $-\text{NR}-\text{C}(\text{S})-\text{O}-$ 。 Y_1 和 Y_2 可任选用羟基、烷氧基、羟基烷基、烷氧基烷基、氨基、羧基、羧基烷基等取代。应该知道单体的任何合适原子可与连接基团相连。

[0121] 此外, 本发明肽试剂可以是线性、支链或环状。可环化单体单元或将其连接在一起以提供线形或支链形式、环形 (例如, 大环)、星形 (树状体) 或球形 (例如, 富勒烯)。本领域技术人员不难知道可从本文公开的单体序列形成多种聚合物。在某些实施方式中, 多

聚体是环状二聚体。使用上述相同的术语,二聚体是均二聚体或杂二聚体。

[0122] 可通过上述任一键制成环状形式(无论单体或多聚体),例如但不限于:(1)通过在氮和C-末端羰基之间直接形成酰胺键或通过中介性间隔基团(例如通过与含ε-氨基的羧酸缩合)使C-末端羧酸与N-末端胺环化;(2)通过在两个残基的侧链之间形成键,例如在天冬氨酸或谷氨酸侧链与赖氨酸侧链之间形成酰胺键,或在两个半胱氨酸侧链之间或在青霉胺与半胱氨酸侧链之间或在两个青霉胺侧链之间形成二硫键来环化;(3)通过分别在侧链(例如,天冬氨酸或赖氨酸)与N-末端胺或C-末端羧基之间形成酰胺键来环化;和/或(4)通过中介性短碳间隔臂基团连接两个侧链。

[0123] 本文所述肽试剂最好没有致病性和/或传染性。

[0124] 本发明肽试剂可以长3-约100个残基(或其中的任何值)或者甚至更长,优选约4-75个残基(或其中的任何值),优选约5-约63个残基(或其中的任何值),甚至更优选约8-约30个残基(或其中的任何值),最优选肽试剂长10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个残基。

[0125] 本文所述组合物和方法所用的肽试剂的非限制性例子衍生自表1和表4所示序列。表中的肽试剂以常规的单字母氨基酸密码表示,N-末端在左C-末端在右描述。方括号中的氨基酸表示不同肽试剂中可用于该位置的替代残基。圆括号表明肽试剂中这些残基可存在或缺失。可用N-取代的甘氨酸残基取代任何脯氨酸残基以形成拟肽。表中的任何序列在N-和/或C-末端可任选包含Gly接头(G_n,其中n=1、2、3或4)。

[0126] 表1

[0127]

肽序列	SEQ ID NO
KKRPK	12
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC	13
(GGG)QWNKPSKPKTN	14
QWNKPSKPKTNMKHV	15
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGEN	16
TTKGENFTETD	17
GENFTETD	18
GENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	19
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	20
[A/V/T/M][V/I]LFSSPPVILLISFLIFL[I/M]VG	21
G[N/S]D[W/Y]EDRYRENH[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y[S/N]NQN[N/T]FVH	22
N[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTK	23
VYYR	24
RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]	25
KKRPKPGG(G)WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG	26
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)	27
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG	28
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTN	29
GGTHSQWNKPSKPKTN	30

WNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGG (G) [G/T]WGQPHGGGWGQ PHGGGWGQPHGG	31
GQPHGGGW	32
RPIIHFGSDYEDRYRENMR	33
RPMIHFGNDWEDRYRENMYR	34
(GGG)C (GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV (GGG) C	35
(GGG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV (GGG)	37
[M/L]KH [M/V]	38
KPKTN [M/L]KH [M/V]	39
C (GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV (GGG)C	40
SRPIIHFGSDYEDRYRENMRYPN	41
PMIHFGNDWEDRYRENMYRPVD	42
AGAAAAGAVVGLGGYMLGSAM	43
RPMIHFGNDWEDRYRENMYR (GGG)	44
GGGRPMIHFGNDWEDRYRENMYRGG	45
(GG)C (GGG)RPMIHFGNDWEDRYRENMYR (GGG)C	46
AGAAAAGAVVGLGG	47
GGLGG	48
LGS	49
QWNKPSKPKTN (GGG)	50
QWNKPSKPKTN (GGG)QWNKPSKPKTN	51
QWNKPSKPKTNLKHV (GGG)	52
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53
GGTHNQWNKPSKPKTN	54
(GGG)AGAAAAGAVVGLGGYMLGSAM	55
(GGG)AGAAAAGAVVGLGG	56
(KKK)AGAAAAGAVVGLGGYMLGSAM	57
YMLGSAM[S/N]R	58
[S/N]RP [M/I/L] [I/L]H	59
YMLGSAM[S/N]RP [M/I/L] [I/L]H	60
YMLGSAM[S/N]RP [M/I/L] [I/L]HFG [N/S]D	61
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYP [M/V]D [Q/E/R]Y	62
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYP [M/V]D [Q/E/R]Y [S/N]N QN [N/T]	63
D [Q/E/R]Y [S/N]NQN [N/T]	64
(KKK)AGAAAAGAVVGLGG	65
(GGG)KKRPPKPGWNTGGSRYPGQGS	66
(GGG)KKRPPKPGWNTGG	67
(GGG)KKRPPKPG	68
PHGGGWGQHGGSWGQPHGGSWGQ	69
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70
PHGGGWGQ	71
(GGG)KKRPPKPGGKKRPPKPG	72
(GGG)GPKRKGP	73
(GGG)WNTGGSRYPGQGS	74
(GGG)WNKPSKPKT	75
(GGG)RPMIHFGNDWEDRYRENMYR (GG)C	76
QWNKPSKPKTNLKHV (GGG)	77
(GGG)AGAAAAGAVVGLGGYMLGSAM	78
(GGG)NKPSKPK	79

(GGG) KPSKPK	80
(GGG) KKRPKPGGQWNKPSKPKTN	81
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	82
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	83
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMKKK	84
(GGG) KKKKKKKK	85
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	86
(GGG) NNKQSPWPTKK	87
DKDKGGV GALAGAAVAAGGDKDK	88
(GGG) QANKPSKPKTN	89
(GGG) QWNKASKPKTN	90
(GGG) QWNKPSKAKTN	91
(GGG) QWNAPSKPKTN	92
(GGG) QWNKPSAPKTN	93
(GGG) QWNKPSKPKTN	94
(GGG) QWNKASKAKTN	95
(GGG) KKRAKPGG	96
(GGG) KKRPKAGG	97
(GGG) KKRAKAGG	98
(GGG) QWNKASKPKTN	99
(GGG) QWAKPSKPKTN	100
(GGG) QWNKPAKPKTN	101
(GGG) QWNKPSKPKAN	102
(GGG) QWNKPSKPKTA	103
(GGG) AKRPPGG	104
(GGG) KARP KPGG	105
(GGG) KKAPKPGG	106
(GGG) KKRPPAGG	107
(GGG) KKAPKAGG	108
(GGG) KKRPKPGGWNTGG	127
QWNKPSKPKTN GGGQWNKPSKPKTN GGGQWNKPSKPKTN	128
((QWNKPSKPKTN)) 2K	133
4- 支链 MAPS-GGGKKRPPGGWNTGGG	134
8- 支链 MAPS-GGGKKRPPGGWNTGGG	135
KKKAGAAAAGAVVGGLGG-CONH ₂	136
DLGLCKKRPPKPGGXWNTGG	137
DLGLCKKRPPKPGGXWNTG	138
DLGLCKKRPPKPGGXWNT	139
DLGLCKKRPPKPGGXWN	140
DLGLCKKRPPKPGGXW	141
DLGLCKKRPPKPGGX	142
LGLCKKRPPKPGGXWNTG	143
LGLCKKRPPKPGGXWNT	144
LGLCKKRPPKPGGXWN	145
LGLCKKRPPKPGGXW	146
LGLCKKRPPKPGGX	147
GLCKKRPPKPGGXWNTGG	148
GLCKKRPPKPGGXWNTG	149
GLCKKRPPKPGGXWNT	150
GLCKKRPPKPGGXWN	151
GLCKKRPPKPGGXW	152
GLCKKRPPKPGGX	153

LCKKRPKPGGXWNTGG	154
LCKKRPKPGGXWNTG	155
LCKKRPKPGGXWNT	156
LCKKRPKPGGXWN	157
LCKKRPKPGGXW	158
LCKKRPKPGGX	159
CKKRPKPGGXWNTGG	160
CKKRPKPGGXWNTG	161
CKKRPKPGGXWNT	162
CKKRPKPGGXWN	163
CKKRPKPGGXW	164
CKKRPKPGGX	165
KKRPKPGGXWNTGG	166
KKRPKPGGXWNTG	167
KKRPKPGGXWNT	168
KKRPKPGGXWN	169
KKRPKPGGXW	170
KKRPKPGGX	171
DVGLCKKRPKPGGXWNTGG	172
DVGLCKKRPKPGGXWNTG	173
DVGLCKKRPKPGGXWNT	174
DVGLCKKRPKPGGXWN	175
DVGLCKKRPKPGGXW	176
DVGLCKKRPKPGGX	177
VGLCKKRPKPGGXWNTG	178
VGLCKKRPKPGGXWNT	179
VGLCKKRPKPGGXWN	180
VGLCKKRPKPGGXW	181
VGLCKKRPKPGGX	182
THSQWNKPSKPKTNMKHM	183
THSQWNKPSKPKTNMKH	184
THSQWNKPSKPKTNMK	185
THSQWNKPSKPKTNM	186
THSQWNKPSKPKTN	187
HSQWNKPSKPKTNMKHM	188
HS QWNKPSKPKTNMKH	189
HSQWNKPSKPKTNMK	190
HSQWNKPSKPKTNM	191
HSQWNKPSKPKTN	192
SQWNKPSKPKTNMKHM	193
SQWNKPSKPKTNMKH	194
SQWNKPSKPKTNMK	195
SQWNKPSKPKTNM	196
SQWNKPSKPKTN	197
QWNKPSKPKTNMKHM	198
QWNKPSKPKTNMKH	199
QWNKPSKPKTNMK	200
QWNKPSKPKTNM	201
THSQWNKPSKPKTNMKHV	202
HSQWNKPSKPKTNMKHV	203
SQWNKPSKPKTNMKHV	204
QWNKPSKPKTNMKHV	205

THGQWNKPSKPKTNMKHM	206
THGQWNKPSKPKTNMKH	207
THGQWNKPSKPKTNMK	208
THGQWNKPSKPKTNM	209
THGQWNKPSKPKTN	210
HGQWNKPSKPKTNMKHM	211
HGQWNKPSKPKTNMKH	212
HGQWNKPSKPKTNMK	213
HGQWNKPSKPKTNM	214
HGQWNKPSKPKTN	215
GQWNKPSKPKTNMKHM	216
GQWNKPSKPKTNMKH	217
GQWNKPSKPKTNMK	218
GQWNKPSKPKTNM	219
GQWNKPSKPKTN	220
THGQWNKPSKPKTNMKHV	221
HGQWNKPSKPKTNMKHV	222
GQWNKPSKPKTNMKHV	223
THNQWNKPSKPKTNMKHM	224
THNQWNKPSKPKTNMKH	225
THNQWNKPSKPKTNMK	226
THNQWNKPSKPKTNM	227
THNQWNKPSKPKTN	228
HNQWNKPSKPKTNMKHM	229
HNQWNKPSKPKTNMKH	230
HNQWNKPSKPKTNMK	231
HNQWNKPSKPKTNM	232
HNQWNKPSKPKTN	233
NQWNKPSKPKTNMKHM	234
NQWNKPSKPKTNMKH	235
NQWNKPSKPKTNMK	236
NQWNKPSKPKTNM	237
NQWNKPSKPKTN	238
THNQWNKPSKPKTNMKHV	239
HNQWNKPSKPKTNMKHV	240
NQWNKPSKPKTNMKHV	241
PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ	242
GGWGGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHM	243
QWNKPSKPKTNMKHMGGGQWNKPSKPKTNMKHM	244
GGWGGGGTH[N/S]QWNKPSKPKTN[L/M]KH[V/M](GGGG)	245
PHGGGWGQH[G/S]SWGQPHGG[G/S]WGQ	246
QWNKPSKPKTN[L/M]KH[V/M](GGG)	247
4-支链 MAPS-(GGG)QWNKPSKPKTN(GGG)	259
8-支链 MAPS-(GGG)KKRPKPGGWT(GGG)	260

[0128] 一方面,本发明方法所用的肽试剂包括本文公开的各种肽及其衍生物(如本文所述)。因此,本发明包括衍生自以下所示任一序列的肽及其类似物(例如,用N-取代甘氨酸取代一个或多个脯氨酸)和衍生物的肽试剂:SEQ ID NO:12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、

96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259 或 260。

[0129] 本发明方法优选利用衍生自以下所示肽及其类似物（例如，用 N- 取代甘氨酸取代一个或多个脯氨酸）和衍生物的肽试剂：SEQ ID NO：12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、72、74、76、77、78、81、82、84、89、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259 或 260。

[0130] 在某些实施方式中，这些方法所用的肽试剂能与致病性朊病毒特异性结合，例如衍生自以下所示肽及其类似物（例如，用 N- 取代甘氨酸取代一个或多个脯氨酸）和衍生物的肽试剂：SEQ ID NO：66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、56、57、65、82、84、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259 或 260。

[0131] 如上所述，本文所述肽试剂可包含一个或多个取代、添加和 / 或突变。例如，可用其它残基（如丙氨酸残基）或用氨基酸类似物或 N- 取代的甘氨酸残基取代肽试剂中一个或多个残基来制备拟肽（参见，例如 Nguyen 等，(2000) Chem Biol. 7(7)：463-473）。此外，本文所述肽试剂也可包含其它肽或非肽组分。其它肽组分的非限制性例子包括间隔残基，例如位于一端或两端的两个或多个甘氨酸（天然或衍生的）残基或氨基己酸接头或有助于

肽试剂溶解的残基,例如酸性残基,如以 SEQ ID NO :83、86 为例描述的天冬氨酸 (Asp 或 D)。例如,在某些实施方式中,将肽试剂合成为多抗原肽 (MAP)。通常直接在 MAP 载体上(例如支链赖氨酸或其它 MAP 载体核心)合成肽试剂的多份拷贝(例如,2-10 份拷贝)。参见,例如 Wu 等,(2001)J Am Chem Soc. 2001123(28):6778-84;Spetzler 等,(1995)Int J Pept Protein Res. 45(1):78-85 和 SEQ ID NO :134 和 135。

[0132] 本文所述肽试剂中包含的非肽组分(例如,化学部分)的非限制性例子包括位于该肽试剂两末端之一或内部的一种或多种可检测标记、标签(例如,生物素、His- 标签、寡核苷酸)、染料、结合对成员等。非肽组分也可直接或通过间隔臂基团(例如酰胺基团)与化合物上通过定量结构-活性数据和/或分子建模预计无干扰的位置相连(例如,通过一个或多个标记共价连接)。本文所述肽试剂也可包含对朊病毒特异的化学部分,例如淀粉状蛋白特异性染料(例如,刚果红、硫磺素等)。化合物的衍生化(例如,标记,环化、与化学部分相连等)不应实质性干扰(甚至可能提高)肽试剂的结合特性、生物学功能和/或药理学活性。

[0133] 这些肽试剂通常与朊病毒片段或本文所述肽序列有至少约 50% 的序列相同性。这些肽试剂优选与朊病毒片段或本文所述肽序列有至少约 70% 的序列相同性。更优选有至少 75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100% 的序列相同性。

[0134] 本文所述肽试剂优先与致病性形式相互作用,因此可用于各种分离、纯化、检测、诊断和治疗应用。例如,在肽试剂优先与致病性形式相互作用的实施方式中,可利用所述肽试剂本身来检测样品,例如血液、神经系统组织(大脑、脊髓、CSF 等)或其它组织或器官样品中的致病性形式。肽试剂也可用于诊断是否存在致病性形式相关疾病、分离致病性形式和通过除去致病性形式来净化样品。

[0135] 可采用任何已知的结合试验,例如免疫测定,如 ELISA、蛋白质印迹等(参见实施例)来检验肽试剂与朊病毒蛋白的相互作用。

[0136] 检验本发明肽试剂的特异性的一种常规方法是选择含致病性和非致病性朊病毒的样品。这种样品通常包括患病动物的大脑或脊髓组织。将能与致病性形式特异性结合的本文所述肽试剂连接于固体支持物(采用本领域熟知和下文描述的方法),利用其分离(“吸下”)致病性朊病毒与其它样品组分并获得固体支持物上肽-朊病毒结合相互作用数目直接相关的定量值。也可采用本领域已知的改进形式和其它试验来证明本发明肽试剂的特异性。参见,例如实施例。

[0137] 虽然利用本文所述肽试剂的本发明方法不要求,但其它朊病毒试验可利用具有致病性构象的朊病毒通常耐受某些蛋白酶,例如蛋白酶 K 这一事实。同一蛋白酶能降解非致病性构象的朊病毒。因此,当利用蛋白酶时,可将样品分为两份等体积。将蛋白酶加入第二份样品并进行相同检验。由于第二份样品中的蛋白酶会降解任何非致病性朊病毒,可将第二份样品中的任何肽-朊病毒结合相互作用归因于致病性朊病毒。

[0138] 因此,评估本文所述肽试剂的结合特异性和/或亲和力的非限制性例子包括标准 Western 和 Far-Western 印迹法;标记肽;ELISA 样试验;和/或细胞试验。例如,Western 印迹通常利用含标签的第一抗体检测“吸下”试验(如本文所述)获得的样品中经 SDS-PAGE 凝胶(电泳)的变性朊病毒蛋白,该蛋白电印迹到硝酸纤维素或 PVDF 膜上。能识别变性朊病毒蛋白的抗体已有描述(描述于 Peretz 等,1997J. Mol. Biol. 273:614;Peretz 等,

2001Nature412:739;Williamson 等,1998J.Virol.72:9413;美国专利号 6,765,088;美国专利号 6,537,548 等),一些可商品化购得。其它朊病毒结合分子已有描述,例如嫁接了基序的杂交多肽(参见 W003/085086)、某些阳离子或阴离子聚合物(参见 W003/073106)、作为“增殖催化剂”的某些肽(参见 W002/0974444)和血纤蛋白溶酶原。然后用标签的探针(例如,链霉亲和素偶联的碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、ECL 试剂和/或可扩增的寡核苷酸)检测(和/或放大)第一抗体。也可用检测试剂,例如含亲和力标签(例如,生物素)的肽评估结合情况,所述肽可用亲和力标签的探针(例如,链霉亲和素偶联的碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、ECL 试剂或可扩增的寡核苷酸)作标记和检测。此外,可采用类似于夹心 ELISA 的微量滴定板方法,例如用本文所述朊病毒特异性肽试剂和其它检测试剂,包括但不限于具有亲和力和/或检测标记的另一种朊病毒特异性肽试剂(如链霉亲和素偶联的碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、ECL 试剂或可扩增的寡核苷酸)将朊病毒蛋白固定在固体支持物上(例如,微量滴定板孔、珠等)。参见实施例。也可采用细胞试验,例如直接检测单个细胞的朊病毒蛋白(如利用能根据荧光分拣细胞、计数或检测特异性标记细胞的荧光标记朊病毒特异性肽试剂)。

[0139] III. B. 肽试剂的产生

[0140] 可采用本领域熟知的任何方法产生本发明肽试剂。

[0141] 在所述肽试剂完全或部分是由遗传编码肽的一实施方式中,可采用本领域熟知的重组技术产生此肽。本领域技术人员采用标准方法和本文的指导不难测定编码所需肽的核苷酸序列。一旦分离,可任选修饰重组肽以包含本文所述和本领域熟知的非遗传编码的组分(例如,可检测标记、结合对成员等),从而产生肽试剂。

[0142] 可根据已知序列设计寡核苷酸探针,用于检测基因组文库或 cDNA 文库。然后可利用标准技术和利用能在全长序列的所需部分截短该基因的(例如)限制性内切酶进一步分离这些序列。类似地,可采用已知技术(例如苯酚抽提)从细胞和含细胞的组织直接分离感兴趣的序列,对序列进行进一步操作产生所需的截短物。用于获得和分离 DNA 的技术说明可参见,例如 Sambrook 等,同上。

[0143] 也可合成产生(例如,根据已知的序列)编码肽的序列。可设计含所需特定氨基酸序列的合适密码子的核苷酸序列。一般从通过标准方法制备并装配成完整编码序列的重叠寡核苷酸来装配完整序列。参见,例如 Edge(1981)Nature292:756;Nambair 等,(1984)Science223:1299;Jay 等,(1984)J. Biol. Chem. 259:6311;Stemmer 等,(1995)Gene164:49-53。

[0144] 不难采用重组技术克隆所述肽试剂所用多肽的编码序列,然后通过合适的碱基对取代进行体外诱变,从而得到所需氨基酸的密码子。这种变化可包括只改变一个碱基对以实现一个氨基酸变化,或可包括几个碱基对变化。或者,可利用能在低于错配双螺旋解链温度的温度下与亲代核苷酸序列(通常是对应于 RNA 序列的 cDNA)杂交的错配引物制作突变。通过使引物的长度和碱基组成维持在较狭窄的限度内并使突变碱基位于中心来制备特异性引物。参见,例如 Innis 等,(1990)PCR Applications:Protocols for Functional Genomics(《PCR 应用:功能基因组学方法》);Zoller 和 Smith, Methods Enzymol. (1983)100:468。利用 DNA 聚合酶、克隆的产物实现引物延伸,选择通过分离引物延伸链衍生的含突变 DNA 的克隆。可利用突变型引物作为杂交探针实现选择。该技术也适用于产生

多点突变。参见,例如 Dalbie-McFarland 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79 :6409。

[0145] 一旦分离和 / 或合成了编码序列,可将它们克隆入任何合适的载体或复制子中进行表达,(也参见实施例)。从本文的指导可以明白,可通过制备表达构建物产生编码修饰多肽的各种载体,所述构建物可以各种组合与其中含有缺失或突变的多肽的编码多核苷酸操作性连接。

[0146] 本领域技术人员已知许多克隆载体,选择合适的克隆载体只是选择问题。用于克隆的重组 DNA 载体及其可转化的宿主细胞的例子包括噬菌体 λ (大肠杆菌 (E. Coli))、pBR322 (大肠杆菌)、pACYC177 (大肠杆菌)、pKT230 (革兰阴性细菌)、pGV1106 (革兰阴性细菌)、pLAFR1 (革兰阴性细菌)、pME290 (非大肠杆菌革兰阴性细菌)、pHV14 (大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 (Bacillus subtilis))、pBD9 (芽孢杆菌 (Bacillus))、pLF61 (链霉菌 (Streptomyces))、pUC6 (链霉菌)、YIp5 (酵母 (Saccharomyces))、YCp19 (酵母) 和牛乳头瘤病毒 (哺乳动物细胞)。通常参见 DNA Cloning (《DNA 克隆》):第 I 和 II 卷,同上; Sambrook 等,同上;B. Perbal,同上。

[0147] 也可利用本领域技术人员已知的昆虫细胞表达系统,例如杆状病毒系统,其描述于例如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin (德克萨斯农业实验站公报),第 1555 号,(1987)。杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统的材料和方法可以是来自 Invitrogen (加利福尼亚,圣迭哥) 等商品化购得的试剂盒形式 (“MaxBac” 试剂盒)。

[0148] 也可利用植物表达系统制备本文所述肽试剂。这种系统通常利用病毒载体以异源基因转染植物细胞。这种系统的说明可参见,例如 Porta 等, Mol. Biotech. (1996) 5 : 209-221 ;Hackland 等, Arch. Virol. (1994) 139 :1-22。

[0149] 发现病毒系统,例如牛痘 (病毒) 感染 / 转染系统 (Tomei 等, J. Virol. (1993) 67 : 4017-4026 和 Selby 等, J. Gen. Virol. (1993) 74 :1103-1113 所述) 也可用于本发明。此系统中,首先在体外用编码噬菌体 T7RNA 聚合酶的牛痘病毒重组体转染细胞。该聚合酶显示有精密的特异性,即它只转录携带 T7 启动子的模板。感染后,用由 T7 启动子驱动的兴趣 DNA 转染细胞。重组牛痘病毒在胞质中表达的聚合酶将转染的 DNA 转录成 RNA,然后利用宿主翻译机制翻译成蛋白质。该方法能高水平、瞬时地在胞质中产生大量 RNA 及其翻译产物。

[0150] 基因可以置于启动子、核糖体结合位点 (对于细菌表达) 和任选的操纵子 (本文统称为“调控”元件) 控制下,从而能在含该表达构建物的载体转化的宿主细胞中将编码所需多肽的 DNA 序列转录成 RNA。编码序列可含有或不含有信号肽或前导序列。对于本发明,可利用天然产生的信号肽或异源序列。通过宿主的翻译后加工可除去前导序列。参见,例如美国专利号 4, 431, 739 ;4, 425, 437 ;4, 338, 397。这种序列包括但不限于 TPA 前导序列以及蜜蜂二甲双胍信号序列。

[0151] 相对于宿主细胞的生长,也可能需要能调节蛋白质序列表达的其它调控序列。本领域技术人员已知这种调控序列,其例子包括对化学或物理刺激 (包括存在调节化合物) 起反应而打开或关闭基因表达的那些序列。载体中也可存在其它类型的调节序列,例如增强子序列。

[0152] 可先连接控制序列和其它调节序列与编码序列,再插入载体。或者,可将编码序列直接克隆入已含有调控序列和合适的限制性位点的表达载体中。

[0153] 在一些情况中,可能需要修饰编码序列使之以合适的取向与调控序列相连;即维

持在正确的读框内。可通过删除蛋白质编码序列的一部分、插入某序列和 / 或取代序列内一个或多个核苷酸来制备突变体或类似物。本领域技术人员熟知修饰核苷酸序列的技术, 例如定点诱变。参见, 例如 Sambrook 等, 同上; DNA Cloning(《DNA 克隆》), 第 I 和 II 卷, 同上; Nucleic Acid Hybridization(《核酸杂交》), 同上。

[0154] 然后用表达载体转化合适的宿主细胞。本领域已知的许多哺乳动物细胞系包括可从美国模式培养物保藏所 (ATCC) 获得的无限增殖细胞系, 例如但不限于中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、猴肾细胞 (COS)、人肝细胞癌细胞 (如 Hep G2)、Vero293 细胞以及其它细胞。类似地, 发现细菌宿主, 例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和链球菌属 (*Streptococcus* spp.) 可用于本发明表达构建物。可用于本发明的酵母宿主包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*)、多形汉森酵母 (*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、季也蒙毕赤酵母 (*Pichia guilliermondii*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 和解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 等。可用于杆状病毒表达载体的昆虫细胞包括埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 和粉蚊夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 等。

[0155] 取决于选择的表达系统和宿主, 在表达感兴趣蛋白质的条件下培养用上述表达载体转化的宿主细胞来产生本发明蛋白。本领域技术人员知道如何选择合适的培养条件。

[0156] 在一个实施方式中, 转化细胞将多肽产物分泌入周围培养基中。载体中可包含某些调节序列来提高蛋白产物的分泌, 例如组织纤维蛋白溶酶原激活剂 (TPA) 前导序列、干扰素 (γ 或 α) 信号序列或已知分泌型蛋白的其它信号肽序列。然后可通过本文所述的各种技术分离分泌的多肽产物, 例如采用标准纯化技术, 例如但不限于羟基磷灰石树脂、柱层析、离子交换层析、分子大小排阻层析、电泳、HPLC、免疫吸附技术、亲和层析、免疫沉淀等。

[0157] 或者, 可采用化学、物理或机械方法破碎转化的细胞, 这些方法能裂解细胞但能维持重组多肽基本完整。也可通过 (例如利用洗涤剂或有机溶剂) 除去细胞壁或细胞膜组分使多肽漏出而获得胞内蛋白。本领域技术人员已知这种方法, 其描述于例如 Protein Purification Applications: A Practical Approach(《蛋白质纯化应用: 实用方法》), (E. L. V. Harris 和 S. Angal 编, 1990)。

[0158] 例如, 本发明用于破碎细胞的方法包括但不限于: 声裂法或超声处理; 搅拌; 液体或固体挤压; 热处理; 冻融法; 干燥法; 爆发性减压; 渗透休克; 用裂解酶处理, 包括蛋白酶, 例如胰蛋白酶、神经氨酸酶和溶菌酶; 碱处理; 和利用洗涤剂 and 溶剂, 例如胆汁盐、十二烷基硫酸钠、Triton、NP40 和 CHAPS。用于破碎细胞的具体技术主要是选择问题, 取决于表达多肽的细胞类型、所用的培养条件和预处理。

[0159] 细胞破碎后, 通常采用离心除去细胞碎片, 采用标准纯化技术, 例如但不限于柱层析、离子交换层析、分子大小排阻层析、电泳、HPLC、免疫吸附技术、亲和层析、免疫沉淀等来进一步纯化胞内产生的多肽。

[0160] 例如, 获得本发明胞内多肽的方法之一包括亲和纯化, 例如利用抗体 (如以前产生的抗体) 的免疫亲和层析或凝集素亲和层析。特别优选的凝集素树脂是能识别甘露糖

部分的树脂,例如但不限于衍生自雪花莲外源凝集素 (*Galanthus nivalis* agglutinin) (GNA)、小扁豆凝集素 (LCA 或小扁豆凝集素)、豌豆凝集素 (PSA 或豌豆凝集素)、*Narcissus pseudonarcissus* agglutinin (NPA) 和 *Allium ursinum* agglutinin (AUA) 的树脂。本领域技术人员知道如何选择合适的亲和树脂。亲和纯化后,可采用本领域熟知的常规技术进一步纯化多肽,例如采用上述任何技术。

[0161] 可采用化学方法常规合成肽试剂,例如采用肽领域技术人员已知的几种技术。这些方法通常采用将一个或多个氨基酸依次加入延伸中的肽链。通常用合适的保护基团保护第一个氨基酸的氨基或羧基。然后将受保护或衍生的氨基酸与惰性固体支持物相连,或在允许形成酰胺键的条件下通过加入序列中互补基团(氨基或羧基)得到适当保护的下一个氨基酸而在溶液中使用。然后除去新加入氨基酸残基的保护基团,再加入下一个氨基酸(适当保护的),依此类推。所需氨基酸以正确顺序连接后,依次或同时除去其余的保护基团(和任何固体支持物,如果采用固相合成技术)得到最终多肽。通过简单改进该通用方法即可一次将多个氨基酸加入延伸的链,例如通过脱保护后偶联(在不产生外消旋手性中心的条件下)受保护的三肽与适当保护的二肽而形成五肽。例如,固相肽合成技术可参见 J. M. Stewart 和 J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (《固相肽合成》) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) 及 G. Barany 和 R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* (《肽:分析、合成、生物学》), E. Gross 和 J. Meienhofer 编,第 2 卷, (Academic Press, 纽约, 1980), 第 3-254 页;经典溶液合成可参见 M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis* (《肽合成原理》), (Springer-Verlag, 柏林, 1984) 及 E. Gross 和 J. Meienhofer 编, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* (《肽:分析、合成、生物学》), 第 1 卷。这些方法用于较小的多肽,即最多长约 50-100 个氨基酸,但也适用于较大的多肽。

[0162] 典型的保护基团包括叔丁氧基羰基 (Boc); 9- 芴甲氧基羰基 (Fmoc); 苄氧基羰基 (Cbz); 对甲苯磺酰基 (Tx); 2,4- 二硝基苄基; 苄基 (BzI); 联苯基异丙氧基羧基-羰基; 叔戊氧基羰基; 异龙脑氧基羰基 (isobornyloxycarbonyl); 邻-溴苄氧基羰基; 环己基; 异丙基; 乙酰基; 邻-硝基苄基磺酰基等。

[0163] 典型的固体支持物是交联的多聚支持物。这些支持物包括二乙烯基苯交联的苯乙烯聚合物,例如二乙烯基苯-羟甲基苯乙烯共聚物、二乙烯基苯-氯甲基苯乙烯共聚物和二乙烯基苯-二苯甲基氨基聚苯乙烯共聚物。

[0164] 可按照例如,美国专利号 5,877,278; 6,033,631; Simon 等, (1992) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89:9367 合成含多聚物的拟肽。

[0165] 也可通过例如同时进行多个肽合成的其它方法来化学制备本发明的肽试剂。参见,例如 Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:5131-5135; 美国专利号 4,631,211。

[0166] IV. 试验

[0167] 本发明人开发了用于检测样品中致病性朊病毒的灵敏试验。该试验联合了肽试剂区分致病性和非致病性朊病毒蛋白的能力与改进的 ELISA 技术。由于肽试剂优先与致病性朊病毒蛋白相互作用,可利用这些试剂分离和浓缩样品中的任何致病性朊病毒。与利用蛋白酶 K 消化常导致致病性同种型有一定程度 N- 末端消化来区分致病性和非致病性同种型

的方法不同,本发明方法利用肽试剂可分离全长致病性朊病毒蛋白。因此,可利用能识别朊病毒蛋白 N-末端表位的抗朊病毒抗体以及能识别朊病毒蛋白其它区域表位的抗朊病毒抗体来检测。

[0168] 一旦利用肽试剂分离了致病性朊病毒蛋白和非致病性同种型(存在于大多数样品中),可使致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离并用本文所述的许多 ELISA 形式检测。致病性朊病毒在与肽试剂解离过程中通常发生变性。ELISA 中优选利用变性的朊病毒蛋白,因为已知许多能与变性 PrP 结合的抗-朊病毒抗体可商品化购得。利用高浓度离液剂,例如 3M-6M 的胍盐,如硫氰酸胍或盐酸胍可实现致病性朊病毒的解离和变性。必须先除去或稀释离液剂,再进行 ELISA,因为离液剂会干扰 ELISA 中抗-朊病毒抗体的结合。这增加了洗涤步骤或产生的样品体积大,两种情况均对快速高通量试验不利。

[0169] 本发明人发现用离液剂使致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离/变性的优选替代方法是利用高或低 pH。通过加入能将 pH 升高至 12 以上的组分(例如,NaOH)或降低至 2 以下的组分(例如, H_3PO_4)不难使致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离和变性。此外,通过加入小体积的合适酸或碱不难将 pH 再调节至中性,从而能直接用于 ELISA 而不要任何额外洗涤且不明显增加样品体积。

[0170] 因此,本发明提供检测样品中是否存在致病性朊病毒的方法,包括:在肽试剂能与致病性朊病毒(如果存在的话)结合的条件下使怀疑含有致病性朊病毒的样品与能优先与致病性形式的朊病毒蛋白结合的肽试剂接触而形成第一复合物;除去未结合的样品物质;使致病性形式与肽试剂解离;和利用朊病毒结合试剂检测存在的解离致病性朊病毒。“朊病毒结合试剂”是能与任何构象的朊病毒蛋白结合的试剂,朊病毒结合试剂通常与变性形式的朊病毒蛋白结合。这种试剂已见描述,包括例如抗朊病毒抗体(描述于 Peretz 等,1997J. Mol. Biol. 273:614;Peretz 等,2001Nature412:739;Williamson 等,1998J. Virol. 72:9413;美国专利号 6,765,088;美国专利号 6,537,548 等)、基序嫁接的杂交多肽(参见 W003/085086)、某些阳离子或阴离子多聚物(参见 W003/073106)、作为“繁殖催化剂”的某些肽(参见 W002/0974444)和血纤蛋白溶酶原。应该明白如果所用的具体朊病毒结合试剂与变性形式的朊病毒结合,则应先使“捕捉”的致病性朊病毒蛋白变性再用朊病毒结合试剂检测。朊病毒结合试剂优选抗朊病毒抗体。

[0171] 某些实施方式用抗-PrP 抗体检测朊病毒蛋白。能与朊病毒,特别是 PrP^C 或变性的 PrP 结合的抗体、修饰的抗体和其它试剂已见描述,一些可商品化购得(参见,例如抗-朊病毒抗体描述于 Peretz 等,1997J. Mol. Biol. 273:614;Peretz 等,2001Nature412:739;Williamson 等,1998J. Virol. 72:9413;美国专利号 6,765,088。一些这种物质和其它物质可商品化购自 InPro Biotechnology, SouthSan Francisco,加利福尼亚,Cayman Chemicals, Ann Arbor MI 等;Prionics AG, Zurich;修饰的抗体也可参见 W003/085086)。该方法所用的合适抗体包括但不限于:3F4、D18、D13、6H4、MAB5242、7D9、BDI115、SAF32、SAF53、SAF83、SAF84、19B10、7VC、12F10、PRI308、34C9、Fab HuM-P、Fab HuM-R1 和 Fab HuM-R72。

[0172] 解离的致病性朊病毒蛋白优选是变性的。术语“变性”或“变性的”具有应用于蛋白质结构的常规意义,表示蛋白质丧失其天然二级和三级结构。对于致病性朊病毒蛋白,“变性”的致病性朊病毒蛋白不再保留天然致病性构象,因此该蛋白不再有“致病性”。变性

的致病性朊病毒蛋白的构象类似于变性的非致病性朊病毒蛋白或与之相同。然而,本文为简明起见,术语“变性的致病性朊病毒蛋白”可用于指作为致病性同种型由肽试剂捕获随后变性的致病性朊病毒蛋白。

[0173] 在优选的实施方式中,在固体支持物上提供肽试剂。可先在固体支持物上提供肽试剂,再与样品接触,或者肽试剂适合与样品接触并与其中任何致病性朊病毒结合后再与固体支持物结合(例如,通过使用生物素化的肽试剂与含有亲和素或链霉亲和素的固体支持物)。

[0174] 因此,本发明还提供检测样品中是否存在致病性朊病毒的方法,包括:

[0175] (a) 提供包含肽试剂的第一固体支持物;

[0176] (b) 在样品中存在的致病性朊病毒蛋白能与肽试剂结合形成第一复合物的条件下使该第一固体支持物与样品接触;

[0177] (c) 除去未结合的样品物质;

[0178] (d) 使致病性朊病毒蛋白与第一复合物解离;和

[0179] (e) 利用朊病毒结合试剂检测解离的致病性朊病毒。

[0180] 肽试剂优选衍生自序列选自 SEQ ID NO:12-260 的肽。

[0181] 本文描述了制备包含肽试剂的固体支持物的本领域常规方法,包括将蛋白质和肽与各种固体表面相连的熟知方法。在样品中的任何致病性朊病毒蛋白能与肽试剂结合的条件下使样品与包含肽试剂的固体支持物接触,从而形成第一复合物。本领域普通技术人员不难确定本文进一步描述的这种结合条件。通常可在微量滴定板的孔中或在小体积的塑料试管中进行该方法,但任何方便的容器都适用。样品通常是液体样品或混悬液,可在(加入)肽试剂之前或之后加入反应容器。一旦产生了第一复合物,可通过分离固体支持物与反应溶液(含有未结合的样品物质),例如通过离心、沉淀、过滤、磁力等除去未结合的样品物质(即,未与肽试剂结合的任何样品组分,包括任何未结合的致病性朊病毒蛋白)。可任选对含第一复合物的固体支持物进行一次或多次洗涤步骤以除去任何残留样品物质,再进行本发明的下一步骤。

[0182] 除去未结合的样品物质以及任何任选的洗涤步骤后,使结合的致病性朊病毒蛋白与第一复合物解离。可以许多方式实现这种解离。在一个实施方式中,加入离液剂,优选胍盐化合物,例如硫氰酸胍或盐酸胍至浓度 3M-6M 之间。加入离液剂导致致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离,亦造成致病性朊病毒蛋白变性。

[0183] 另一实施方式通过将 pH 提升至 12 或更高(“高 pH”)或将 pH 降低至 2 或更低(“低 pH”)来实现解离。第一复合物与高或低 pH 接触导致致病性朊病毒蛋白与肽试剂解离并造成致病性蛋白变性。在此实施方式中,优选使第一复合物与高 pH 接触。pH 在 12.0-13.0 之间通常足够;优选采用 pH 在 12.5-13.0 之间;更优选采用 pH 在 12.7-12.9 之间;最优选采用 pH 为 12.9。或者,可使第一复合物与低 pH 接触来解离致病性朊病毒蛋白与肽试剂。对于该替代方法, pH 在 1.0-2.0 之间足够。第一复合物与高 pH 或低 pH 接触只需短时间,例如 60 分钟,优选不超过 15 分钟,更优选不超过 10 分钟。接触时间过长会导致致病性朊病毒蛋白的结构明显变化,从而破坏检测步骤所用抗朊病毒抗体识别的表位。接触足够时间以解离致病性朊病毒蛋白后,通过加入酸性试剂(如果采用高 pH 解离条件)或碱性试剂(如果采用低 pH 解离条件)不难将 pH 调节至中性(即 pH 在约 7.0-7.5 之间)。本领域普

通技术人员不难确定合适的方案,本文描述了实施例。

[0184] 为实现高 pH 解离条件,通常加入 NaOH 至约 0.05N- 约 0.2N 浓度足够。优选加入 NaOH 至浓度在 0.05N-0.15N 之间;更优选使用 0.1N 的 NaOH。一旦致病性朊病毒与肽试剂解离,可加入合适量的酸溶液,例如磷酸、磷酸二氢钠将 pH 调节至中性(即,约 7.0-7.5 之间)。

[0185] 为实现低 pH 解离条件,通常加入 H_3PO_4 至约 0.2M- 约 0.7M 的浓度足够。优选加入 H_3PO_4 至浓度在 0.3M-0.6M 之间;更优选使用 0.5M 的 H_3PO_4 。一旦致病性朊病毒与肽试剂解离,可加入合适量的碱溶液,例如 NaOH 或 KOH 将 pH 调节至中性(即,约 7.0-7.5 之间)。

[0186] 然后分离解离的致病性朊病毒蛋白与含有肽试剂的固体支持物。“分离的”表示解离的朊病毒与固体支持物(含结合的肽试剂)不一起存在于同一容器中。可以相似方式实现这种分离以除去上述未结合的物质。

[0187] 可利用朊病毒结合试剂检测解离的致病性朊病毒蛋白。本文它处描述了已知的许多这种试剂。用于检测解离的致病性朊病毒蛋白的优选朊病毒结合试剂是抗朊病毒抗体。许多抗朊病毒抗体已有描述,许多可商品化购得,例如 FabD18(Peretz 等,(2001)Nature412:739-743)、3F4(购自 Sigma Chemical St LouisMO;也参见美国专利号 4,806,627)、SAF-32(Cayman Chemical,Ann Arbor MI)、6H4(Prionic AG,瑞士;也参见美国专利号 6,765,088)。可用 ELISA 型试验,例如直接 ELISA 或抗体夹心 ELISA 型试验检测解离的致病性朊病毒蛋白,下文更全面地描述了这些试验。虽然用术语“ELISA”描述用抗-朊病毒抗体进行的检测,但所述试验不限于其中的抗体是“酶联”的试验。可用本文所述和免疫测定领域熟知的任何可检测标记标记检测抗体。

[0188] 在该方法的一实施方式中,解离的致病性朊病毒蛋白被动包被在第二固体支持物表面上。熟知这种被动包被的方法,通常在 37°C 用 pH8 的 100mMNaHCO₃ 包被数小时或在 4°C 包被过夜。熟知其它包被缓冲液(例如,50mM 碳酸盐 pH9.6;10mM Tris pH8,或 10mM PBS pH7.2)。第二固体支持物可以是本文所述或本领域熟知的任何固体支持物;第二固体支持物优选微量滴定板,例如 96-孔聚苯乙烯板。当用高浓度离液剂解离时,先将离液剂的浓度稀释约 2 倍,再包被到第二固体支持物上。当采用高或低 pH 解离时,中和后,可用解离的致病性朊病毒蛋白包被而无需进一步稀释。

[0189] 一旦解离的致病性朊病毒蛋白包被于第二固体支持物上,洗涤该支持物以除去未于该固体支持物附着的任何组分。在抗体能与包被于该第二固体支持物上的朊病毒蛋白结合的条件下加入抗-朊病毒抗体。如果先使解离的致病性朊病毒蛋白变性再包被到第二固体支持物上,所用的抗体应是能与变性形式的朊病毒蛋白结合的抗体。这种抗体包括熟知的抗体(例如上述的)以及通过熟知方法,例如用 rPrP、PrPC 或其片段在小鼠、家兔、大鼠等中引发免疫反应而产生的抗体。(参见,美国专利号 4,806,627;6,165,784;6,528,269;6,379,905;6,261,790;6,765,088;5,846,533;EP891552B1 和 EP909388B1)。特别优选能识别朊病毒蛋白 N-末端表位的抗-朊病毒抗体,例如能识别残基 23-90 区域内表位的抗体。

[0190] 因此,在一实施方式中,本发明提供检测样品中致病性朊病毒是否存在的方法,包括:

[0191] (a) 提供包含肽试剂的第一固体支持物;

[0192] (b) 在致病性朊病毒蛋白（样品中存在的话）能与肽试剂结合的条件下使第一固体支持物与样品接触形成第一复合物；

[0193] (c) 除去未结合的样品物质；

[0194] (d) 使致病性朊病毒蛋白与第一复合物解离；

[0195] (e) 分离解离的致病性朊病毒蛋白与第一固体支持物；

[0196] (f) 在解离的朊病毒蛋白能与第二固体支持物附着的条件下使解离的朊病毒蛋白与第二固体支持物接触；和

[0197] (g) 用试剂检测附着在第二固体支持物上的致病性朊病毒。肽试剂优选衍生自具有选自 SEQ ID NO:12-260 所示序列的肽。

[0198] 在该实施方式中，第一固体支持物优选磁珠；第二固体支持物优选微量滴定板；朊病毒结合试剂优选抗-朊病毒抗体，特别是 3F4、6H4、SAF32。可检测地标记朊病毒结合试剂。

[0199] 在本发明另一实施方式中，采用抗体夹心型 ELISA 检测解离的致病性朊病毒蛋白。在此实施方式中，在包含抗-朊病毒第一抗体的第二固体支持物上“重捕获”解离的朊病毒蛋白。任选洗涤含重捕获朊病毒蛋白的第二固体支持物以除去任何未结合的物质，然后在抗-朊病毒第二抗体能与重捕获朊病毒蛋白结合的条件下与抗-朊病毒第二抗体接触。抗-朊病毒第一和第二抗体通常是不同的抗体，优选能识别朊病毒蛋白上的不同表位。例如，抗-朊病毒第一抗体能识别朊病毒蛋白 N-末端的表位，抗-朊病毒第二抗体能识别除 N-末端以外的表位，或反之亦然。第一抗体可以是，例如能识别八重复区（octarepeat region）（残基 23-90）中表位的 SAF32，第二抗体可以是能识别位于残基 109-112 处表位的 3F4；或者，第一抗体可以是 3F4 而第二抗体可以是 SAF32。不难选择第一和第二抗体的其它组合。在此实施方式中，可检测地标记抗-朊病毒第二抗体，但不是抗-朊病毒第一抗体。当利用促溶剂解离致病性朊病毒蛋白与肽试剂时，必须先除去促溶剂或至少稀释 15 倍，再进行检测试验。当采用高或低 pH 解离和中和时，可使用解离的朊病毒而无需进一步稀释。当解离的致病性朊病毒先变性再进行检测时，第一和第二抗体均与变性的朊病毒蛋白结合。因此，本发明提供检测样品中致病性朊病毒是否存在的方法，包括

[0200] (a) 提供包含肽试剂的第一固体支持物；

[0201] (b) 在致病性朊病毒蛋白（样品中存在的话）能与肽试剂结合的条件下使第一固体支持物与样品接触形成第一复合物；

[0202] (c) 除去未结合的样品物质；

[0203] (d) 使致病性朊病毒蛋白与第一复合物解离，藉此使致病性朊病毒蛋白变性；

[0204] (e) 分离解离变性的致病性朊病毒蛋白与该第一固体支持物；

[0205] (f) 在解离的朊病毒蛋白能与抗-朊病毒第一抗体结合的条件下使解离变性的致病性朊病毒蛋白与第二固体支持物接触；和

[0206] (g) 利用抗-朊病毒第二抗体检测结合在第二固体支持物上的朊病毒蛋白。肽试剂优选衍生自具有选自 SEQ ID NO:12-260 所示序列的肽。

[0207] 在一个实施方式中，第一固体支持物优选磁珠；第二固体支持物优选微量滴定板或磁珠；抗-朊病毒第一和第二抗体优选不同的抗体；第一和第二抗体能与变性的朊病毒蛋白结合；优选抗-朊病毒第一或第二抗体中至少一种能识别位于朊病毒蛋白 N-末端区域

的表位。

[0208] 为用于本发明方法,样品可以是已知或怀疑含有致病性朊病毒蛋白的任何物质。样品可以是生物学样品(即,从活的或曾经活的生物制备样品)或非生物学样品。合适的生物学样品包括但不限于:器官、全血、血液成分、血液组分、血浆、血小板、血清、脑脊液(CSF)、脑组织、神经系统组织、肌肉组织、骨髓、尿、眼泪、非神经系统组织、器官和/或活检或尸检样品。优选的生物学样品包括血液、血液成分或血液组分、血浆、血小板和血清。

[0209] 在肽试剂能与致病性朊病毒蛋白(如果样品中存在的话)结合的条件下使样品与一种或多种本发明肽试剂接触。根据本文内容,本领域普通技术人员完全能确定这些具体条件。通常,在合适温度(例如,约4℃)下用约中性pH的合适缓冲液(例如,pH7.5的TBS缓冲液)一起培育样品和肽试剂合适的时间(例如,约1小时到过夜)使之结合。

[0210] 上述捕捉和检测步骤可以在溶液中进行,或者可在固体支持物上或以固相和液相的某种组合进行。本文描述了合适的固相试验方式。对于固相方式,捕捉试剂(可以是一种或多种本发明肽试剂,或一种或多种朊病毒结合试剂)一般与固体支持物相连,或适合与固体支持物相连。捕捉试剂可适合于通过本领域已知的任何方法与固体支持物相连,例如捕捉试剂和固体支持物可以各自含有结合对的一个成员,当捕捉试剂与固体支持物接触时,捕捉试剂可通过该结合对成员间的结合而与固体支持物相连。例如,捕捉试剂可以包含生物素,固体支持物可包含亲和素或链霉亲和素。除生物素-亲和素和生物素-链霉亲和素以外,该实施方式的其它合适的结合对包括:例如抗原-抗体、半抗原-抗体、模拟表位(mimotope)-抗体、受体-激素、受体-配体、激动剂-拮抗剂、凝集素-碳水化合物、A蛋白-抗体Fc。这种结合对是熟知的(参见,例如,美国专利号6,551,843和6,586,193),本领域普通技术人员完全能选择合适的结合对并使其适用于本发明。当捕捉试剂适合与上述支持物相连时,可使样品在捕捉试剂与支持物相连之前或之后与捕捉试剂接触。或者,可采用本领域熟知的偶联化学方法使肽试剂和抗-朊病毒抗体与固体支持物共价相连。采用本领域已知的标准方法将含巯基的肽试剂直接与固体支持物,例如磁珠相连(参见,例如Chrissey, L. A., Lee, G. U. 和O' Ferrall, CE., (1996), Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films(合成DNA与自身装配的单层膜共价连接), Nucleic Acids Research, 24(15), 3031-3039; Kitagawa, T., Shimozono, T., Aikawa, T., Yoshida, T. 和 Nishimura, H., (1980), Preparation and characterization of hetero-bifunctional cross-linking reagents for protein modifications(制备和特征鉴定用于蛋白质修饰的异双功能交联剂), Chem. Pharm. Bull., 29(4), 1130-1135)。首先采用碳二亚胺化学方法将羧酸化磁珠与含马来酰亚胺官能团的异双功能交联剂(购自Pierce Biotechnology Inc. 的BMPH)偶联。然后将巯基化的肽或拟肽与BMPH包被珠的马来酰亚胺官能团共价偶联。

[0211] 本文和以下共有专利申请描述了本发明方法所用的肽试剂:2004年8月13日提交的美国系列号10/917,646;2005年2月11日提交的美国系列号11/056,950;2004年8月13日提交的PCT申请号PCT/US2004/026363。肽试剂可衍生自朊病毒蛋白的肽片段。肽试剂优选衍生自具有SEQ ID NO:12-260所示序列的肽,即该肽试剂衍生自具有以下SEQ ID NO所示序列的肽:12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、

58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259 或 260。该方法所用的肽试剂更优选衍生自具有 SEQ ID NO :66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、129、130、131、132、134 或 135 之一所示序列的肽 ;或衍生自 SEQ ID NO :14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128 或 133 所示的肽 ;或衍生自 SEQ ID NO :56、57、65、82、84 或 136 所示的肽 ;肽试剂最优选衍生自具有 SEQ ID NO :68、50 或 14 所示序列的肽。可生物素化肽试剂。可将肽试剂与固体支持物相连。在一些实施方式中,可检测地标记肽试剂。

[0212] 通常利用本文所述肽试剂与样品中的朊病毒蛋白结合(例如,作为捕捉物质)和/或检测是否存在朊病毒蛋白(例如,作为检测物质)。捕捉试剂和检测试剂可以是不同的分子,或者一种分子可同时拥有捕捉和检测功能。在某些实施方式中,捕捉和/或检测试剂是能优先与致病性朊病毒相互作用(即,对致病性朊病毒特异)的本文所述肽试剂。在其它实施方式中,捕捉试剂对致病性朊病毒特异,而检测试剂能与致病性和非致病性形式结合,例如能与朊病毒蛋白结合的抗体。上文描述了这种朊病毒结合试剂。或者,在其它实施方式中,捕捉试剂对致病性朊病毒无特异性,而检测试剂对致病性朊病毒特异。

[0213] 然后可采用任何合适的检测方法来鉴定本文所述肽试剂与朊病毒蛋白间的结合。例如,本文所述的试验可包括利用标记的肽试剂或抗体。适用于本发明的可检测标记包括能检测的任何分子,包括但不限于:放射性同位素、荧光剂、化学发光剂、生色团、荧光半导体纳米晶体(nanocrystal)、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑试剂、生色团、染料、金属离子、金属液胶、配体(例如,生物素或半抗原)等。其它标记物包括但不限于利用荧光的那些标记物,包括能发出可检测范围荧光的那些物质或其各部分。本发明可用的标记物具体例子包括但不限于:碱性磷酸酶(AP)、辣根过氧化物酶(HRP)、荧光素、FITC、罗丹明、丹酰、伞形酮、二甲基吡啶酯(DMAE)、德克萨斯红、鲁米诺、NADPH 和 β -半乳糖苷酶。此外,可检测标记物可包括寡核苷酸标签,该标签可通过任何已知的核酸检测方法,包括 PCR、TMA、b-DNA、NASBA 等检测。

[0214] 可在溶液中(例如,液体培养基)或固体支持物上进行本文所述试验的一个或多个步骤。为本发明的目的,固体支持物可以是任何物质(即不可溶基质),具有感兴趣分子(例如,本文肽试剂、朊病毒蛋白、抗体等)能连接或附着的刚性或半刚性表面。示范性固体支持物包括但不限于:基质,例如硝酸纤维素、聚氯乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、乳胶、聚碳酸酯、尼龙、葡聚糖、几丁质、沙子、二氧化硅、浮石粉、琼脂糖、纤维素、玻璃、金属、聚丙

烯酰胺、硅、橡胶、多糖、聚氟乙烯、重氮化纸；活化珠、磁性反应珠和常规用于固相合成、亲和分离、纯化、杂交反应、免疫测定和其它这类应用的任何物质。支持物可以是颗粒或者可以采取连续表面形式，包括膜、筛网、平板、小球、载玻片、圆碟、毛细管、中空纤维、针头、大头针、芯片、固体纤维、凝胶（例如硅胶）和珠，例如，多孔玻璃珠、硅胶、任选与二乙烯基苯交联的聚苯乙烯珠、接枝共聚珠、聚丙烯酰胺珠、乳胶珠、任选与 N-N' -二-丙烯酰基乙二胺交联的二甲基丙烯酰胺珠、氧化铁磁珠和用疏水性聚合物包被的玻璃颗粒。特别优选的固体支持物是聚苯乙烯微量滴定板和 / 或聚苯乙烯磁性颗粒，例如 Dynabeads M-270 (DynaBiotek)。

[0215] 采用标准技术不难偶联本文所述肽试剂与固体支持物。先偶联肽试剂与蛋白（例如，当蛋白质具有更好的固相结合特性时）可促进其在支持物上固定。合适的偶联蛋白包括但不限于大分子，例如血清白蛋白，包括牛血清白蛋白 (BSA)、匙孔血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白和本领域技术人员熟知的其它蛋白。可用于结合分子与支持物的其它物质包括多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、多聚氨基酸、氨基酸共聚物等。本领域普通技术人员熟知这类分子和偶联这些分子与蛋白的方法。参见，例如 Brinkley, M. A., (1992) *Bioconjugate Chem.*, 3:2-13; Hashida 等, (1984) *J. Appl. Biochem.*, 6:56-63; Anjaneyulu 和 Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30:117-124。

[0216] 如果需要，不难功能化要加入固体支持物的分子以产生苯乙烯或丙烯酸部分，从而能将分子掺入聚苯乙烯、聚丙烯酸酯或其它聚合物中，例如聚酰亚胺、聚丙烯酰胺、聚乙烯 (polyethylene)、聚乙烯 (polyvinyl)、聚二乙炔、聚亚苯基亚乙烯基 (polyphenylene-vinylene)、多肽、多糖、聚砜、聚吡咯、聚咪唑、聚噻吩、聚醚、环氧化物、石英玻璃、硅胶、硅氧烷、多磷酸盐、水凝胶、琼脂糖、纤维素等。

[0217] 肽试剂可以通过结合对分子间的相互作用连接于固体支持物。这种结合对是熟知的，本文它处描述了例子。通过上述技术将结合对物的一个成员偶联于固体支持物，结合对物的另一成员与肽试剂相连（合成之前、期间或之后）。如此修饰的肽试剂与样品接触后，可与溶液中的致病性朊病毒（如果存在的话）相互作用，然后使固体支持物与肽试剂（或肽-朊病毒复合物）接触。对于该实施方式，优选的结合对包括生物素和亲和素及生物素和链霉亲和素。

[0218] 本发明试验也可用合适的对照。例如，这些试验中可用 PrP^C 的阴性对照。这些试验也可用 PrP^{Sc}（或 PrPres）的阳性对照。下述替代对照也可用于本发明。

[0219] 为进行上述检测试验，可用试剂盒提供上述试验试剂（包括本文所述肽试剂），试剂盒中装有合适的使用说明书和其它必需的试剂。在肽试剂偶联于固体支持物时，所述试剂盒还可装有偶联于一种或多种固体支持物上的这种肽试剂。试剂盒还可装有一种或多种抗-朊病毒抗体。可检测地标记或者可在固体支持物上提供这种抗-朊病毒抗体。所述试剂盒还可装有上述合适的阳性和阴性对照。根据所用的具体检测试验，所述试剂盒也可装有合适的标记物和其它包装的试剂和材料（即，洗涤缓冲液、培育缓冲液）。

[0220] V. 替代对照

[0221] 本文所述的替代对照分子可用于朊病毒检测试验。也提供了包含替代对照的组合物和利用这些替代对照的方法。虽然以前描述了用于免疫测定的人工对照（参见，例如美国专利号 5,846,738 ;5,491,218 ;6,015,662 ;6,281,004 和国际专利公布号 W099/33965），

但这些分子不适用于朊病毒试验。不能用作对照。

[0222] 在某些方面,替代对照能和优先与病原性朊病毒蛋白相互作用的肽试剂相结合。因此,在这些方面,本发明(替代对照物及其用法)部分依赖于以下申请:2004年8月13日提交的美国系列号 10/917,646;2005年2月11日提交的美国系列号 11/056,950;2004年8月13日提交的 PCT 申请号 PCT/US2004/026363 所述的发现,即朊病毒蛋白的较小片段能优先与朊病毒的致病性形式相互作用。显示能与致病性朊病毒同种型优先相互作用的这些片段无需是较大蛋白质结构或其它类型的支架分子的一部分。虽然不想遵循任何具体理论,看来这些肽片段自发采取的构象可能是模拟了非致病性同种型的构象而能与致病性朊病毒同种型而不与非致病性朊病毒同种型结合。不难将构象疾病蛋白的某些片段能优先与该构象疾病蛋白(本文为朊病毒)的致病性形式相互作用的这种通用原理应用于其它构象疾病蛋白来产生能优先与致病性形式相互作用的肽试剂。本领域普通技术人员应知道,虽然这些片段提供了起始点(例如,就大小或序列特征而言),但可对这些片段作出许多修饰来产生具有更理想属性(例如,亲和力较高、稳定性较高、溶解性较高、蛋白酶敏感性较低、特异性较高、易于合成等)的肽试剂。

[0223] 因此,本文所述替代对照能与朊病毒结合试剂结合,包括 2004 年 8 月 13 日提交的国际申请号 PCT/US2004/026363 所述肽试剂以及这些肽试剂的抗体(或其片段)和/或其它朊病毒抗体。因此,对于朊病毒试验,这些替代对照提供了简单而有效的无感染性阳性对照和/或用作质量控制,可用于确认实际上任何生物学或非生物样品中(包括活的或死的大脑、脊髓或其它神经系统组织以及血液)朊病毒相关疾病的诊断结果。

[0224] 此外,可利用任何合适的信号放大系统来进一步检测试验中的替代对照,包括但不限于:利用多个识别位点、支链 DNA 来放大信号(参见,例如美国专利号 5,681,697;5,424,413;5,451,503;5,4547,025;和 6,235,483);应用靶扩增技术,例如 PCR、滚环扩增、Third Wave 的侵入物(Arruda 等,2002Expert. Rev. Mol. Diagn. 2:487;美国专利号 6090606、5843669、5985557、6090543、5846717)、NASBA、TMA 等(美国专利号 6,511,809;EP0544212A1);和/或免疫-PCR 技术(参见,例如美国专利号 5,665,539;国际公布 W098/23962;W000/75663 和 W001/31056)。

[0225] 本文所述的无感染性分子可用作朊病毒检测试验,特别是检测样品中致病性朊病毒试验的替代对照。本文所述的替代对照可用作阳性对照来确认朊病毒检测/分离方法的精确性和/或作为质量控制以确保试验试剂和方法符合合格试验标准。

[0226] 所述替代对照最有用的试验通常用朊病毒结合试剂来“捕捉”待检测的朊病毒,所述朊病毒结合试剂可以是能优先与致病性朊病毒蛋白相互作用的肽试剂。“捕捉”表示利用肽试剂来固定或局限朊病毒。朊病毒结合试剂和“捕捉”的朊病毒蛋白通常形成的复合物可由本文进一步描述的方法检测。常用检测试剂来检测该复合物。检测试剂通常是朊病毒结合试剂,一般经可检测标记(或可标记的,例如以第一检测抗体和标记的第二抗体为例)。

[0227] 本发明的替代对照包含能与朊病毒试验的朊病毒结合物质结合的第一结构域。例如,在一方面,该第一结构域能结合优先与 PrP^{Sc} 相互作用的肽试剂。替代对照也可包含一种或多种可检测标记物,从而能方便地检测替代对照与朊病毒结合试剂(例如,肽试剂)的结合。

[0228] 在一方面,替代对照具有双功能(或者,在一些情况中具有三功能),即它们包含

试剂第一结构域和第二结构域,该第二结构域包含能与朊病毒试验中检测试剂结合的分子。例如,如果检测试剂包含抗体,则第二结构域可包含该抗体可识别的表位(或模拟表位)。或者,该第二结构域和检测试剂各自可包含结合对分子(例如,生物素和链霉亲和素等)的一个成员。因此,第一和第二结构域通常是彼此不同的分子,但在一些情况中可以是相同的分子。

[0229] 双功能替代物的第二结构域可直接结合可检测标记的检测试剂。或者,第二结构域可识别检测系统的某组分。例如,在某些免疫测定中(例如,ELISA),通过与第一抗体结合来检测分析物(例如,朊病毒或替代对照),该第一抗体进而与可检测标记的第二抗体结合。因此,在某些实施方式中,第二结构域可识别双抗体检测试剂系统中的第一抗体。

[0230] 本发明的双功能(或三功能)替代对照可以是一种分子(例如,包含两个结构域的融合或嵌合蛋白质)或分别合成然后彼此共价或非共价相连的两种(或多种)分子。这些分子可以本领域已知的任何方式相连,只要能保留这些结构域的结合功能。含有两个结构域的双功能替代对照在所述两个结构域之间也可包含一个或多个接头。

[0231] 本文所述的双功能替代对照优选用于朊病毒检测试验,所述试验利用能优先与PrP^{Sc}相互作用的一种或多种肽试剂作为朊病毒结合试剂。许多抗-PrP抗体及其所识别的PrP表位是已知的,例如表A所示。

[0232] 表A:PrP抗体和表位

[0233]

抗体	表位 / 免疫原肽	材料来源	参考文献
3F4	PrP 氨基酸 109-112 人-MKHM(SEQ ID NO :261)	Chemicon Sigma	Prusiner, S. B., Science252,1515 (1991)
D18	仓鼠朊病毒蛋白的 133-157 AMSRPMMHFGNDWEDRYRENMR Y(SEQ ID NO :262)	InPro	Peretz 等, J. Mol. Biol., 273 :614-622
D13	仓鼠朊病毒蛋白的 96-106 HNQWNKPSKPK(SEQ ID NO :263)	InPro	1)Peretz 等, J. Mol. Biol., 273 :614-622, 1997. 2)Peretz 等, Nature, 412 :739-743, 2001. 3)Bosque 等, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 99 : 3812-3817, 2002. 4)Leclerc 等, J. Mol. Biol., 326 :475-483, 2003.
6H4	鼠科 PrP143-151 DWEDRYRE(SEQ ID NO :264)	Prionics	Prionics, Liu 等, J. Histochemistry& Cytochemistry51(8) 1065-1071, 2003

[0234]

MAB5424	免疫原 : 重组 PrP 氨基酸 23-237	Chem icon	
7D9	免疫原 : 重组小鼠 PrP (氨基酸 23-237)	Biodesign International	Kascsak, 等, (1987) J. Virol., 61 : 3688-3693.
BDI115	PrP 肽 (牛朊病毒蛋白的氨基酸 146-159) NDYEDRYRENMR (SEQ ID NO :269)	Biodesign International	Biodesign International
SAF32	N- 末端八 - 重复区域	SPI Bio	SPI Bio
SAF53	PrP 氨基酸 142-160 (人编号). GSDYEDRYRENMRYPNQ (SEQ ID NO :270)	SPI Bio	SPI Bio
SAF83	已知的不连续表位	SPI Bio	SPI Bio
SAF84	PrP 氨基酸 160-170 (人编号). QVYYRPMDEYS (SEQ ID NO :271)	SPI Bio	SPI Bio
19B10	NtmPrP 的构象特异性		W02004033628A2
7VC	CtmPrP 依赖于铜的特异性		W02004033628A2
12F10	人 142-160 GSDYEDRYRENMRYPNQ (SEQ ID NO :270)	SPI Bio	SPI Bio
PRI308	PrP 氨基酸 106-126 (人编号) KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG (SEQ ID NO :272)	SPI Bio	SPI Bio
34C9	牛 138-142 LIHFG (SEQ ID NO :273)	Prionics	Prionics
Fab HuM-P	仓鼠朊病毒蛋白的 96-105 HNQWNKPSKP (SEQ ID NO :263)	InPro	1) Bosque 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 99 : 3812-3817, 2002. 2) Safar 等, Nature Biotech., 20 : 1147-50, 2002.
Fab HuM-R1	金黄仓鼠朊病毒蛋白的 226-231 YYDGRRS (SEQ ID NO :274)	InPro	1) Peretz 等, Nature, 412 :739-743, 2001 2) Peretz 等, J. Mol. Biol., 273 :614-622, 1997. 3) Williamson 等, J. Virol., 72 :9413-9418 4) Matsunaga 等, Proteins, 44 :

[0235]

			110-118,2001 5)Leclerc 等, J. Mol. Biol., 326 :475-483, 2003
Fab HuM-R72	仓鼠朊病毒蛋白的 152-163 ENMNRYPNQVYY (SEQ ID NO :275)	InPro	1)Williamson 等, J. Virol., 72 : 9413-9418, 1998. 2)Peretz 等, J. Mol. Biol., 273 :614-622, 1997. 3)Matsunaga 等, Proteins, 44 : 110-118, 2001.
小鼠抗 - 朊 病毒蛋白	识别绵羊、牛、黑尾鹿、麋鹿和白尾鹿 组织中反刍类动物朊病毒蛋白上的保守 表位 (QYQRES) (SEQ ID NO :276)。	VMRD, Inc.	Spraker 等, J. Vet. Diagn. Invest. 14(1) :3-7 (2002)

[0236] 除了以上列出的抗体和表位,用本文所述肽试剂产生的抗体,这些抗体的片段,这些抗体的表位或模拟表位也可用于本发明替代对照中。

[0237] 如上所述,根据该试验所用的朊病毒结合试剂和检测试剂选择替代对照的第一和第二结构域。表 B、C 和 D 提供了示范性替代对照的非限制性例子。具体地说,表 B 显示了当该试验的朊病毒结合试剂是本文所述肽试剂和第一结构域能识别该肽试剂时的示范性替代对照。

[0238] 表 B :肽试剂免疫测定所用的双功能替代对照

[0239]

肽试剂	替代对照的第一结构域	替代对照的第二结构域	检测试剂
PrP 吸下肽	能识别 PrPSC 吸下肽的抗体、适体、蛋白质等	试验的第一抗体的表位肽或模拟表位	识别 PrP 的抗体
QWNKPSKPKTN (SEQ ID NO :14)	D13	D18 表位肽 AMSRPMMHFGND WEDRYRENMNR (SEQ ID NO :262)	D18
QWNKPSKPKTN (SEQ ID NO :14)	D13	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4
QWNKPSKPKTNMKHMGGG (SEQ ID NO :198)	3F4	D18 表位肽 AMSRPMMHFGND WEDRYRENMNR (SEQ ID NO :262)	D18
QWNKPSKPKTNMKHMGGG (SEQ ID NO :198)	3F4	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4

[0240] 表 C 显示了当该试验的朊病毒结合试剂包含本文所述肽试剂和第一结构域识别该肽的辅助基序时的示范性替代对照。该辅助基序可以是,例如可检测标记物、结合对的一个成员(例如,生物素、His-6)、不依赖于 PrP 吸下肽序列而可被识别的肽。替代物的第一结构域包含能识别该肽试剂的辅助基序的分子,例如抗体(或其片段)、适体、蛋白质等。

[0241] 表 C :肽试剂 - 辅助基序免疫测定所用的双功能替代对照

[0242]

肽试剂	辅助基序	第一替代结构域	第二替代结构域	检测试剂
PrP 吸下肽	不依赖于 PrP 吸下肽序列而可识别的生物素、His-6、肽等	能识别吸下肽上辅助基序的抗体、适体、蛋白质等	试验的第一抗体的表位肽或模拟表位	识别 PrP 的抗体
QWNKPSKPKTN (SEQ ID NO :14)	生物素	抗 - 生物素	D18 表位肽 AMSRPMMHFGNDWE DRYYRENMNRY (SEQ ID NO :262)	D18
QWNKPSKPKTN (SEQ ID NO :14)	生物素	抗 - 生物素	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4
GGGKKRPKPGG (SEQ ID NO :68)	生物素	抗 - 生物素	D18 表位肽 AMSRPMMHFGNDWE DRYYRENMNRY (SEQ ID NO :262)	D18
GGGKKRPKPGG (SEQ ID NO :68)	生物素	抗 - 生物素	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4
QWNKPSKPKTN (SEQ ID NO :14)	生物素	链霉亲和素	D18 表位肽 AMSRPMMHFGNDWE DRYYRENMNRY (SEQ ID NO :262)	D18
QWNKPSKPKTN (SEQ ID NO :14)	生物素	链霉亲和素	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4
GGGKKRPKPGG (SEQ ID NO :68)	生物素	链霉亲和素	D18 表位肽 AMSRPMMHFGNDWE DRYYRENMNRY (SEQ ID NO :262)	D18
GGGKKRPKPGG (SEQ ID NO :68)	生物素	链霉亲和素	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4

[0243] 表 D 描述了其第一结构域包含该试验中用作朊病毒结合试剂的抗体所识别表位的示范性替代对照。进而第二替代结构域包含该检测试剂（识别 PrP 的抗体）所识别的表位。

[0244] 表 D：朊病毒免疫测定所用的双功能替代对照

[0245]

朊病毒结合试剂	第一替代结构域	第二替代结构域	检测试剂
PrP- 抗体	朊病毒结合抗体的表位肽	第一抗体的表位肽	PrP- 抗体
3F4	3F4 表位肽 MKHM (SEQ ID NO :261)	D18 表位肽 AMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRY (SEQ ID NO :262)	D18
D13	D13 表位肽 HNQWNKPSKPK (SEQ ID NO :263)	D18 表位肽 AMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRY (SEQ ID NO :262)	D18
3F4	3F4 表位肽 MKHM (SEQ ID NO :261)	6H4 表位肽 DWEDRYRE (SEQ ID NO :264)	6H4

[0246] 在本文所述的任一替代对照中，一个或多个结构域可包含多个识别位点。当检测方法采用双抗体夹心型 ELISA 时，替代对照可包含能与“重捕获”抗体结合的第三结构域。例如，如果用 SAF32 抗体来重捕获解离的致病性朊病毒蛋白，而 3F4 抗体用作检测抗体，除能与“吸下”步骤所用的肽试剂结合的结构域外，替代对照还可包含 SAF32 和 3F4 抗体识别的表位。

[0247] VI. 其它应用

[0248] A. 检测

[0249] 如上所述，可用本文所述检测致病性朊病毒蛋白的方法来诊断对象的朊病毒疾病。此外，也可用上述方法检测血液和 / 或食物供应中的致病性朊病毒污染。因此，可用本文所述检测方法筛选各收集样品或合并样品的等份试样来制备基本上不含致病性朊病毒的血液供应品。可在合并前除去污染了致病性朊病毒的样品或要合并样品。以此方法可提供基本上不含致病性朊病毒污染的血液供应品。“基本上不含致病性朊病毒”表示采用本文所述任何试验未检测到有致病性朊病毒存在。重要的是，已显示能检测用正常组织稀释 10^6 倍的脑组织中致病性蛋白形式的本文所述肽试剂是唯一经证实能检测血液中致病性朊病毒的试剂。

[0250] 因此，本发明提供制备基本上不含致病性朊病毒的血液供应品的方法，所述血液供应品包括全血、红细胞、血浆、血小板或血清，所述方法包括：(a) 用本文提供的任何检测方法筛选收集血液样品的全血、红细胞、血浆、血小板或血清的等份试样；和 (b) 只合并未检测到致病性朊病毒的样品以提供基本上不含致病性朊病毒的血液供应品。

[0251] 类似地，可筛选食物供应品中是否存在致病性朊病毒来提供基本上不含致病性朊病毒的食物。因此，可采用本文所述任何方法筛选用作人或动物消耗食物的活动物样品中是否存在致病性朊病毒。也可筛选取自要进入食物供应的食物产品的样品。鉴定或检测样品中是否有致病性朊病毒，除去欲进入食物供应的其样品检测出致病性朊病毒的活动物或食物。以此方式可提供基本上不含致病性朊病毒的食物供应品。

[0252] 因此,本发明提供制备基本上不含致病性朊病毒的食物供应品的方法,所述方法包括:(a)用本文提供的检测致病性朊病毒的任何方法筛选从要进入食物供应的活动物收集的样品或从要进入食物供应的食物收集的样品;和(b)只合并未检测到致病性朊病毒的样品以提供基本上不含致病性朊病毒的食物供应品。

[0253] 实施例

[0254] 下文是实施本发明的具体实施方式的实施例。提供这些实施例只是为说明目的,不应理解为以任何方式限制了本发明的范围。

[0255] 已努力确保所用数字(例如,用量、温度等)的精确性,但当然应该考虑到一定的实验误差和偏差。

[0256] 实施例 1:制备肽试剂

[0257] 基本上按照 Merrifield(1969)Advan. Enzymol. 32:221;Holm 和 Medal(1989), Multiple column peptide synthesis(《多柱肽合成》),第 208E 页;Bayer 和 G. Jung 编, Peptides(《肽》),1988, Walter de Gruyter & Co. Berlin-N. Y 所述采用标准肽合成技术化学合成朊病毒蛋白的肽片段。用 HPLC 纯化各肽,质谱验证序列。

[0258] 与野生型序列相比,在某些情况中,合成的肽在 N 或 C 末端包含其它残基,例如 GGG 残基和/或包含一个或多个氨基酸取代。

[0259] A. 拟肽取代

[0260] 也在 SEQ ID NO:14(QWNKPSKPKTN,对应于 SEQ ID NO:2 的残基 97-107)、SEQ ID NO:67(KKRPKPGWNTGG,对应于 SEQ ID NO:2 的残基 23-36)和 SEQ ID NO:68(KKRPKPGG,对应于 SEQ ID NO:2 的残基 23-30)所示肽中作出拟肽取代。具体地说,用各种 N-取代的拟肽取代这些肽中一个或多个脯氨酸残基。可用任一脯氨酸取代的拟肽可参见图 3。如全文纳入本文作为参考的美国专利号 5,877,278 和 6,033,631;Simon 等(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:9367 所述制备和合成拟肽。

[0261] B. 多聚化

[0262] 也可将某些肽试剂制备为多聚物,例如通过制备串联重复(通过接头,如 GGG 连接肽的多份拷贝)、多抗原肽(MAPS)和/或线形连接的肽。

[0263] 具体地说,基本上如 Wu 等(2001)J Am Chem Soc. 2001123(28):6778-84; Spetzler 等(1995)Int J Pept Protein Res. 45(1):78-85 所述采用标准技术制备 MAPS。

[0264] 也采用标准技术用聚乙二醇(PEG)接头制备线形和支链肽(例如,PEG 接头多聚化)。具体地说,制备具有以下结构的支链多个肽 PEG 支架(branched multi-peptide PEG scaffold):生物素-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys(非肽对照)和生物素-PEG-Lys(肽)-PEG-Lys(肽)-PEG-Lys(肽)-PEG-Lys(肽)-PEG-Lys(肽)。此外,制备与 Lys 相连的肽:Lys-ε-NH-CO-(CH₂)₃-Mal-S-Cys-肽。参见图 5。

[0265] C. 生物素化

[0266] 合成和纯化后按照标准技术生物素化各肽。将生物素加入各肽的 N-或 C-末端。

[0267] 实施例 2:结合试验

[0268] A. 吸下

[0269] 用磁珠吸下试验检验本文所述肽试剂特异性结合朊病毒蛋白的能力。对于该试验,用生物素标记肽试剂(使其与链霉亲和素包被的磁珠相连)或与磁珠共价连接。

[0270] 制备 RML PrP^{Sc+} 和 PrP^{C+}Balb-c 小鼠的脑匀浆液。简言之,将含 1% TW20 和 1% triton100 的 5mL TBS 缓冲液 (50mM Tris-HCl pH7.5 和 37.5mM NaCl) 加入重约 0.5g 大脑以产生 10% 匀浆液。匀浆 (dounce) 脑浆液直至大颗粒消失。将用缓冲液作 1:1 稀释的 200 μ l 等份试样加入预冷的微量离心管中,超声处理样品数次,每次数秒。500 $\times$ 离心样品 10-15 分钟,取出上清液。

[0271] 为检验蛋白酶 K 的消化作用,将某些上清液分成两份样品,向一份样品中加入 4 μ l 蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 摇动 1 小时。向蛋白酶 K 试管中加入 8 微升 PMSF 以终止消化,试管在 4 $^{\circ}$ C 培育最少 1 小时。

[0272] 此外,也检验了用生物素化肽和链霉亲和素磁珠的不同形式吸下效果。在第一组实验中,将传染性脑匀浆液与生物素化肽混合,然后加入链霉亲和素珠。在第二组实验中,用生物素化肽包被磁性链霉亲和素珠,然后与传染性脑匀浆液混合。在两组实验中,所有三种组分 (珠、肽和脑匀浆液) 一起培育后,洗涤混合物,室温下用 3M GdnSCN 处理 15 分钟,如下所述进行 ELISA 试验。

[0273] 如图 14 所示,第二种形式 (先用生物素化肽包被,再与脑匀浆液混合) 分离 (吸下) PrP^{Sc} 的效果比第一种形式 (生物素化肽与脑匀浆液混合后加入珠) 高约 100 倍。根据这些结果,按照第二种形式进行其它检测实验。

[0274] 将匀浆液保存于 4 $^{\circ}$ C 直至进一步使用,如果需要再次进行上述超声波处理。如下所述,4 $^{\circ}$ C 下将脑匀浆液的 10% w/v PrP^{C+} 或 PrP^{Sc+} 制品与生物素标记肽试剂培育过夜。准备含有 400 μ l 缓冲液、50 μ l 提取物和 5 μ l 生物素标记肽试剂 (10mM 储备液) 的试管。室温下用台式摇床 (platform rocker) 培育这些试管至少 2 小时,或 4 $^{\circ}$ C 培育过夜。

[0275] 培育后,加入 50 μ l SA- 珠 (Dyna1 M280 链霉亲和素 112.06),旋振混合试管。室温摇动 (VWR,摇动平台,100 型) 培育试管 1 小时,或在 4 $^{\circ}$ C 培育过夜。从摇床中取出样品,置于磁场中以收集连有肽试剂和朊病毒的磁珠,用 1ml 试验缓冲液洗涤 5-6 次。立即使用样品或在 -20 $^{\circ}$ C 保存直至进行下述蛋白质印迹或 ELISA。

[0276] B. 蛋白质印迹

[0277] 如下所述进行蛋白质印迹分析。将 25-30 μ l SDS 缓冲液 (Novex Tris- 甘氨酸 SDS- 样品缓冲液 2 $\times$) 加入各试管作最后一次洗涤后使上述沉淀的珠-肽-朊病毒复合物变性。旋振混合各试管直至所有珠悬浮。煮沸各试管直至盖子开始打开,进行标准的 SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至固体膜进行 WB 分析。

[0278] 室温下用 5% 牛奶/TBS-T [50ml 1M Tris pH7.5;37.5ml 4M NaCl,1-10ml 吐温,用牛奶将体积调节至 1L] 封闭膜 30 分钟。如 2003 年 9 月 30 号提交的名为“Prion Chimeras and Uses Thereof”(朊病毒嵌合体及其应用) 的国际申请号 PCT/US03/31057 所述 (该份申请纳入本文作为参考),将 10-15ml 的抗-朊病毒多克隆抗体的 1:50 倍稀释液加入膜,室温培育 1 小时。用 TBS-T 洗涤膜多次。洗涤后,加入以 1:1000 稀释 (用 TBS-T) 的偶联有碱性磷酸酶 (AP) 的第二抗体 (山羊抗-家兔 IgG(H+L) 抗体) (Pierce),室温下培育 20 分钟。用 TBS-T 洗涤膜多次。加入碱性磷酸酶沉淀试剂 (1-步 NBT/BCIP) (Pierce) 并显色直至看见背景或信号明显。

[0279] C. ELISA

[0280] 如下所述进行间接 ELISA。(图 7)。(间接 ELISA 用抗原包被平板,在此情况中,

用吸下步骤得到的 PrP 包被各平板,未标记第一抗体对抗原特异,标记第二抗体能结合第一抗体)。如上所述吸下得到各样品中的 PrP^{Sc}。简言之,用一种或多种本文所述肽试剂包被磁珠,等份加入 96-孔板。将小鼠脑匀浆液、掺加了 PrP^{Sc} 的人血浆、正常和瘙痒症大脑的金黄仓鼠 (SHa) 脑匀浆液、人 vCJD 脑和正常与患病 (CWD PrP^{Sc}) 的鹿 PrP 基因转基因小鼠的脑匀浆液的样品和肽试剂包被珠室温培育 4 小时以使样品中的任何 PrP^{Sc} 与肽试剂包被珠结合。

[0281] 用肽试剂珠捕获 PrP^{Sc} 后,使各板暴露于磁场和除去上清液,洗涤各孔除去未结合的蛋白质。然后使结合肽的 PrP^{Sc} 与肽珠解离。由于仍没有能识别天然(未变性)PrP^{Sc} 的抗体,故在变性条件下解离 PrP^{Sc},即用 3M 或 6M 硫氰酸胍 (GdnSCN) 培育。参见,例如 Peretz 等, (1997) J. Mol. Biol. 273(3) :614-622 ;Ryou 等, (2003) Lab Invest. 83(6) :837-43。通过与 0.1M NaHCO₃, pH8.9 (110 μ l/孔) 培育将解离的 PrP^{Sc} 包被到各平板上,采用抽吸和洗涤 (3 $\times$ 含 0.05% TW20 的 200 μ l TBS) 除去各孔中的珠。

[0282] 洗涤后,在 37 $^{\circ}$ C 用 TBS 配制的 200 μ l 3% BSA 封闭各孔(用样品中的任何 PrP^{Sc} 包被)1 小时。然后抽去各孔的封闭液,将 TBS 配制含 1% BSA 的 100 μ l 0.5 μ g/ml 第一 Fab D18 溶液 (Peretz 等, (2001) Nature 412 (6848) :739-743) 加入各孔,37 $^{\circ}$ C 培育 2 小时。然后用含 0.05% TW2 的 300 μ l TBS 洗涤各孔 9 次。将偶联有碱性磷酸酶 (AP) 的山羊抗-人抗体 (100 μ l 的 1:5000 稀释液) 加入各孔,平板在 37 $^{\circ}$ C 培育 1 小时。洗涤后 (9 $\times$ 含 0.05% TW2 的 300 μ l TBS),将 100 μ l AP 底物加入各孔,平板在 37 $^{\circ}$ C 培育 0.5 小时,读取各板孔的光密度 (OD)。

[0283] 表 2 和图 7-12 显示了间接 ELISA 的结果。表 2 显示了各种肽试剂的 O.D. 值。超过空白对照的 O.D. 值 (范围是 0.172-0.259) 判为阳性。

[0284] 图 8 显示了掺加了各种稀释度的传染性朊病毒颗粒的小鼠脑匀浆液中 PrP^{Sc} 的 ELISA 检测结果。如上所述进行 ELISA 试验。LD₅₀ 定义为杀死 50% 动物的 PrP^{Sc} 致死剂量,已测定了包括小鼠在内的许多啮齿类模型。参见,例如 Klohn 等, (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100 (20) :11666-11671。ELISA 试验检测到的血浆和暗黄覆盖层中朊病毒传染性低于 100LD₅₀ 单位,这是检测血液样品中朊病毒的所需灵敏度。

[0285] 图 9 显示了用 QWNKPSKPKTN-生物素 (SEQ ID NO :14) (图 9A) 和生物素 -GGGKRPKPGG (SEQ ID NO :68) (图 9B) 作为捕捉(吸下)试剂,检测掺入人血浆中的小鼠 PrP^{Sc} 的 ELISA 结果。

[0286] 图 10A 显示了用 QWNKPSKPKTN-生物素 (SEQ ID NO :14) 和生物素 -GGGKRPKPGG (SEQ ID NO :68) 吸下而不用蛋白酶 K (PK) 消化的正常和 PrP^{Sc} 感染的金黄仓鼠 (SHa) 1 μ l 10% 脑匀浆液 (购自 VA Medical Center, 巴尔的摩, 马里兰州) 的 ELISA 检测结果。图 10B 描述经 PK 消化样品的蛋白质印迹分析。图 11 显示了携带鹿 PrP 基因的转基因小鼠 (得自 Glenn Telling, 肯塔基州立大学, 参见 Browning 等, (2004) J. Virol. 78 (23) :13345-13350) 中 PrP^{Sc} 的 ELISA 检测结果。如上所述,用 QWNKPSKPKTN-生物素 (SEQ ID NO :14)、生物素 -KKKAGAAAAGAVVGLGG-CONH₂ (SEQ ID NO :136) 和 GGGKRPKPGG (SEQ ID NO :68) 吸下 PrP^{Sc}, 通过 ELISA 检测。

[0287] 图 12 显示了通过蛋白质印迹 (12A) 和 ELISA (图 12B) 检测各种 CJD 样品中的 PrP^{Sc}。

[0288] 图 13 显示了用本文所述以下各种肽来检测 vCJD 脑匀浆液中的 PrP^{Sc} : QWNKPSKPKTN-生物素 (SEQ ID NO:14); QWNKPSKTTKTNGGGQWNKPSKPKTN-生物素 (SEQ ID NO:51); 生物素-QWNKPSKPKTN, 其中 P5 用 N-(3,5-二甲氧基苄基)甘氨酸取代 (SEQ ID NO:117); 生物素-QWNKPSKPKTN, 其中 P5 用 N-氨基丁基甘氨酸取代 (SEQ ID NO:118); 生物素-QWNKPSKPKTN, 其中 P8 用 N-(环丙基甲基)甘氨酸取代 (SEQ ID NO:111); 生物素-QWNKPSKPKTN, 其中 P8 用 N-氨基丁基甘氨酸取代 (SEQ ID NO:114); 生物素-QWNKPSKPKTN, 其中 P5 用 N-(环丙基甲基)甘氨酸取代和 P8 用 N-氨基丁基甘氨酸取代 (SEQ ID NO:131); 生物素-QWNKPSKPKTN, 其中 P5 用 N-(异丙基)甘氨酸取代和 P8 用 N-(环丙基甲基)甘氨酸取代 (SEQ ID NO:132); QWNKPSKPKTN2K-生物素 (SEQ ID NO:133; 图6); 生物素-GGGKKRPKPGG (SEQ ID NO:68); 生物素-KKRKPGG, 其中 P6 用 N-(环丙基甲基)甘氨酸取代 (SEQ ID NO:122); 生物素-GGGKKRPKPGGGQWNKPSKPKTN (SEQ ID NO:81); 4-支链 MAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG-生物素 (SEQ ID NO:134); 8-支链 MAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG-生物素 (SEQ ID NO:135); 生物素-KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM (SEQ ID NO:57); 生物素-KKKAGAAAAGAVVGGLGG-CONH₂ (SEQ ID NO:136); 和生物素-GGGKKKKKKKK (SEQ ID NO:85)。

[0289] D. 结果

[0290] 表 2 和图 8-14 总结了蛋白质印迹和间接 ELISA 结合试验的结果。简言之,不必用蛋白酶 K 消化脑匀浆液来检测本文所述肽试剂与 PrP^{Sc} 的特异性结合。如图 4 所示,无一例观察到与野生型脑匀浆液有结合,表明肽试剂与 PrP^{Sc} 特异性结合。图 8-14 显示了不同物种的灵敏度和特异性。此外,上述蛋白质印迹分析可检测低于 4 个 log 稀释度的 PrP^{Sc},而 ELISA 比蛋白质印迹灵敏至少 10 倍。

[0291] 因此,本文所述肽试剂能进行简单的单孔高通量试验来有效检测生物学样品中是否存在各种物种的 PrP^{Sc},检测灵敏度达到 100LD₅₀ 以下并且无需蛋白酶 K 消化。

[0292] 表 2

[0293]

肽试剂 (在 N- 或 C- 末端用生物素标记)	序列编号:	蛋白质印迹	ELISA A _{405nm}
³ CGG ⁵ WGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV ³ C	35	+	0.687
³ GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36	+	ND
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV ³	37	+	ND
C ⁵ GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV ³ C	40	+	ND
RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁴	44	-	ND
⁴ RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁵ C	76	-	ND
⁵ C ⁴ RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁴ C ²	46	+	ND
QWNKPSKPKTN ⁴	50	+	0.932
QWNKPSKPKTN	14	+++	0.775
QWNKPSKPKTN ⁴ QWNKPSKPKTN	51	+++	.923
QWNKPSKPKTNLKHV ⁴	77	++	0.839
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53	+	0.254
GGTHNQWNKPSKPKTN	54	+	0.253
⁴ AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78	不可溶	0.259
⁴ AGAAAAGAVVGGLGG	56	不可溶	0.313
⁶ AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57	+	0.901
⁶ AGAAAAGAVVGGLGG	65	++	0.635

⁴ KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS	66	+	0.533
⁴ KKRPKPGGWNTGG	67	++	0.451
⁴ KKRPKPGG	68	+++	0.765
PHGGGWGQPHGGSWGQPHGGSWGQ	69	-	0.282
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70	-	0.241
PHGGGWGQ	71	-	0.263
⁴ GPKRKGP	73	+	1.0621
⁴ WNKPSKPKT	75	-	0.247
⁴ NKPSKPK	79	-	0.24
⁴ KPSKPK	80	-	0.225
⁴ KKRPKPGGGKKRPKPGG	72	+	0.522
⁴ KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81	+	1.247
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	82	-	0.340
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	83	-	0.237
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMKKK	84	+	0.268
⁴ KKKKKKKK	85	+3	0.530
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	86	-	0.227
⁴ NNKQSPWPTKK	87	-	0.277
DKDKGGVGALAGAAVAAGGDKDK	88	-	0.282
⁴ QANKPSKPKTN	89	+	0.245
⁴ QWNKASKPKTN	90	-	0.283
⁴ QWNKPSAKTN	91	-	0.256
⁴ QWNAPSKPKTN	92	-	0.230
⁴ QWNKPSAPKTN	93	-	0.250
⁴ QWNKPSKPATN	94	-	0.260
⁴ QWNKASKAKTN	95	-	0.241
⁴ KKRAKPGG	96	+	2.19
⁴ KKRPKAGG	97	+	1.24
⁴ KKRAKAGG	98	+	1.46

[0294] 1:目测观察评估相对信号强度

[0295] 2:环化的

[0296] 3:加入/插入所示位置的 GGGG 残基

[0297] 4:加入/插入所示位置的 GGG 残基

[0298] 5:加入/插入所示位置的 GG 残基

[0299] 6:加入/插入所示位置的 KKK 残基

[0300] ND = 未检测

[0301] 也进行了丙氨酸扫描来鉴定参与结合的残基。表 3 显示了结果。

[0302] 表 3

[0303]

肽试剂 (在 N- 或 C- 末端用生物素标记)	SEQ ID NO	蛋白质印迹	ELISA A _{405nm}
QWNKPSKPKTN	14	+++	0.775
QANKPSKPKTN	89	+++	0.245
QWNAPSKPKTN	92	+	0.283
QWNKPSAPKTN	93	+	0.256
QWNKPSKPATN	94	+	0.230
QWNKASKPKTN	99	+/-	0.250
QWNKPSAKTN	91	+	0.260
QWNKASKAKTN	95	-	0.241

QWAKPSKPKTN	100	ND	0.376
QWNKPAKPKTN	101	ND	0.356
QWNKPSKPKAN	102	ND	0.234
QWNKPSKPKTA	103	ND	0.262
KKRPKPGG	68	+++	0.765
AKRPKPGG	104	+	0.273
KARPKPGG	105	+	0.256
KKAPKPGG	106	+	0.268
KKRPAPGG	107	+	0.578
KKRAKPGG	96	++	2.19
KKRPKAGG	97	++	1.24
KKAPKAGG	108	+	1.46

[0304] 此外,如表 4 所示,用许多 N- 取代的甘氨酸(拟肽)取代脯氨酸残基进一步提高了含 SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :67 和 SEQ ID NO :68 的肽试剂与 PrP^{Sc} 的结合。也参见图 13。

[0305] 表 4

[0306]

	蛋白质 印迹	ELISA A _{405nm}
*在 (GGG) ¹ QWNKPSK * KTN 中 (SEQ ID NO :14)		
脯氨酸	+++	0.775
N-(S)-(1- 苯基乙基) 甘氨酸(图 3A 中以圆圈表示的拟肽)(SEQ ID NO :109)	++	0.865
N-(4- 羟基苯基) 甘氨酸(图 3B 中以圆圈表示的拟肽)(SEQ ID NO :110)	-	0.934
N-(环丙基甲基) 甘氨酸(图 3C 中以圆圈表示的拟肽)(SEQ ID NO :111)	+++++	1.141
N-(异丙基) 甘氨酸(图 3D 中以圆圈表示的拟肽)(SEQ ID NO :112)	ND	0.974
N-(3,5- 二甲氧基苄基) 甘氨酸(图 3E 中以圆圈表示的拟肽)(SEQ ID NO :113)	+++	2.045
N- 氨基丁基甘氨酸(图 3F 中以圆圈表示的拟肽)(SEQ ID NO :114)	++++	0.776
*在 (GGG) ¹ QWNK * SKPKTN 中 (SEQ ID NO :14)		
N-(环丙基甲基) 甘氨酸 (SEQ ID NO :115)	ND	0.498
N-(异丙基) 甘氨酸 (SEQ ID NO :116)	ND	1.57
N-(3,5- 二甲氧基苄基) 甘氨酸 (SEQ ID NO :117)	ND	0.823
N- 氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :118)	ND	0.619
*在 (GGG) ¹ KKRPK * GG 中 (SEQ ID NO :68)		
脯氨酸	ND	0.765
N- 氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :119)	ND	0.61
N-(3,5- 二甲氧基苄基) 甘氨酸 (SEQ ID NO :120)	ND	0.631
N-(异丙基) 甘氨酸 (SEQ ID NO :121)	ND	0.509

N-(环丙基甲基)甘氨酸 (SEQ ID NO :122)	ND	0.503
*在 (GGG) ¹ KKRPK * GGWNTGG 中 (SEQ ID NO :67)		
脯氨酸	ND	0.451
N-氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :123)	ND	0.503
N-(3,5-二甲氧基苄基)甘氨酸 (SEQ ID NO :124)	ND	0.464
N-(异丙基)甘氨酸 (SEQ ID NO :125)	ND	0.555
N-(环丙基甲基)甘氨酸 (SEQ ID NO :126)	ND	0.344
(GGG) ¹ QWNKX1SKX2KTN		
X1 为 N-(环丙基甲基)甘氨酸 ;X2 为 N-(环丙基甲基)甘氨酸 (SEQ ID NO :129)	ND	ND
X1 为 N-(环丙基甲基)甘氨酸 ;X2 为 N-(3,5-二甲氧基苄基)甘氨酸 (SEQ ID NO :130)	ND	ND
X1 为 N-(环丙基甲基)甘氨酸 ;X2 为 N-氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :131)	ND	ND
X1 为 N-(异丙基)甘氨酸 ;X2 为 N-(环丙基甲基)甘氨酸 (SEQ ID NO :132)	ND	ND
X1 为 N-(异丙基)甘氨酸 ;X2 为 N-(3,5-二甲氧基苄基)甘氨酸 (SEQ ID NO :257)	ND	ND
X1 为 N-(异丙基)甘氨酸 ;X2 为 N-氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :258)	ND	ND
*在 (GGG) ¹ KKR * KPGWNTGG 中 (SEQ ID NO :67)		
N-氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :249)	ND	ND
N-(3,5-二甲氧基苄基)甘氨酸 (SEQ ID NO :250)	ND	ND
N-(异丙基)甘氨酸 (SEQ ID NO :251)	ND	ND
N-(环丙基甲基)甘氨酸 (SEQ ID NO :252)	ND	ND
*在 (GGG) ¹ KKR * KPGG 中 (SEQ ID NO :68)		
N-氨基丁基甘氨酸 (SEQ ID NO :253)	ND	ND
N-(3,5-二甲氧基苄基)甘氨酸 (SEQ ID NO :254)	ND	ND
N-(异丙基)甘氨酸 (SEQ ID NO :255)	ND	ND
N-(环丙基甲基)甘氨酸 (SEQ ID NO :256)	ND	ND

[0307] 1 该表格所示实验用的肽试剂中不存在任选的 GGG 接头

[0308] 此外,结合 PrP^{Sc} 的肽试剂多聚化也提高了对 PrP^{Sc} 的亲合力。具体地说,串联重复比单拷贝产生更强烈的信号(蛋白质印迹检测)。在某些情况中,珠上预先衍生的 MAP 形式使结合提高了两倍。然而,MAP 形式导致溶液中的肽沉淀。也检测到线形连接的肽能提高结合而不导致沉淀。

[0309] 实施例 3- 夹心 ELISA 和 pH 解离

[0310] 如实施例 2 所示,离液剂,例如胍盐能有效地使吸下步骤中捕获的 PrP^{Sc} 解离并变性。然而,必须除去或大量稀释胍盐以使变性的朊病毒蛋白与抗-朊病毒抗体(用于,例如

检测 PrP) 接触。对于直接或间接 ELISA (其中相当大量的 PrP 直接包被在微量滴定板上), 这不是问题, 但对于夹心 ELISA 是个问题。我们开发了替代方法来使肽试剂捕获的 PrP^{Sc} 变性, 该方法不用 Gdn 且无需额外洗涤或加入大量稀释液。该方法采用 pH 处理 (高 pH 或低 pH) 使 PrP^{Sc} 变性。变性的 PrP 可与肽试剂解离。通过中和溶液不难除去变性条件。

[0311] 与肽试剂解离后, 利用 2 种不同的抗 - 朊病毒抗体 (一种用于“捕捉”, 一种用于检测) 进行夹心 ELISA 来检测 PrP^{Sc}。利用 3M GdnSCN 或者高或低 pH 的 pH 处理使朊病毒蛋白解离和变性来进行这些测定。下文概述了这些实验的方案。

[0312] 将链霉亲和素磁珠 (M-280Dynabeads) 与含 SEQ ID NO:68 的生物素化肽试剂混合, 洗涤以除去未结合的肽试剂。用肽包被的珠吸下掺入含 70% 人血浆的 100 μ l 溶液中的 0.025 μ l 人 vCJD10% 脑匀浆液。37°C 混合 1 小时后, 洗涤珠, 用不同 pH 的溶液处理。室温下培育 10 分钟后, 将溶液调节至约 7 的中性 pH。将含解离和变性的朊病毒蛋白的上清液加入已用抗 - 朊病毒抗体 SAF32 包被的微量滴定板, 然后在 37°C 培育平板 2 小时。洗涤各平板, 加入 AP- 标记的 3F4 抗体作为检测抗体。37°C 培育各平板 2 小时, 再次洗涤, 加入化学发光 AP 底物 (LumiphosPlus), 37°C 培育 30 分钟, 用 Luminoskan Ascent (Thermo Labsystems) 读取 A₄₀₅。结果示于表 5。该实验中 pH 解离和变性的最佳条件是 0.1N NaOH (pH 约 13) 或 0.5M 磷酸 (pH 约 1), 10 分钟。

[0313] 与用 Gdn 相比, 我们用 pH13 或 pH1 处理将掺有 4 倍 BH (即, 含有 100n1vCJD BH 或正常 BH) 的人血浆样品重复上述夹心 ELISA。表 6 显示了这些结果类似于以前的结果。

[0314] 表 5. 吸下的 pH 和 Gdn 变性 PrP 的夹心 ELISA 数据

[0315]

处理	pH	中和	最终 pH	样品	ELISA 数据		
					平均值	标准偏差	S/B
15 ul GdnSCN 3M	5.9	210 ul H ₂ O	6.0	vCJD BH + 血浆	53.8	3.3	2.5
				正常 BH + 血浆	15.8	6.2	0.7
				只有血浆	21.6	5.4	1.0
50ul NaOH 0.0001M	10	20 ul NaH ₂ PO ₄ 0.0003 M	7	vCJD BH + 血浆	8.6	1.1	1.0
				正常 BH + 血浆	8.1	1.0	1.0
				只有血浆	8.3	1.0	1.0
50ul NaOH 0.01M	12	20 ul NaH ₂ PO ₄ 0.03 M	7	vCJD BH + 血浆	6.7	0.6	1.2
				正常 BH + 血浆	5.4	0.2	1.0
				只有血浆	5.5	0.6	1.0
50ul NaOH 0.1M	13	20 ul NaH ₂ PO ₄ 0.3 M	7	vCJD BH + 血浆	47.8	2.6	5.8
				正常 BH + 血浆	7.1	0.9	0.9
				只有血浆	8.2	1.8	1.0
50ul H ₃ PO ₄ 0.00007 M	4	25ul NaOH 0.0031 N	7	vCJD BH + 血浆	9.7	2.0	1.0
				正常 BH + 血浆	9.2	1.3	0.9
				只有血浆	9.9	0.8	1.0
50ul H ₃ PO ₄ 0.12 M	2	25ul NaOH 0.31 N	7	vCJD BH + 血浆	10.1	0.5	1.0
				正常 BH + 血浆	13.4	6.6	1.3
				只有血浆	10.1	1.1	1.0
50ul H ₃ PO ₄ 0.5 M	1	25ul NaOH 3.1 N	7	vCJD BH + 血浆	44.6	12.9	4.3
				正常 BH + 血浆	10.6	2.3	1.0
				只有血浆	10.4	1.6	1.0

[0316] 表 6. 含 100n1 BH 的夹心 ELISA

[0317]

处理	样品	平均 LU	标准偏差
高 pH (NaOH 0.1 N)	血浆 + vCJD BH	260.3	14.6
	血浆 + 正常 BH	14.9	0.9
	血浆	12.9	0.8
低 pH (H ₃ PO ₄ 0.5 M)	血浆 + vCJD BH	249.9	16.1
	血浆 + 正常 BH	20.5	2.5
	血浆	16.7	2.0
GdnSCN 3M	血浆 + vCJD BH	252.7	13.9
	血浆 + 正常 BH	26.6	14.6
	血浆	20.5	5.7

[0318] 类似于上述进行夹心 ELISA, 但用不同的抗 - 朊病毒抗体作为捕捉抗体。如上所述用 AP-3F4 检测。用 6H4 (商品化购自 Prionics AG) 捕捉。也用两种其它抗 - 朊病毒抗体,

C2 和 C17 作为捕捉抗体。C2 能识别朊病毒蛋白 N- 末端八重复（区域）中的表位。C17 能识别 C- 末端区域中残基 121-231 之间的表位。该实验只采用高 pH 处理 60 分钟，然后如上所述中和至 pH7。为比较，用 GdnSCN3M 处理 10 分钟。表 7 显示了结果。

[0319] 表 7. 用 3 种不同捕捉抗体的夹心 ELISA 数据

[0320]

处理	ELISA 数据		
	捕捉抗体		
	C2	C17	6H4
0 N NaOH	16.8	16.3	0.6
0.05 N NaOH	433.4	535.1	137.6
0.5 N NaOH	301.0	20.5	62.5
1 N NaOH	165.8	29.4	67.6
3 M GdnSCN	463.2	922.1	148.6

[0321] 实施例 4:制备替代对照

[0322] A. 替代对照识别的肽试剂

[0323] 如下所示制备能识别肽试剂 QWNKPSKPKTNMKHMGGG (SEQ ID NO:198, 含 C- 末端 GGG 接头) 的替代对照:采用标准技术制备含末端半胱氨酸 (DWEDRYREC, SEQ ID NO:265 或 CDWEDRYRE, SEQ ID NO:266) 的 6H4 表位肽序列 (DWEDRYRE, SEQ ID NO:264), 用交联剂, 例如磺基-SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]-环己烷-1-羧酸酯) 将其偶联于 3F4。进行充分透析以除去未反应的交联剂和游离肽。在用含序列“MKHM”(SEQ ID NO:261) 的肽试剂 (例如 SEQ ID NO:183、188、193、198、206、211、216、224、229、234、243 或 244 中任一序列或从中衍生的肽试剂) 的朊病毒检测试验中可用如此制备的替代对照。

[0324] B. 替代对照识别的肽试剂的辅助基序

[0325] 如下所示制备能结合肽试剂 GGGKKRPKPGG (SEQ ID NO:14, 含 N-末端 GGG 接头) 的替代对照, 其中该肽试剂还包含生物素。采用标准技术制备含末端半胱氨酸 (DWEDRYREC, SEQ ID NO:265 或 CDWEDRYRE, SEQ ID NO:266) 的 6H4 表位肽序列 (DWEDRYRE, SEQ ID NO:264), 用交联剂, 例如磺基-SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]-环己烷-1-羧酸酯) 将其偶联于链霉亲和素。充分透析以除去未反应的交联剂和游离肽。

[0326] C. 夹心试验的双肽结构域替代对照

[0327] 如下所示制备能识别朊病毒结合试剂 3F4 和第一抗体 6H4 的双功能替代对照。采用标准固相肽合成技术制备包含 3F4 表位、6H4 表位和接头的肽。具体地说, 合成 MKHMGGGGDWEDRYRE (SEQ ID NO:267), 其中 MKHM (SEQ ID NO:261) 是 3F4 所识别的表位, GGGG (SEQ ID NO:268) 是接头, DWEDRYRE (SEQ ID NO:264) 是 6H4 所识别的表位。

[0328] 虽然已相当详细地描述了本发明的优选实施方式, 但应知道可以作出明显的改变而不脱离本文限定的本发明构思和范围。

朊病毒氨基酸序列

全长人朊病毒蛋白的氨基酸序列

SEQ ID NO. 1: MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWN
TGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG
GWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQGGGGTHSQWNKPSKPKTNM
KHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRY
YRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTV
TTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQRG
SSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG

全长小鼠朊病毒蛋白的氨基酸序列

SEQ ID. NO. 2: MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGW
NTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGTGWQPHGGGGWGQPHGG;
WGQPHGGSWGQPHGGGGWGQGGGGTHNQWNKPSKPKTNLKI
VAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRY
RENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVT
TTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDGR
RSSSTVLFSPPVILLISFLIFLIVG

图 1

人	--MANLGCWMLVLFVATWSDLG LCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
仓鼠	--MANLSYWLLALFVAMWTDVGLCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGTW
牛	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
绵羊	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
小鼠	--MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGG--TW
麋鹿	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
扁角鹿	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
黑尾鹿	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
白尾鹿	MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGW
	: : . . * : * . * * : * : * : *
人	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGG-WGQGGGTHSQWNKPSKPKTN
仓鼠	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGG-WGQGGGTHNQWNKPSKPKTN
牛	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQGG--THGQWNKPSKPKTN
绵羊	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGGWGQGG--SHSQWNKPSKPKTN
小鼠	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----SWGQPHGGG-WGQGGGTHNQWNKPSKPKTN
麋鹿	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
扁角鹿	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
黑尾鹿	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
白尾鹿	GQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGG-----GWGQPHGGGGWGQGG--THSQWNKPSKPKTN
	* *
人	MKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPI IHFGSDYEDRYRENMYRPNQVYYRPMDE
仓鼠	MKHMAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
牛	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFQXDYEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
绵羊	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFQNDYEDRYRENMYRPNQVYYRPVDR
小鼠	LKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPMIHFQNDWEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
麋鹿	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFQNDYEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
扁角鹿	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFQNDYEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
黑尾鹿	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFQNDYEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
白尾鹿	MKHVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSAMSRPLIHFQNDYEDRYRENMYRPNQVYYRPVDQ
	: * : *
人	YSNQNNFVHDCVNIITIKQHTVTTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQ-
仓鼠	YNNQNNFVHDCVNIITIKQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQKESQAYYDQ
牛	YSNQNNFVHDCVNIITVKEHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
绵羊	YSNQNNFVHDCVNIITVQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
小鼠	YSNQNNFVHDCVNIITIKQHTVTTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYQKESQAYYDQ
麋鹿	YNNQNTFVHDCVNIITVQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESEAYYQ-
扁角鹿	YNNQNTFVHDCVNIITVQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESEAYYQ-
黑尾鹿	YNNQNTFVHDCVNIITVQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
白尾鹿	YNNQNTFVHDCVNIITVQHTVTTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQ-
	* . * * * . *
人	-RGSSMVLFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:3)
仓鼠	RRSS-AVLFSPPVILLISFLIFLMVG (SEQ ID NO:4)
牛	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:5)
绵羊	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:6)
小鼠	RRSSTVLFSSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:7)
麋鹿	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:8)
扁角鹿	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:9)
黑尾鹿	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:10)
白尾鹿	-RGASVILFSPPVILLISFLIFLIVG (SEQ ID NO:11)

图 2

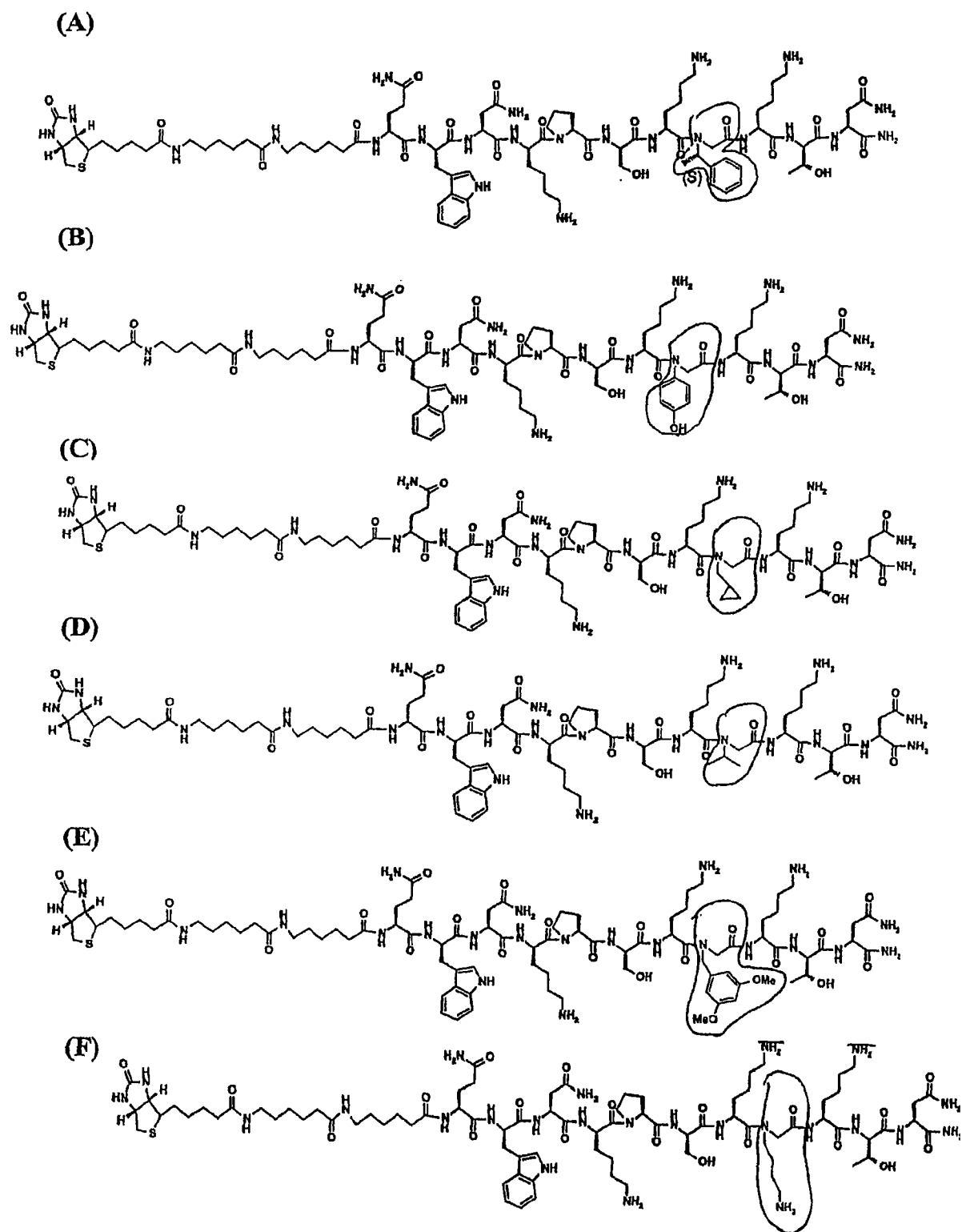


图 3

人血浆和小鼠脑中PrP^{Sc}的特异性肽

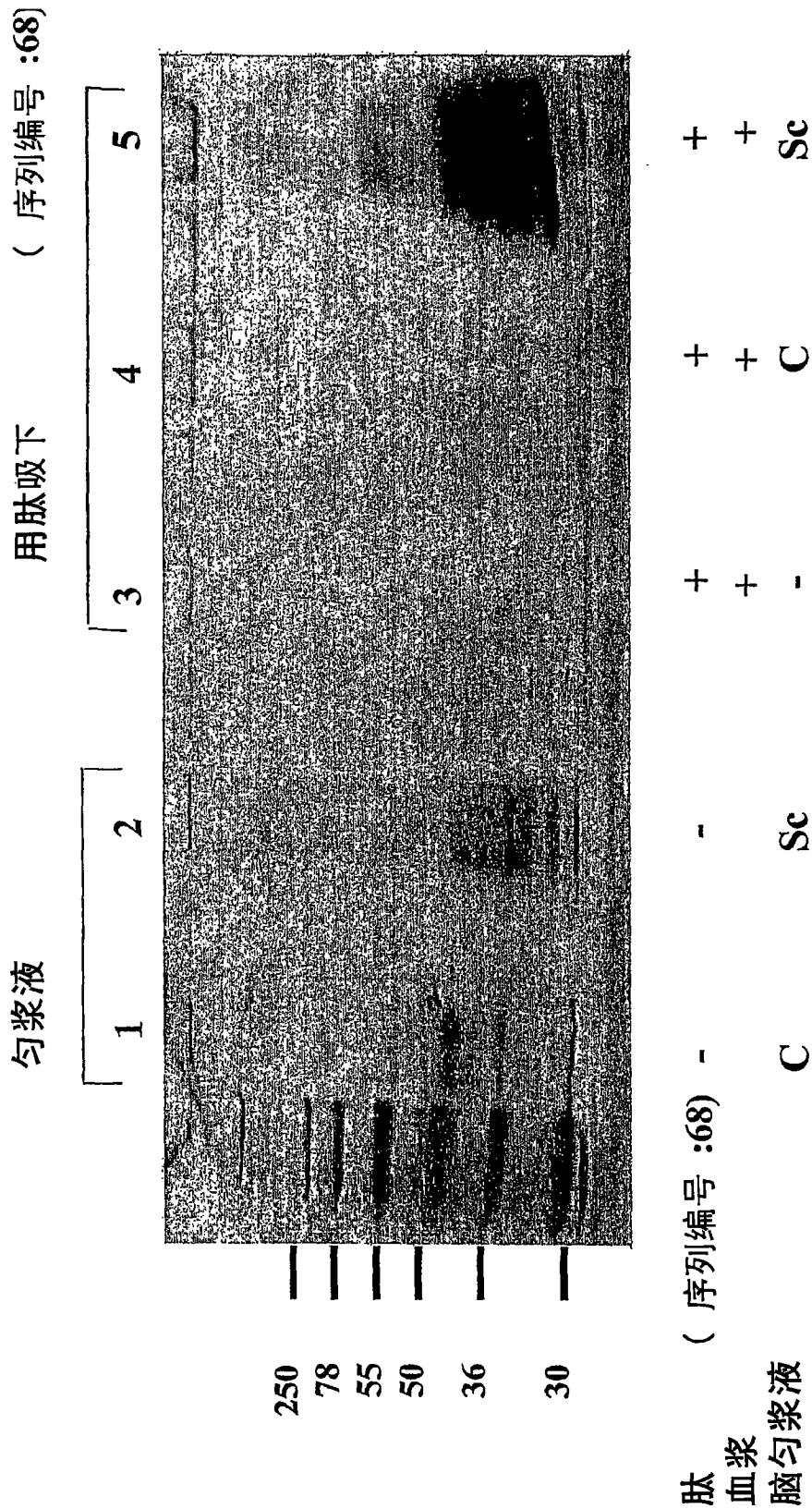


图 4

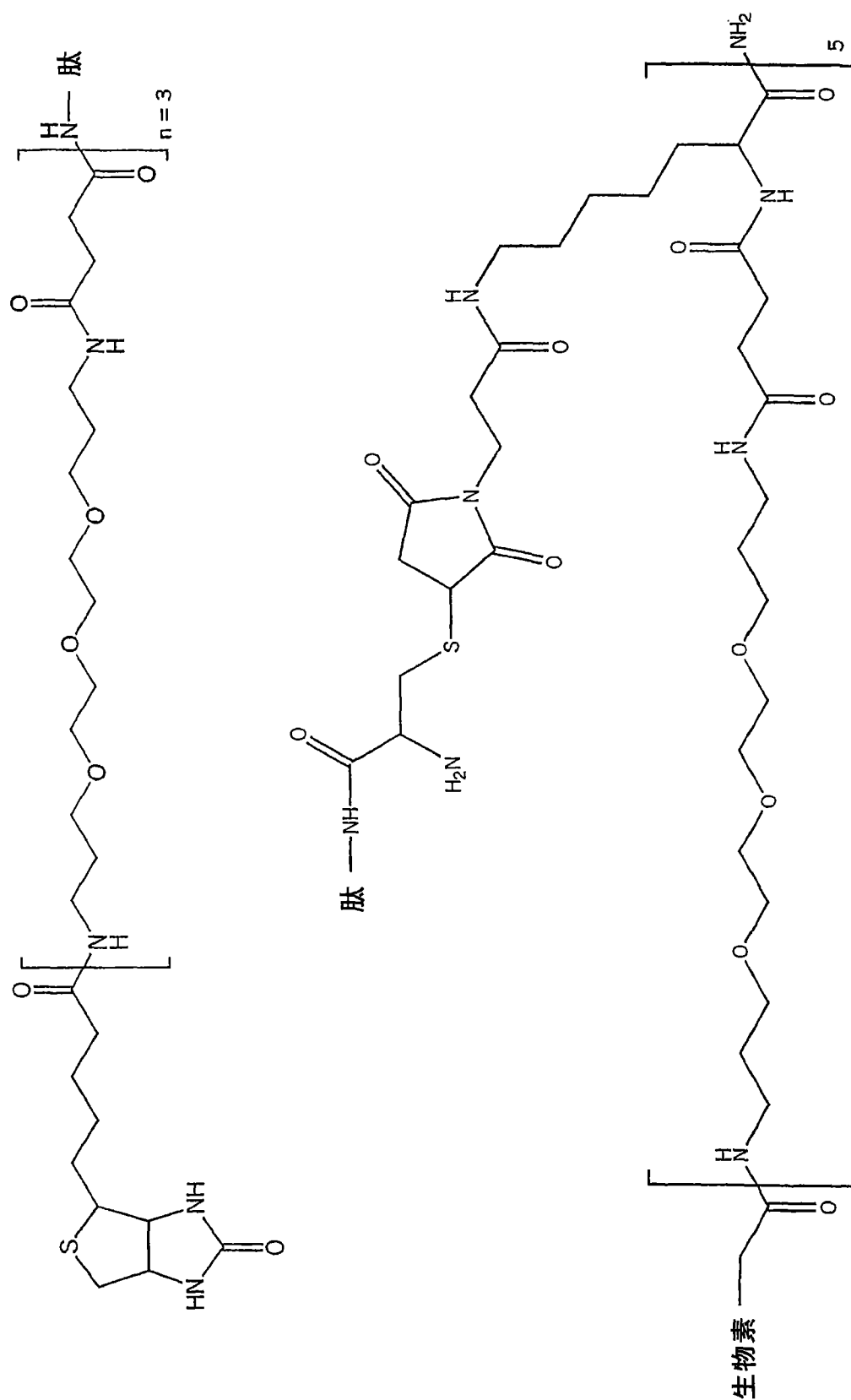
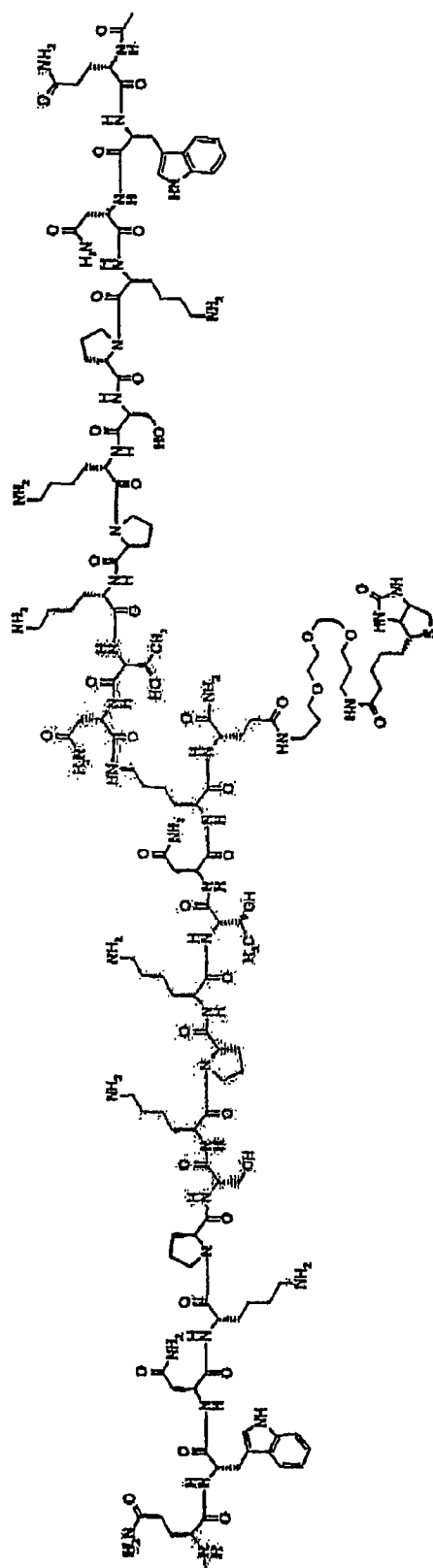


图 5



9
[X]

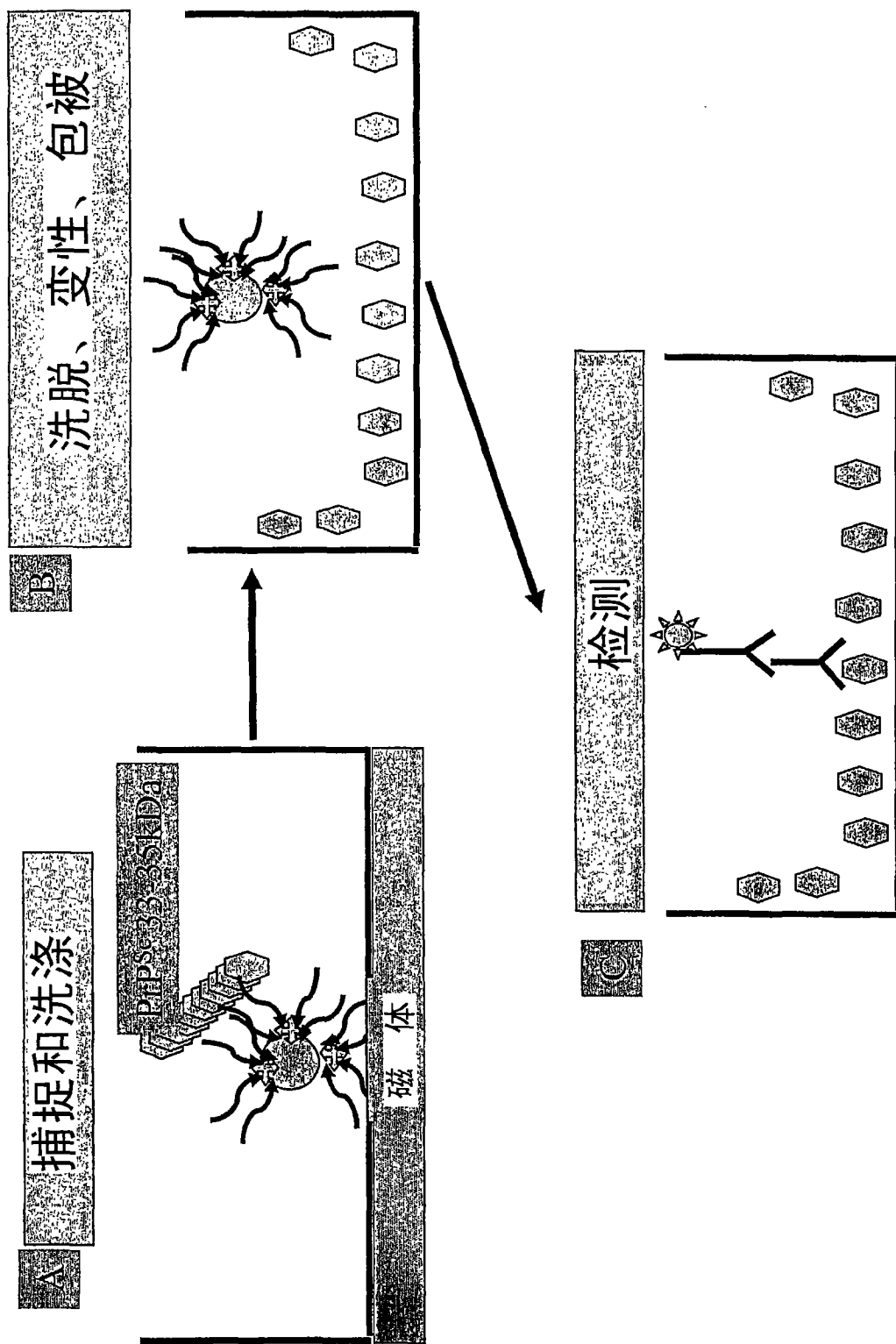
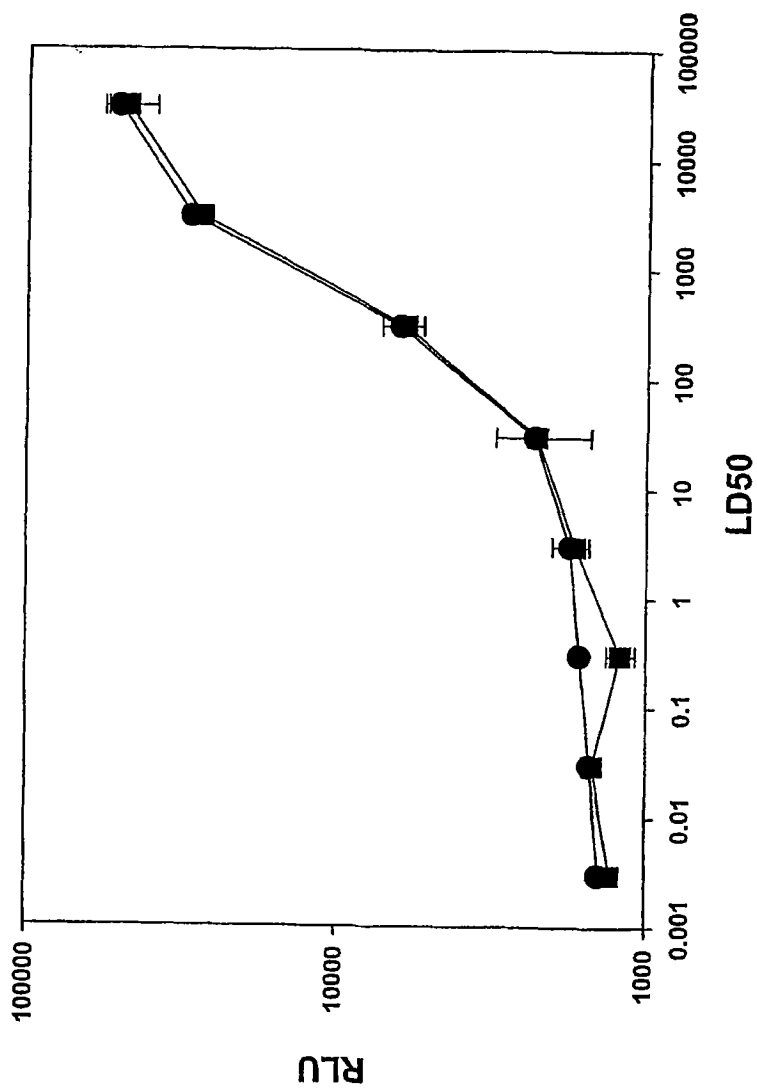


图 7

用正常小鼠脑匀浆液稀释小鼠传染性朊病毒脑匀浆液



粗制小鼠脑匀浆液与包被了朊病毒特异性试剂 (PSR) 的磁珠混合, 洗脱PrP^{Sc}、变性并用ELISA检测。该试验重复两次

图 8

掺入人血浆的PrP-肽浓缩小鼠PrP^{Sc}样品

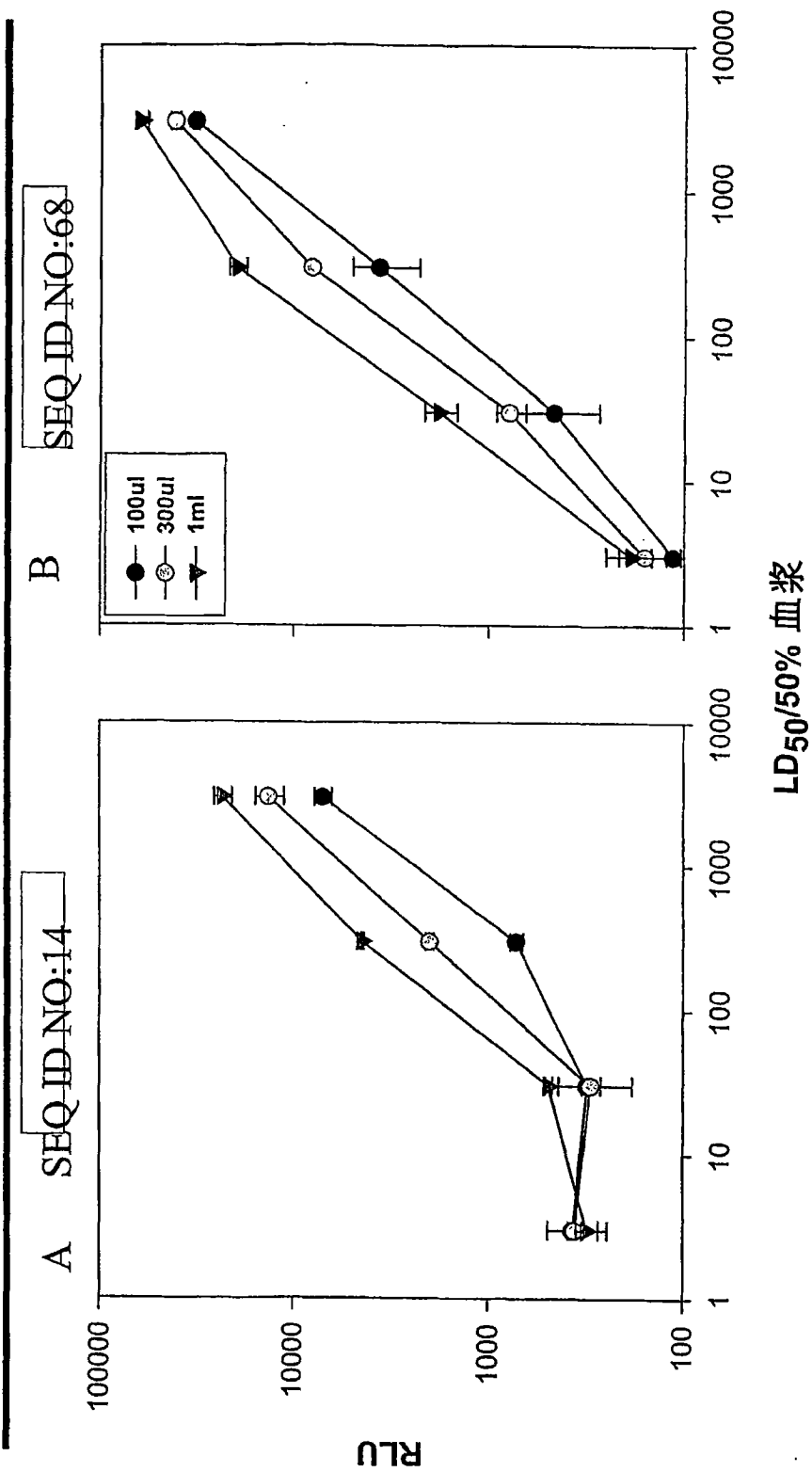
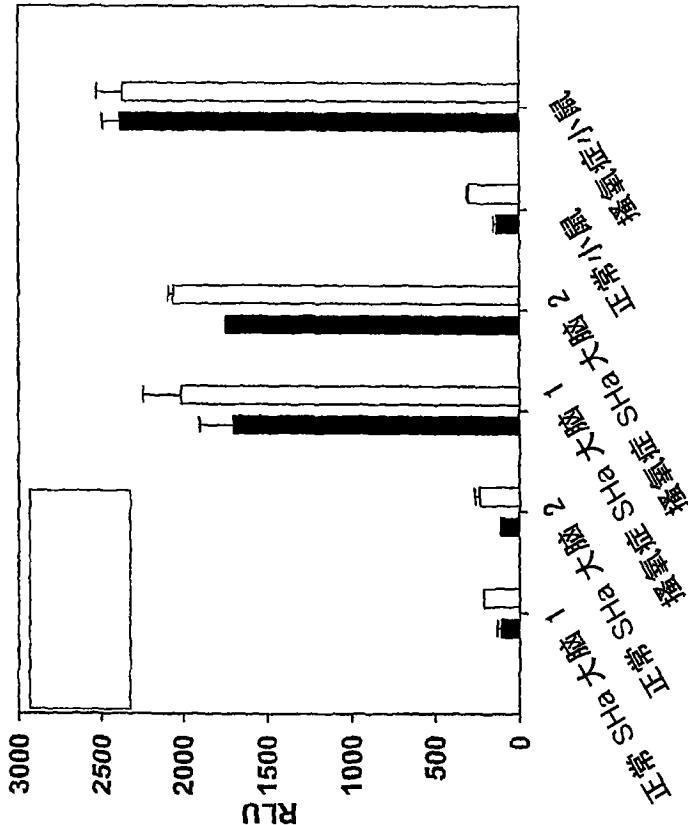


图 9

金黄仓鼠 (SHa)

A

ELISA检测不用PK消化吸下的1 μL 10%脑匀浆液

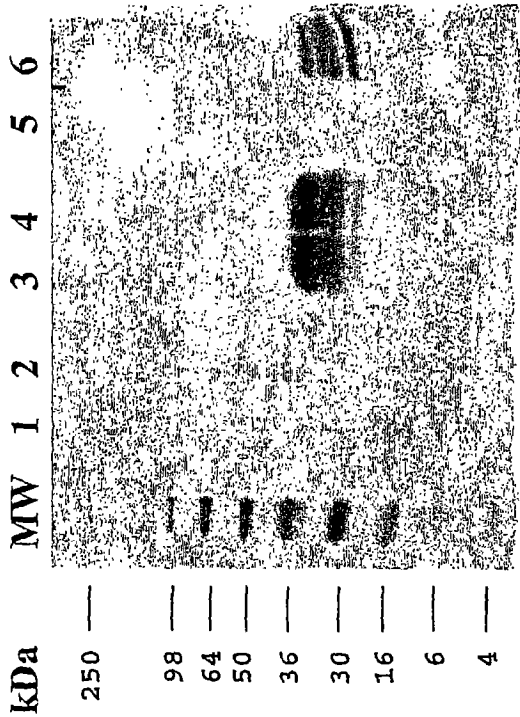


SEQ ID NO:14

SEQ ID NO:68

B

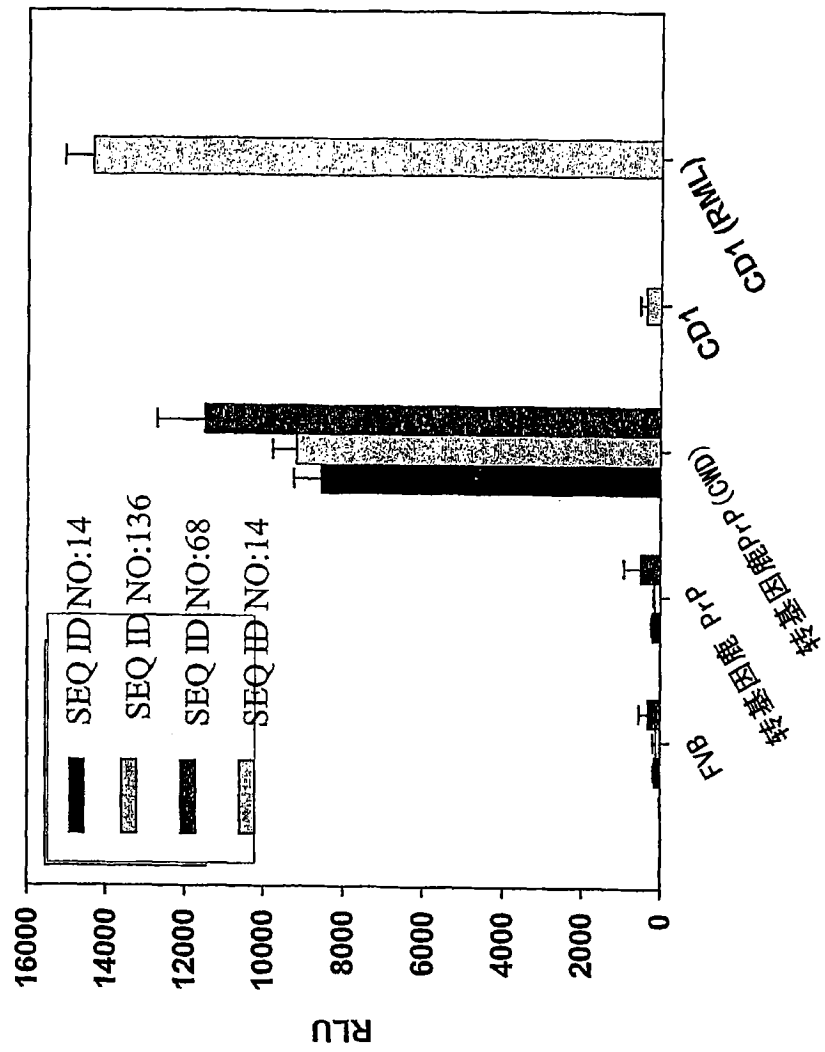
蛋白质印迹分析 10μL PK-消化的10%脑匀浆液



1. 正常 SHa 大脑 1
2. 正常 SHa 大脑 2
3. 搔氧症 SHa 大脑 1
4. 搔氧症 SHa 大脑 2
5. 正常小鼠大脑
6. 搔氧症小鼠大脑

图 10

吸下含鹿PrP基因的转基因小鼠的CWD PrP^{Sc}



1 μ L 10% 小鼠脑匀浆液

图 11

通过蛋白质印迹和ELISA检测CJD样品

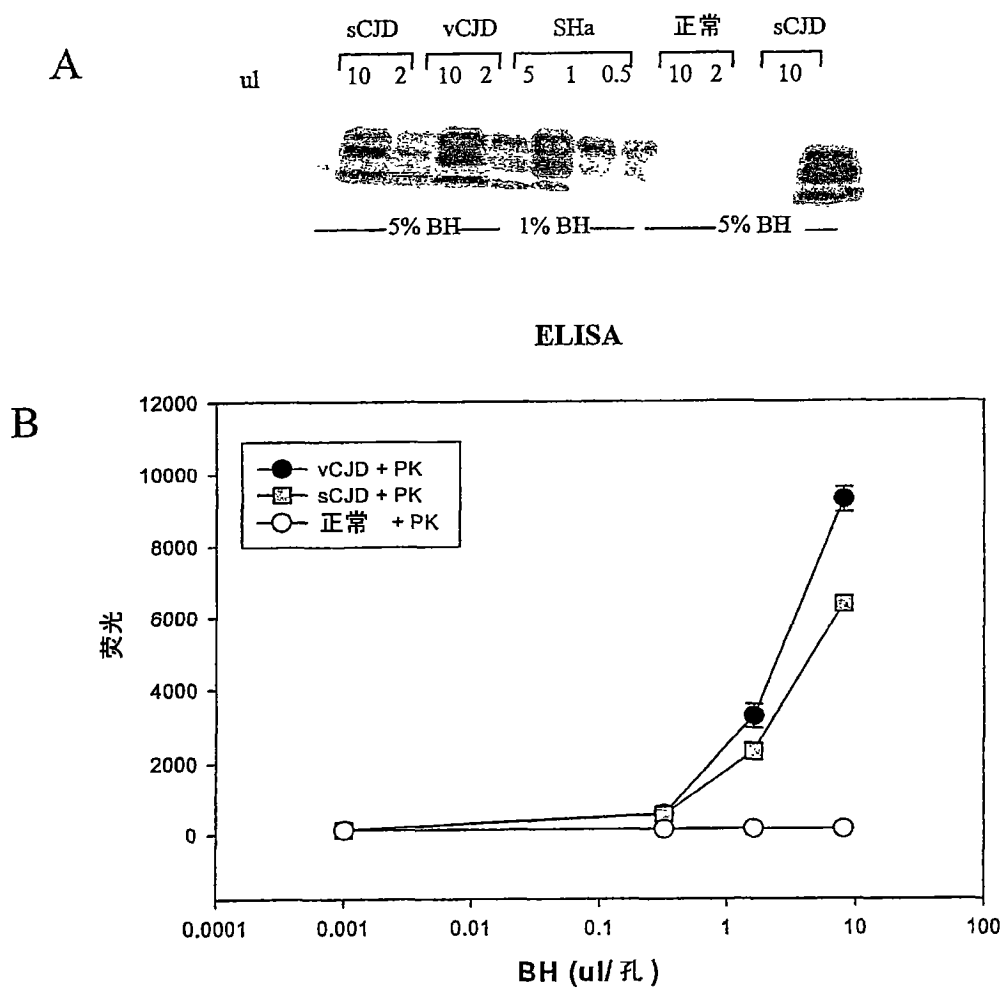
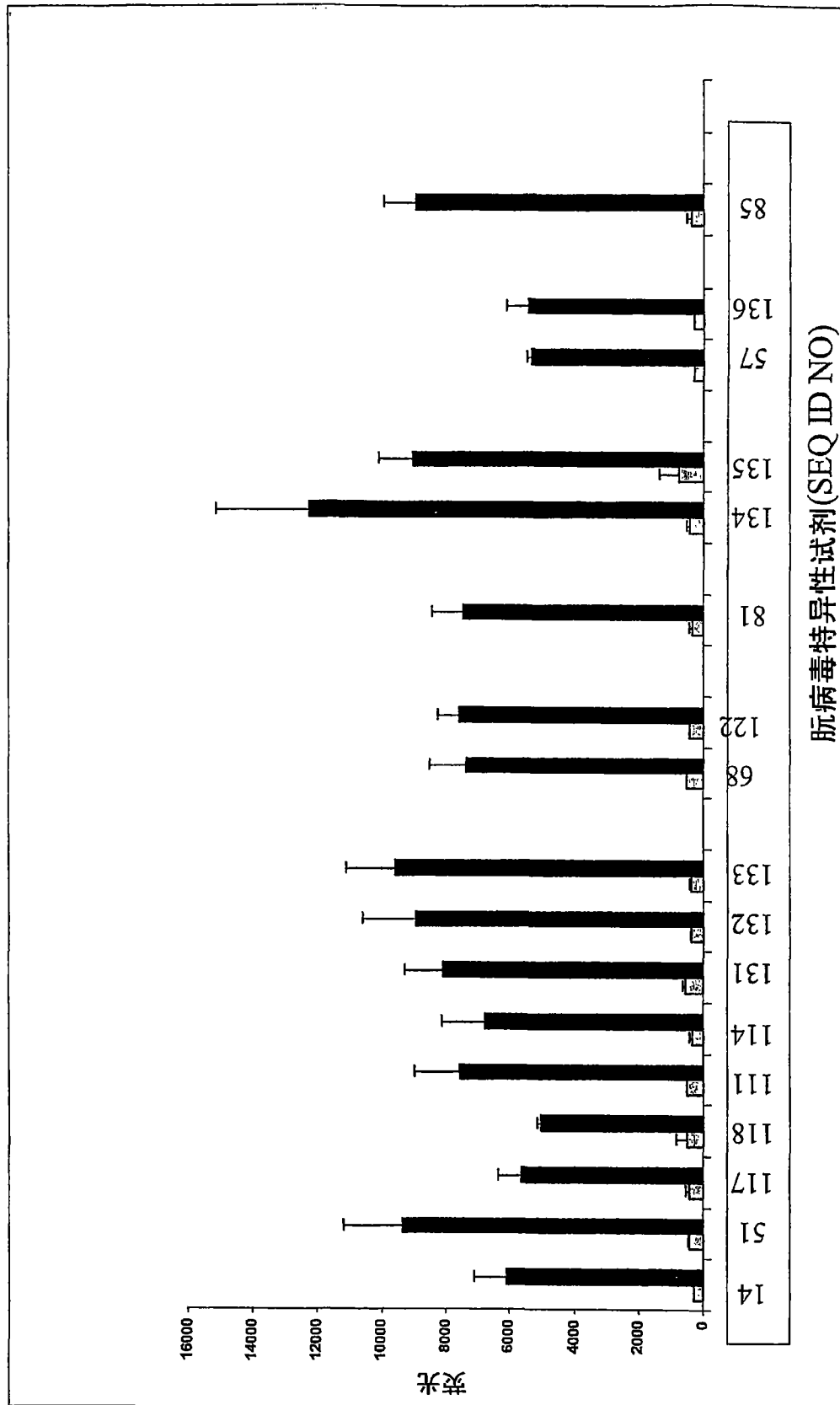


图 12

用不同肽检测人 vCJD 脑匀浆液的PrP^{Sc}



灰柱代表正常人脑
黑柱代表 vCJD 脑

图 13

