

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01809936. X

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1250572C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 39/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.5.15 [21] 申请号 01809936. X

[30] 优先权

[32] 2000. 5.23 [33] EP [31] 00111108.7

[86] 国际申请 PCT/IB2001/001666 2001.5.15

[87] 国际公布 WO2001/090191 英 2001.11.29

[85] 进入国家阶段日期 2002.11.22

[71] 专利权人 斯洛文尼亚输血中心

地址 斯洛文尼亚卢布尔雅那

[72] 发明人 弗拉德卡·丘林-塞尔贝克

审查员 孙大龙

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 7 页

[54] 发明名称

能选择性检测朊病毒 PrP^{Sc} 同型异构体的抗体

[57] 摘要

本发明涉及针对朊病毒 PrP^{Sc} 同型异构体 C 末端部分的新型抗体。具体来说，本发明涉及该类抗体在诊断牛海绵样脑病 (BSE) 及克雅病 (Creutzfeld - Jacob Disease) 新变异形式 (vCJD) 中的应用。另外，本发明涉及该类抗体识别的肽及该肽在免疫接种或 BSE、CJD、vCJD 及其他与 TSE 有关的疾病治疗中的应用。

1. 一种抗体，其只与朊病毒蛋白 PrP^{Sc} 同形异构体结合并识别具有由该朊病毒蛋白 PrP^{Sc} 同形异构体的以下蛋白序列提供的三维构象的表位：

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-,

而不与 PrP^C 形式结合，所述抗体可由包括以下步骤的方法获得：用具有下列氨基酸序列的肽对动物进行免疫接种：

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

或

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-。

2. 如权利要求 1 所述的抗体，该抗体为多克隆或单克隆抗体。
3. 如权利要求 1 至 2 中任一项所述的抗体，该抗体与标记连接。
4. 如权利要求 1 所述的抗体，该抗体由杂交瘤细胞系 CNCM I-2476 产生。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体用于制备药物的用途，所述药物用于诊断牛海绵样脑病或克雅病或克雅病变异形式或 TSE 相关疾病。

6. 一种生产权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体的方法，其包括以下步骤：用一定量的具有下列氨基酸序列的肽对动物进行免疫接种：

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

或

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-,

所述肽通过其 N-末端部分结合在载体蛋白 KLH 上，

7. 用于诊断 BSE 和/或 CJD 和/或 vCJD 或 TSE 相关疾病的试剂盒，其包含权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体。

8. 能产生权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体的杂交瘤细胞系。
9. 如权利要求 8 所述的杂交瘤细胞系，其为 CNCM I-2476。

能选择性检测朊病毒 PrP^{Sc} 同型异构体的抗体

本发明涉及针对朊病毒 PrP^{Sc} 同型异构体 (PrP^{Sc} isoform) C 末端部分的新型抗体。具体来说, 本发明涉及该类抗体在诊断牛海绵样脑病 (BSE)、克雅病新变异形式 (vCJD)、散发性 CJD 及瘙痒症中的应用。

从 1986 年开始, 在英国诊断发现一种慢性变性疾病。感染该病的牛的神经系统出现进行性变性, 其症状为性情发生改变, 如神经质、具有攻击性、姿势异常, 官能共济丧失及起立困难、产奶量减少或尽管食欲不变但体重减轻。感染该病的牛最终死亡。

该疾病被定名为牛海绵样脑病 (BSE), 现广泛称作“疯牛病”。接下来的十年里, 英国确诊了约 160000 例该新识别的牛类疾病, 同时在其他欧洲国家甚至欧洲以外的国家如加拿大、福克兰 (Falkland) 群岛和阿曼苏丹王国亦有动物感染该病的报导。

BSE 与一种可传染性因子相关, 该因子的性质至今仍未完全清楚。该因子感染牛的脑部及脊髓, 病损特征为通过显微镜可见的海绵样改变。该因子极为稳定, 可耐受正常蒸煮温度甚至巴斯德灭菌用高温、常规时间和时间的消毒及冷冻与干燥。

在自然感染 BSE 的牛中, 仅发现其脑部组织、脊髓及视网膜中存有 BSE 因子。进一步的研究确认, 喂食 BSE 感染动物脑组织的牛的远端回肠、骨髓、脊神经节与三叉神经节出现 BSE 感染。

在人类中, 已知有一种类似的变性性综合症, 称为克雅病 (CJD)。CJD 为一种中枢神经系统的慢性变性性人类疾病, 伴有明显的功能障碍、进行性痴呆及脑部空泡变性。CJD 每年以百万分之一的比率在世界范围内散发性地发生。Gerstmann-Straussler 综

合征、库鲁病及致命性家族性失眠症的相关 TSE（可传播性海绵样脑病）病症更为少见。

1996 年，英国海绵样脑病咨询委员会（SEAC）宣布已确诊 10 例 CJD 新变异形式（vCJD）病例。所有的患者均在 1994 或 1995 年发病。然而，报导的 10 个病例与 CJD 的散发形式极为不同。被感染者比典型 CJD 患者要年轻得多。通常，CJD 患者的年龄均超过 63 岁。与此相反，变异 CJD 患者发病的平均年龄约为 28 岁。vCJD 的病程平均为 13 个月，而典型 CJD 病的病程平均仅为 6 个月。在变异病例中，脑部的脑电波（EEG）电活性与典型的散发型 CJD 不同。尽管脑病理学可认定为 CJD，但其模式为朊病毒蛋白斑片大量聚集，与散发型 CJD 不同。

SEAC 的报告显示，所有罹病者在过去的十年里均吃过牛肉或牛肉制品，这表明 vCJD 与 BSE 之间存在因果关系。1997 年发表的两项研究结果确认了 vCJD 极有可能起因于 BSE 因子这一假设。为此，一组研究者分别用 BSE、vCJD 及散发型 CJD 感染了三组近交系小鼠和一组杂交小鼠。当前结果表明，接种了 BSE 的小鼠与接种了 vCJD 患者组织的小鼠在培养时间、临床体征及脑损伤模式方面相同，由此得出如下结论，即 BSE 与 vCJD 具有相同特征（signature）或为同一“菌株”。此外，散发型 CJD 及已知的瘙痒症菌株与 vCJD 或 BSE 无相似性。其他研究者已证实了上述结果，因此目前人们相信 BSE 可以传播给人类，引发 vCJD。

由于公众和科学界对食用感染 BSE 牛的肉制品会将 BSE 传播给人类的担心日盛，人们建议将患有 BSE 的牛杀掉并且其尸体不得进入人类的食物链。然而，鉴于 BSE 通常需五年或更长的时间方能通过染病动物的举止表现出来和目前除检查已屠宰动物的脑部外尚无快速确定牛是否感染 BSE 的方法这一事实，人们建议可采用的唯一安全并亦能平息公众对食用牛肉制品恐惧的方法是大范围屠宰。

不可避免的是，该政策会导致成千上万头未感染 BSE 的牛遭到屠杀。因此，在技术上需要一种快速测定 BSE 的方法。

目前使用的一种测定组织中是否存有 BSE 因子的方法是用相信已感染 BSE 的材料接种动物——通常为小鼠。然而，小鼠接种研究需要的时间长达 700 天，并且在组织中未测出 BSE 既可能表明该因子确实不存在亦可能只表明该方法的灵敏度有限。

BSE 和其他 TSE 如 vCJD 的发病因子比已知的最小病毒还要小，其性质仍未完全确定。有关该因子的性质，目前有三种主要理论：（1）该因子为一种性质特殊的病毒，（2）该因子为一种感染后变成一种部分抗蛋白酶形式的独特的宿主编码蛋白（“朊病毒”），（3）该因子为一种被宿主衍生保护性蛋白包被的非编码调节小核酸。该 BSE 因子对热及正常的消毒方法具有极强的抵抗性。它亦不在宿主动物中引发任何可检测性免疫反应或炎性反应。

前不久，人们发现该发病因子与病毒不同：该因子能以多分子形式存在，而病毒只以单一形式存在，并具有不同的超微结构形态；其次，该因子为非免疫原性，与此相反，病毒总引起免疫反应；再次，没有该传染性颗粒内有基本核酸的证据，而病毒有在子代病毒合成中作为模板的核酸基因组。因此，最终得出这样的结论：朊病毒为变性性疾病的原因，其唯一已知成分为朊病毒，它由个体自身的染色体基因编码。

传染性朊病毒主要由一种名为朊病毒蛋白的“瘙痒症同型异构体”的蛋白构成，缩写为 PrP^{Sc}。很明显，一种尚未定义的翻译后过程从遍在细胞朊病毒蛋白 PrP^C 生成 PrP^{Sc}。PrP^C 与 PrP^{Sc} 均由一单复制染色体基因编码，并且已发现，接种朊病毒会引发正常宿主 PrP^C 多肽生成 PrP^{Sc}。与主要位于细胞表面的正常形式相反，同型异构体以泡囊形式聚集在细胞内。同型异构体在构象结构上亦不同，表现为 β 折叠含量增加，这可能是 PrP^{Sc} 同型异构体与正常形式 PrP^C 相

比蛋白酶抗性增强的原因之一。

目前，尚没有该病的治疗方法或任何预防疫苗。这主要是因为 PrP^{Sc} 同型异构体的免疫原性明显较低，从而阻碍了能专门识别 PrP^{Sc} 同型异构体，同时又避免与“正常”同型异构体 PrP^C 交叉反应的抗体的制造。

此外，亦无在活动物内检测该病的适当检验方法。兽医病理学家可以通过脑组织死后显微镜检查确认 BSE。然而，当检测组织中的 BSE 时，则采用给动物一通常为小鼠接种相信已感染 BSE 的组织的方法。因此，在技术上需要提供一种能够测定神经系统变性性疾病如 BSE、CJD、vCJD 或 TES 相关疾病如瘙痒症及其他疾病发病因子的方法。

因此本发明要解决的问题是提供能让兽医或医师专门检测 BSE、CJD、vCJD 和/或 TSE 相关疾病发病因子的方法。

在导致本发明的广泛研究过程中，本发明人发现 PrP^C 在向 PrP^{Sc} 转变中经历的构象变化之一是 PrP^C C 末端区的三级结构发生改变。

附图中，

图 1 为用抗体 CNCM I-2476 治疗过的散发型 CJD 患者的人脑组织试样图片（放大 10 倍）。

图 2 为用抗体 CNCM I-2476 治疗过的散发型 CJD 患者的人脑组织试样图片（放大 60 倍）。

图 3 为用抗体 CNCM I-2476 治疗过的新变异 CJD 患者的人脑组织试样图片（放大 60 倍）。

图 4 为用抗体 CNCM I-2476 治疗过的新变异 CJD 患者的人脑组织试样图片（放大 20 倍）。

图 5 为用抗体 CNCM I-2476 治疗过的呈现 BSE 体征的动物牛脑组织试样图片（放大 20 倍）。

图 6 为用抗体 CNCM I-2476 治疗过的患瘙痒症山羊的脑组织试

该抗体可为多克隆或单克隆，而由于交叉反应的原因，优选为单克隆抗体。此外，抗体的片段亦在本发明抗体的含义内，尤其是那些结合在靶上的片段，如 F_{ab} 区或其部分。依据各自的需要，本领域技术人员将能设计相应的片段。

术语抗体亦包含嵌合抗体，如人源化抗体，其中不变区来自人源，可变区来自动物源如小鼠，以便降低被治疗个体对该因子的反应。本发明中亦考虑了双特异性抗体。双特异性抗体为免疫球蛋白或其片段，其中两个 F_{ab} 片段分别针对不同的靶。因此，一个 F_{ab} 片段将针对 PrP^{Sc} 的 C 末端部分，而另一个 F_{ab} 片段可以针对任何靶，如在一种测定中使用的靶。

该抗体可以与在靶的检测中常用的标记相连，如放射性标记、荧光标记或染料。根据优选的实施方案，抗体为由杂交瘤细胞系 CNCM I-2476 生成的抗体，按照布达佩斯条约，于 2000 年 5 月 10 日保藏于法国巴黎巴斯德研究所。

上述抗体可用于诊断和/或治疗牛海绵样脑病或克雅病或其变异形式或哺乳动物，如有蹄类或人类中与 TSE 相关的疾病，因为该抗体选择性地结合在 PrP^{Sc} 同形异构体上。本抗体能用于不同的种群如人类、牛、羊等是本抗体的一个新颖和具有诱惑力的特点，它简化了检测方法，使研究各种个体只需一种抗体。

为确定个体是否感染了相应的疾病，从要检查的个体中采集一份试样如组织（匀浆或切片）或体液例如血液、唾液、尿液或脑脊液，尔后在合适的条件下使试样与抗体接触，检查是否存在 PrP^{Sc} 同形异构体。

试样与抗体接触的方法不受任何特别的限制，只取决于可利用的手段及试样本身。因此，本抗体可在以下方法中使用，如酶联免疫吸附测定（ELISA）、斑点印迹、蛋白质印迹、免疫组织化学方法及其他方法，本领域技术人员对这些方法都非常了解。

为了快速检测个体是否感染了与朊病毒有关的疾病，本发明亦提供了一种试剂盒，其中至少包含一种本发明的抗体。另外，该试剂盒亦包含适用于进行相应测定的缓冲剂、支持材料与标记试剂。

此外，通过将有效量的本发明抗体，任选地与适当的赋形剂及载体一起给予受感染个体，本发明还可用于治疗与朊病毒有关的疾病。因此，本发明亦包含一种至少含有一种本发明抗体的药物组合物。

并且，本发明亦提供了一种使个体对 PrP^{Sc} 同形异构体免疫的方法。在这一方面，与正常形式 (PrP^C) 不同的 C 末端部分的肽可用于引发个体中的免疫反应，该肽优选从朊病毒序列氨基酸 190 至 215 或其一部分衍生，更优选从多肽的约 202 至约 214 的序列或其一部分或在基本保留 PrP^{Sc} 同形异构体表现出的所述区域构象特征的前提下通过取代或缺失一个或多个氨基酸获得的变体衍生。根据最优的实施方案，氨基酸序列为

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-
或

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr

另外，该抗体本身亦可用来生成抗独特型抗体，用于免疫接种。应了解，本领域技术人员将选择合适的加强免疫步骤时间间隔，如有必要，还将选择恰当的佐剂来进行免疫接种。

本抗体还可用于生成抗独特型抗体，即针对本发明抗体的结合区的抗体。该抗独特型抗体代表本发明抗体的镜像，可用来预防和治疗上述疾病。因此，抗独特型抗体亦在本发明的范围之内，可按照本领域中熟知的方法制成，即用例如本发明抗体的高变区对动物进行免疫接种，生成抵抗它的多克隆或单克隆抗体。下一步，将根据本抗体与所述抗独特型抗体的结合对获得的抗体进行选择。

获得本发明抗体的方法包含的步骤为：用免疫量的含有朊病毒

多肽 C 末端部分氨基酸的肽对动物如小鼠或兔进行免疫接种，优选具有下列序列的肽：

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

更优选地，将通过用 Glu 替代朊病毒多肽的位置 207 的 Gln 残基而从上述序列衍生出的具有下列氨基酸序列的肽用于免疫接种步骤中：

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

已惊奇地证明，该序列能引发免疫反应，其强度足以能够容易地产生抗 PrP^{Sc} 的特异性抗体。在不依附于任何理论的情况下，从该肽得出的这一惊人结果的道理可能在于：天然 Gln 残基可以形成氢键，由此造成肽的不溶性；这种情况在作为抗原表位的一部分时是不希望有的。另一方面，人 PrP 序列中的 Glu（Gln 位于牛 PrP 一级结构中的相同位置）似乎不形成这样的键。

在免疫接种步骤中使用上述任意一种肽具有无需像使用整个朊病毒多肽时事先准备击昏（knock out）小鼠的优势。免疫接种时优选使用该肽和载体的缀合物，其中该肽通过其 N 末端连接于载体。可看出，与通过 C 末端将该肽与载体结合相比，该方法提供明显更好的免疫反应。

用抗原接种动物后，采用本领域熟知的方法和技术将脾细胞分离并与骨髓瘤细胞融合。使用合适的培养基选择融合细胞，该培养基不支持未融合细胞的生长，如 HAT 培养基。对选择培养基中生长的融合杂交瘤细胞进行筛选，用于生成能与免疫接种步骤中使用的肽相结合的抗体。

本发明亦涉及能生成本发明抗体并且按上述方法可以获得的杂交瘤细胞系。我们发现获得的细胞系生长非常迅速，倍增时间周期约为 8 小时。另外还发现，抗体的分泌与正常杂交瘤抗体分泌相比也非常高。根据优选的实施方案，该杂交瘤为 CNCM I-2476，并已

按照布达佩斯条约于 2000 年 5 月 10 日保藏于法国巴黎巴斯德研究院。

本发明另一实施方案涉及如下列氨基酸序列所示的肽序列：

Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr

或

Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr

或在基本保留三维结构的前提下通过取代或缺失一个或多个氨基酸而从上述序列中衍生出的肽。

这些肽明显地提供了一种 PrP^{Sc} 而非 PrP^C 同形异构体独有的三维构象。因此，如上所述，该肽也可以用于人或动物的免疫接种，使接种个体能产生对朊病毒多肽“错折叠形式”的免疫反应并以自然的方式将其从体内消除。另外，所述多肽亦可以用于生产治疗上述朊病毒相关疾病的药物。

下列实施例说明本发明，但本发明不仅限于这些实施例。

实施例 1

一种合成肽的制备

人 PrP(人朊病毒蛋白)一级结构的 13-氨基酸长的肽被选择用于免疫接种。该肽的位置靠近朊病毒蛋白的 C 末端部分，从氨基酸 202 至 214。通过用 Glu 残基取代位置 207 上的 Gln 残基来修饰该肽，得出下列氨基酸序列

H-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-OH

该肽通过其 N 末端部分结合在载体蛋白 KLH—钥孔血蓝蛋白上，这体现了一种将潜在免疫原性肽与载体连接的新特征，因为肽通常通过 C 末端连接于载体。

实施例 2

动物免疫接种

用 KLH-肽缀合物（按照实施例 1 制备）对 BALB/ c 小鼠进行免疫接种，剂量为每只小鼠 0.2 mg，采用弗氏完全佐剂（CFA）（200 μ l/小鼠）皮下用药。14 天后，用弗氏不完全佐剂（IFA）再次小鼠接种 KLH-肽，剂量为每只小鼠 0.1 mg，腹膜内给药（200 μ l/小鼠）。两周后，再一次用 Freund 氏不完全佐剂以腹膜内给药的方式给小鼠接种 KLH-肽，剂量为每只小鼠 0.2 mg。最后一次接种 10 天后，从小鼠尾静脉中取血，用间接酶联免疫吸附测定法（ELISA）测定是否存在抗缀合物抗体。平板被 KLH、KLH-肽及游离肽所覆盖。用与 HPR 缀合的山羊抗小鼠抗体检测小鼠抗体的结合。令人吃惊的是，所有小鼠的免疫反应均非常强。

用生理溶液进行最后一次静脉加强注射（100 μ l 中 0.1 mg/小鼠）

实施例 3

杂交瘤生成

加强注射后第 4 天，将小鼠杀死并取出它们的脾。分离出脾细胞并根据标准技术（Liddel, J.E., Cryer, A., 《单克隆抗体实用指南》"A practical guide to monoclonal antibodies". John Wiley & Sonis, New York, 1991）使用 50%的 PEG 将其与小鼠骨髓瘤细胞 NS1 融合（比率为 10: 4），时间为 3 分钟。洗涤细胞，然后将其重新悬浮在 96-孔微量滴定板的 DMEM(Flow, UK)中，补充加入 13% FCS(HyClone, USA)（下文中仅称作 DMEM）和小鼠胸腺细胞饲养层。第二天，将 HAT DMEM 加入所有孔中。10-14 天后，用间接 ELISA 法检验上清液中是否存在特异性抗体。为此，在 4 $^{\circ}$ C 下，微量滴定板在 50 mM pH 值为 9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲剂中被 5 μ g/ml 的肽或 KLH-肽缀合物或单独的 KLH(Bachem, Switzerland)覆盖一夜。用 PBS/吐温 20 (Sigma, USA) 将平板洗涤三次，用 1%的 BSA (Sigma, USA) 将

其封闭 30 分钟。上清液用 PBS/吐温 20 洗涤后加入孔中，在 37℃ 下培育 2 小时。将平板用 PBS/吐温 20 洗涤三次，将与 HRP (Sigma, USA) 的山羊抗小鼠免疫球蛋白加入孔中，用 1% 的 BSA 稀释成 1:5000。将平板在 37℃ 下培育 2 小时后，用 PBS/吐温 20 洗涤，将底物加入孔中 (ABTS/H₂O₂; Sigma, USA)。在 410 nm 对平板进行读数。所有的容积均为 50 μl。

将杂交瘤从阳性孔移至装有 HT DMEM 培养基的更大容器 (24-孔板) 中。用间接 ELISA 法再次检测是否存在特异性抗体，将选定的细胞系移至装有 DMEM 的组织培养瓶中。最后，用极限稀释法将选定的杂交瘤克隆两次并在液氮中冷冻。

选定的细胞系在 DMEM 中生长极为迅速，即，在无需 HT 的情况下，其倍增时间周期约为 8 小时。还发现抗体的分泌亦极高。获得的克隆之一被交与巴斯德研究院保藏，保藏号为 CNCM I-2476。

实施例 4

抗体检验

用保存的克隆的上清液检验单克隆抗体与 PrP 的反应性。通过免疫组织化学对 CJD 患者、vCJD 患者的脑组织及 BSE 阳性牛脑和感染瘙痒症的羊脑进行单克隆抗体检验。作为对照，使用正常人、牛与羊脑。亦用蛋白质印迹与斑点印迹进行了筛选。

免疫组织化学试样制备：

按照标准技术 (机器: Ventana) 制备来自不同来源 (人、牛与羊) 的脑组织石蜡切片，获得的切片厚度为 6-8 μm。用 HCOOH 对试样进行处理 (图 1、5、6) 或根本不作预处理 (图 2-4)。随后，用美国 Ventata 提供的试剂盒封闭内源性过氧化物酶，加入浓度为 4 μg/ml 的抗体，用 Dako S2022 (Dako, USA) 稀释，然后在 42℃ 下

培育 20 分钟。

随后，加入生物素化的山羊抗-小鼠+兔（Ventana, USA），并在 42℃ 下培育 20 分钟，接下来和链霉抗生物素 HRP（Ventana）一起在 42℃ 下培育 20 分钟，和含有 Cu 的 DAB（二氨基联苯胺）一起培育 4 分钟。

结果：

免疫组织化学反应模式表明，mAb CNCM I-2476 与不同物种（人、牛、羊）的所有已知 TSE 形式反应，且只与病态蛋白反应。对健康个体和阿尔茨海默病患者的脑组织无反应。

脑匀浆制备：

在 pH 值为 7.5 的 10% 的蔗糖、20 mM HEPES 及 2% 的十二烷基肌氨酸钠和 5 mM EDTA 中用匀浆仪（Potter）将脑组织匀化（丘脑或髓质或脊髓）（5 倍，1 ml 中 0.1g）。在 +4℃ 下以 14000rpm 转速将匀浆离心 45 分钟。将上清液在 -20℃ 下冷冻，而将小颗粒溶解在 1 M NaOH 中。通过测量 280 和 260 nm 的吸光率来测定试样中的蛋白浓度。

斑点印迹：

将稀释 10 倍的上清液或小颗粒作为试样。它们或直接使用或用蛋白酶 K（10 μg/ml 和 100 μg/ml）消化。用 25mM Tris、0.32 M 甘氨酸、0.16% 的 SDS（w/v）（pH 为 8.3）在 Bio Rad 池中进行电泳。用 25mM Tris、192 mM 甘氨酸、20% 的甲醇（v/v）（pH 为 8.3）在 0.2 mm PVDF 膜上进行迁移。在 100 V 条件下进行转移，时间为 50 分钟。然后，用 5% 的乳状液对膜进行封闭，并在 1% 的乳状液中和单克隆抗体（对于 CNCM I-2476，用量为 40 μg/ml）一起培育 1-2 小时（轻轻振摇）。对膜进行洗涤后，将膜和与 HRP（山羊抗-小鼠，

Sigma, USA) 缀合并并在 1% 的乳状液中稀释为 1: 5000 的二次抗体一起培育 (1-2 小时, 轻轻振摇)。对膜进行洗涤, 用化学发光试剂盒 (ECL, Amersham, USA) 检测免疫反应。

结果:

正常脑试样未与抗体 V5B2 (CNCM I-2476) 发生反应。作为阳性对照, 使用了 KLH-肽。

本发明提供的单克隆抗体对 PrP^{Sc} 具有高特异性。为了进行识别, 在筛选方法之前无需使用蛋白酶 K 对 PrP^C 进行消化。在相同条件下, 正常脑组织与 mAb 间不发生反应, 这表明产生的抗体的特异性极强, 唯一识别 PrP^{Sc}。

 序列表

<110> 斯洛文尼亚输血中心

<120> 能选择性检测朊病毒 PrP^{sc}同型异构体的抗体

<130> 80242

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu
 1 5 10 15

Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln
 20 25 30

Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser
 35 40

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr
 1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

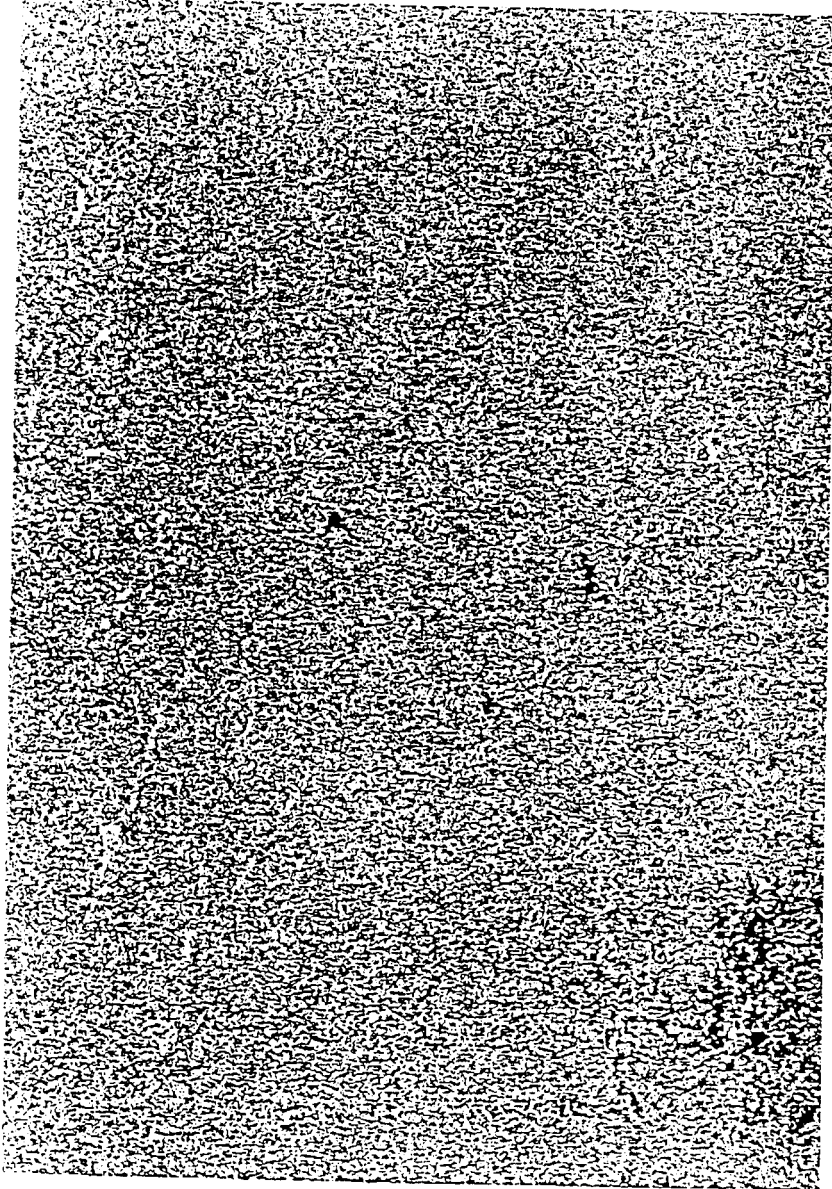


图 1

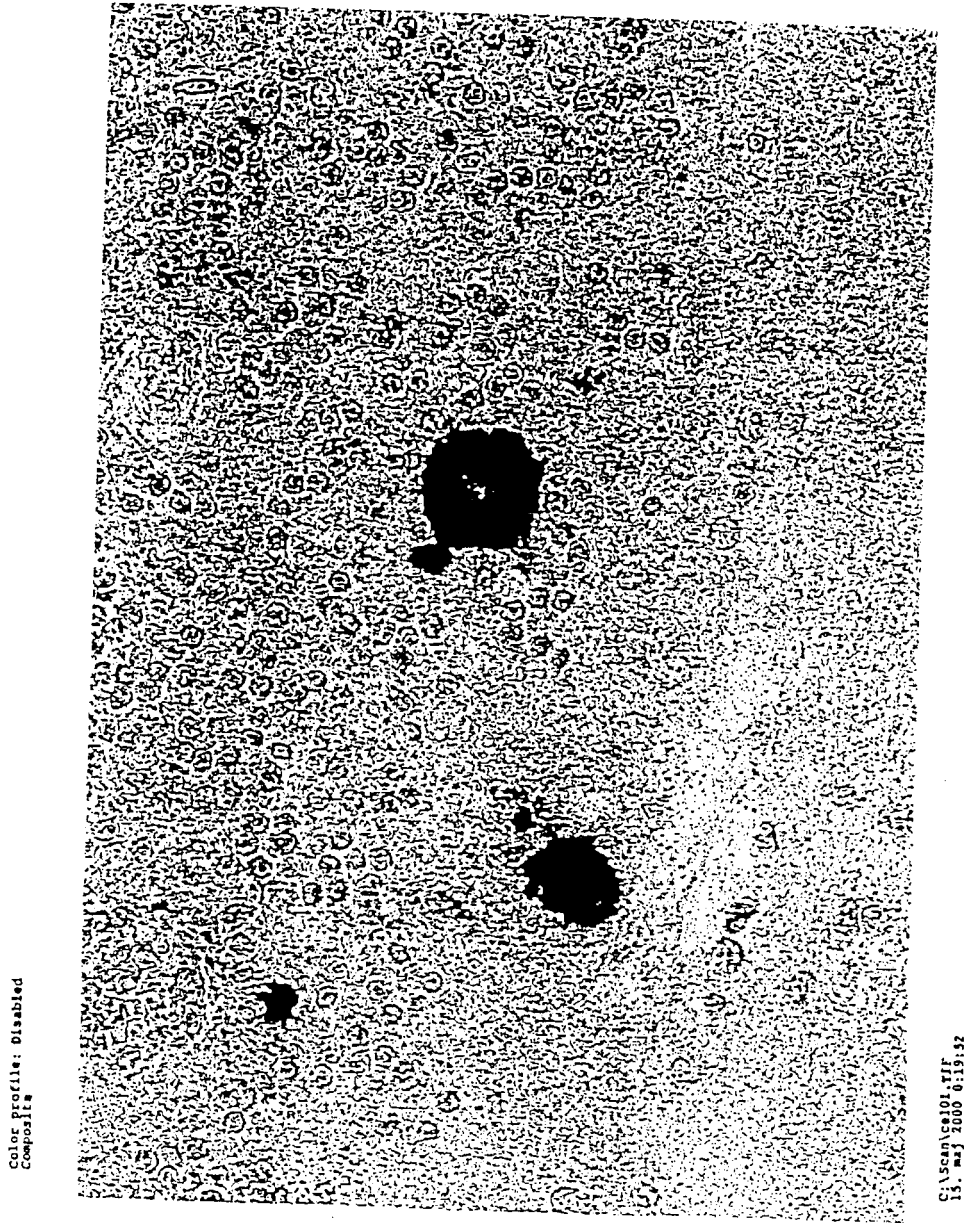


图 2

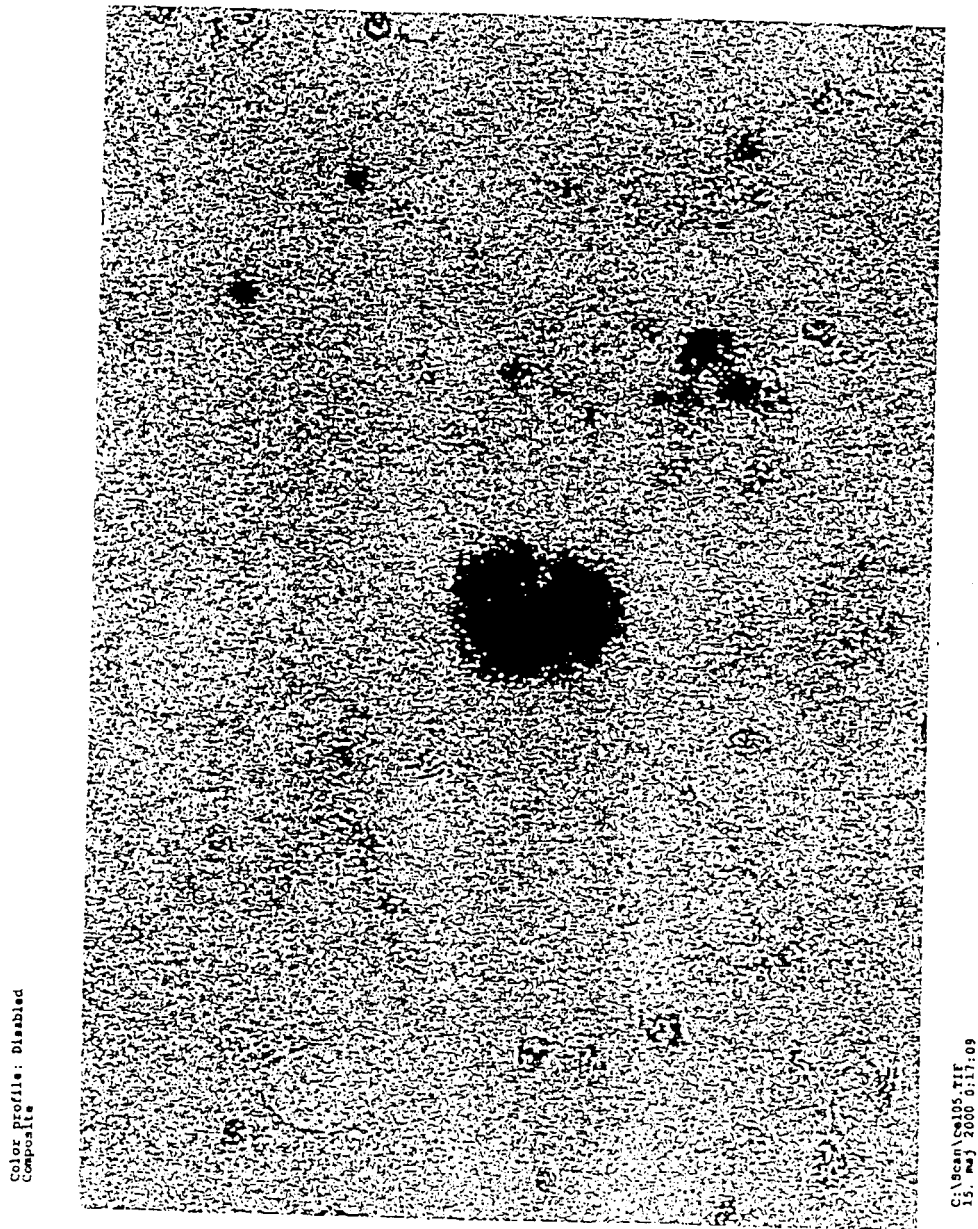


图 3

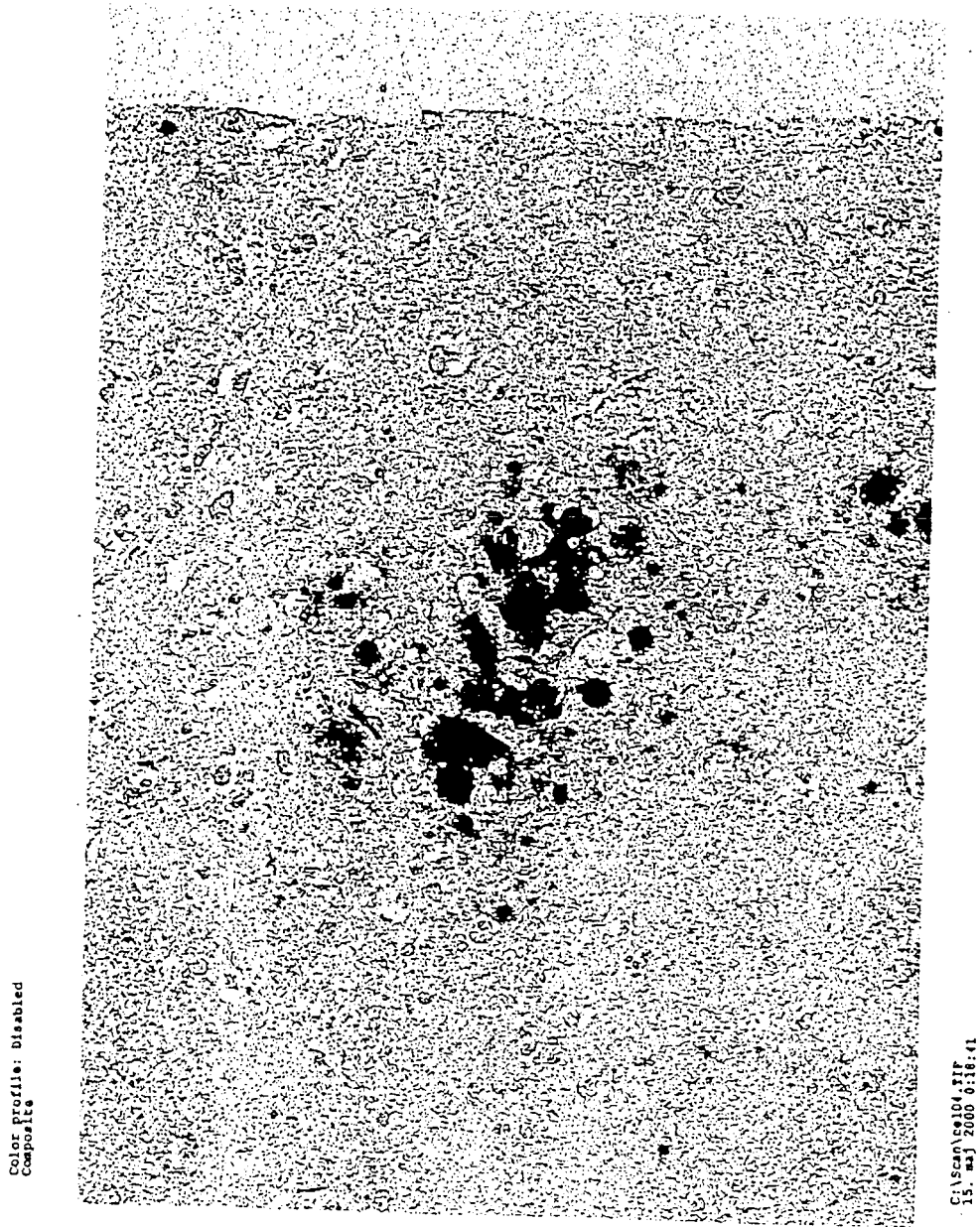


图 4

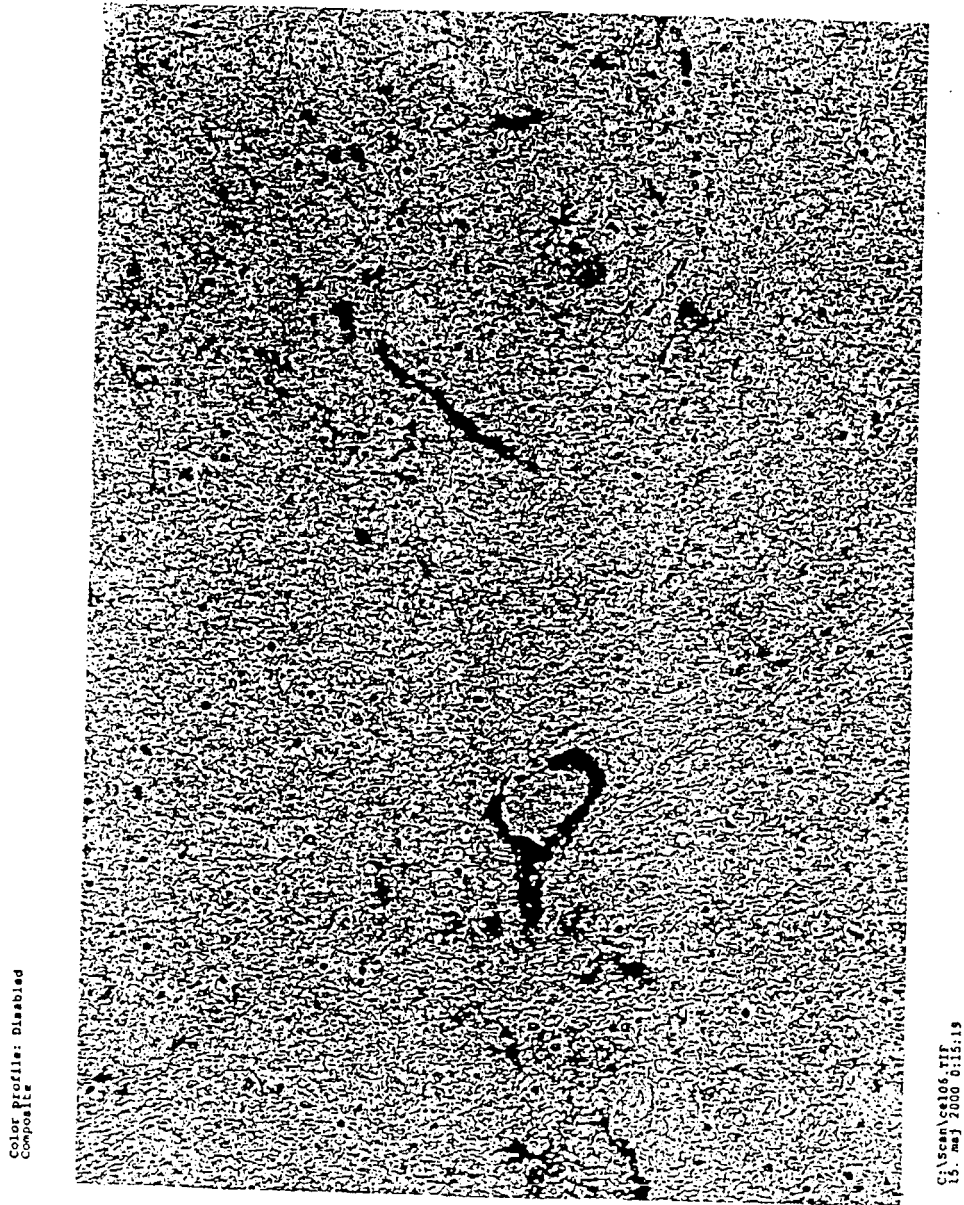


图 5



图 6

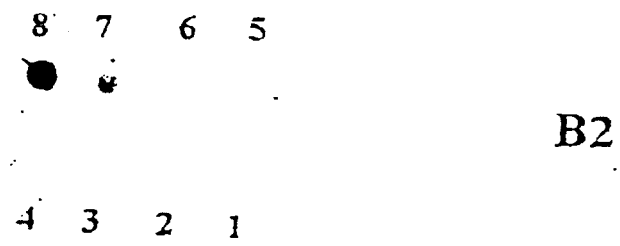


图 7

专利名称(译)	能选择性检测朊病毒PrPsc同型异构体的抗体		
公开(公告)号	CN1250572C	公开(公告)日	2006-04-12
申请号	CN01809936.X	申请日	2001-05-15
发明人	弗拉德卡·丘林-塞尔贝克		
IPC分类号	C07K16/18 A61K39/395 G01N33/569 C12N5/20 C07K16/42 C07K14/47 A61K39/00 G01N33/53 A61P25/28 C07K7/08 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K39/00 C07K16/18 A61P25/28		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2000111108 2000-05-23 EP		
其他公开文献	CN1441811A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及针对朊病毒PrPsc同型异构体C末端部分的新型抗体。具体来说，本发明涉及该类抗体在诊断牛海绵样脑病(BSE)及克雅病(Creutzfeld-Jacob Disease)新变异形式(vCJD)中的应用。另外，本发明涉及该类抗体识别的肽及该肽在免疫接种或BSE、CJD、vCJD及其他与TSE有关的疾病治疗中的应用。

