



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1804628 B

(45) 授权公告日 2012.03.14

(21) 申请号 200510106486.8

(22) 申请日 2005.09.30

(30) 优先权数据

60/614533 2004.09.30 US

(73) 专利权人 奥索临床诊断有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 J·郑

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 张轶东 王景朝

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

C07K 5/06(2006.01)

C07K 5/08(2006.01)

C07K 5/10(2006.01)

C07K 7/06(2006.01)

(56) 对比文件

US 5109464 A, 1991.05.28, 全文.

Yoshida 等. Identification of a heparin

binding site and the biological activities of laminin al chain carboxy-terminal globular domain. Journal of Cellular Physiology. 1999, 179(1), 18-28.

审查员 杨冀川

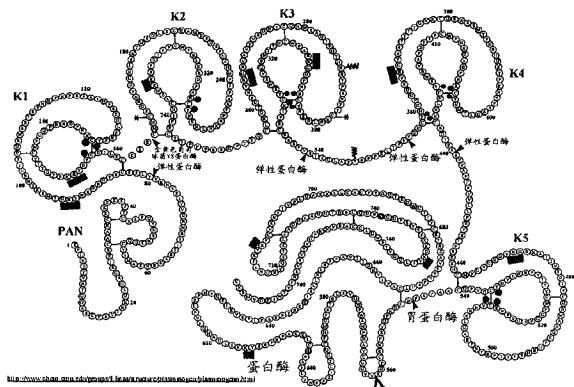
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 3 页

(54) 发明名称

用于区别朊病毒的肽

(57) 摘要

本发明提供了用于在人和动物中检测朊病毒病的肽,也描述了用于确定朊病毒病的组合物和试剂盒。



1. 含有选自下组的氨基酸序列的肽：

(肽一)WQPPRARIG-K;(肽二)NWCKRGRKNCKTH;(肽三)NYKKPKLG;(肽五)YRGYRGYRGYRG-K;(肽六)YRGYGYKGYGYRG-K;(肽七)AQKKGKKRKRSRKESYSIYV-GGK;(肽八)ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA-GGK;(肽九)SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRLR-GSGSK;(肽十)TIADRYRETAR。

2. 一种体外检测 PrP<sup>Sc</sup> 的方法,包括：

首先将样品与权利要求 1 请求保护的肽接触,  
然后检测 PrP<sup>Sc</sup>。

3. 一种体外检测 PrP<sup>Sc</sup> 的免疫测定,包括：

提供在其上结合有来自权利要求 1 的肽的固体支持物,  
将该固体支持物与样品接触,  
洗涤该支持物以除去任何未结合的样品,  
将该固体支持物与朊病毒特异性抗体接触,和  
进行检测步骤以确定 PrP<sup>Sc</sup> 是否结合于该固体支持物。

4. 一种检测 PrP<sup>Sc</sup> 的试剂盒,包括

一种在其上结合有权利要求 1 的肽的固体支持物,和  
一种标记的朊病毒特异性抗体。

## 用于区别朊病毒的肽

### [0001] I. 背景

[0002] 朊病毒病或传染性海绵状脑病 (TSE) 已经赢得了科学界的关注, 不仅是因为它们向关于传染物特性的传统理念发起了挑战, 还因为它们对食品和血液安全造成潜在的严重公共健康威胁。此外, 近年来一种新的变体疾病形式 vCJD 的流行性发生更加强调了疾病在动物与人之间传播的可能性。本发明描述了合成肽用于诊断动物和人中的传染性海绵状脑病 (TSE) 的用途。

### [0003] 朊病毒——引起 TSE 的病原体

[0004] 传染性海绵状脑病 (TSE) 包括一组对人和动物都有影响的快速发展的神经变性致命疾病。TSE 具有包括破坏性痴呆、包括肌阵挛的锥体的和锥体外系的病征、多病灶海绵状变化、星形神经胶质增生 (astrogliosis)、淀粉样蛋白斑、神经元丢失、无炎症反应在内的临床和神经病理学特征, 并且其特征通常是具有长潜伏期。

[0005] 有人提出, TSE 病可能是由“慢病毒”或类病毒引起的 (Gajdusek1977)。然而, 瘙痒病传染力对辐射、核酸酶以及破坏遗传材料的其它试剂的极端抗性却与“病毒”理论相矛盾。TSE 传染物的所有这些“异常”特征使 Dr. Stanley Prusiner 于 1982 年提出了“朊病毒”这一概念 (Prusiner1982)。朊病毒 (PrP), 其表示无核酸的蛋白感染颗粒, 是一种存在于人及动物中的糖蛋白。该蛋白的细胞形式 (PrP<sup>C</sup>) 具有两个 N-连接糖基化位点以及在 C-末端具有一个 GPI 锚。已经在神经元中最普遍地发现了该蛋白, 而且, 在非常低的程度上, 也已经在其它比如白细胞、单核细胞和血小板这样的细胞中发现了该蛋白 (Holada2000)。朊病毒蛋白的传染性瘙痒病形式 (PrP<sup>Sc</sup>) 是其细胞前体的蛋白酶抗性同工型, 且主要发现于脑中。在 vCJD 患者的扁桃体、脾脏和淋巴结中也已发现了更低水平的 PrP<sup>Sc</sup> (Parizek2001)。由于 Prusiner 的“朊病毒”是瘙痒病、并扩展至所有 TSE 病的传染物这一理念, 使得出现了通常被称作朊病毒病、用于描述一类被认为与该蛋白有关的病理学的概念。

[0006] 人朊病毒病已知为克-雅 (Creutzfeldt-Jakob) 病 (CJD), 通常影响老年人。根据疾病的表型, 大多数 CJD 为散发性 (sCJD) 的, 而约 10% 为家族性 CJD (fCJD)。只有在最近, 才在年轻的成年人中出现了一种新的 CJD 变体 (vCJD)。自 1995 年以来, 已经报道了超过 100 个病例。朊病毒病影响多种家畜及野生动物物种, 常对其表现形式给予独特的命名, 例如, 绵羊和山羊的瘙痒病 (McGowan1922)、鹿科动物的慢性消耗性疾病 (CWD, Williams1980) 和牛的牛海绵状脑病 (BSE, 或“疯牛”病, Wells1987)。

### [0007] PrP<sup>C</sup> 和 PrP<sup>Sc</sup> 的特征

[0008] 根据 Prusiner 的“只有蛋白 (protein only)”假说, 导致朊病毒病的传染性病原体是一种蛋白。朊病毒的主要成分似乎是异常折叠的 PrP, 称作 PrP<sup>Sc</sup> (疾病特异性, “瘙痒病”同工型)。据信, PrP<sup>Sc</sup> 是从其正常的对应体 PrP<sup>C</sup> 通过构象变化形成的 (Cohen, 1998)。尽管关于转变机制仍然是模糊不清的, 但是仍被普遍接受的是: 在 PrP<sup>Sc</sup> 存在下, 作为底物起作用的正常 PrP<sup>C</sup> 发生构象结构变化, 并通过一个自我催化过程成为 PrP<sup>Sc</sup>, 导致 PrP<sup>Sc</sup> 聚集和淀粉样棒的形成, 从而导致细胞死亡 (Hope1986, Horwich1997)。根据圆二色性和红外光谱学显示的包括蛋白中的  $\beta$  折叠结构在量上的显著提高、以及  $\alpha$  螺旋可能在量上的略

微减少的关键构象变化最为支持从 PrP<sup>C</sup> 到 PrP<sup>Sc</sup> 的结构变化 (Pan1993, Caughey1991). 从 PrP<sup>C</sup> 到 PrP<sup>Sc</sup> 的转变效率似乎依赖于两种 PrP 构象异构体间的序列同源性程度. 由于这一独特的机制, 朊病毒病易于在相同物种内传播, 并且当 PrP 序列同源性足够时, 在物种间传播 (Raymond, 2000). 因此, 如果正确的话, 这一假设的朊病毒病传播机制将可能通过这些脑病在动物与人之间的传播而提供引发流行病的潜力.

[0009] 蛋白酶抗性是另一个使 PrP<sup>Sc</sup> 区别于 PrP<sup>C</sup> 的特征. 在培养的细胞和脑或来自许多 GSS 患者的样品中, PrP<sup>Sc</sup> 较其细胞前体 PrP<sup>C</sup> 要小. 即使细胞朊病毒和瘙痒病朊病毒是同一 PRNP 基因组产物的两种同工型, PrP<sup>C</sup> 也可以被蛋白酶 K 处理完全降解, 而 PrP<sup>Sc</sup> 只发生有限的消化. 该消化产生一种称作 PrP27-30 的蛋白形式, 其中已经除去了 N- 末端. PrP27-30 已被假定为以 PrP<sup>C</sup> 为宿主的 PrP<sup>Sc</sup> 复制所需的 PrP<sup>Sc</sup> 核心. 经蛋白酶处理的朊病毒分子, PrP27-30 或 PrP<sup>res</sup>, 与瘙痒病传染性密切相关 (Gabizon1988), 这也为 PrP<sup>Sc</sup> 是一种传染性蛋白提供了又一证明.

[0010] 另一特征, 它可能与  $\beta$  折叠结构的显著增加以及相伴随的蛋白酶抗性有关, 是所观察到的 PrP<sup>Sc</sup> 与 PrP<sup>C</sup> 间的溶解性差异. 尽管 PrP<sup>C</sup> 是一种可溶性蛋白, 但 PrP<sup>Sc</sup> 同工型是高度不可溶的. 此外, 还发现 PrP<sup>C</sup> 是经由锚定于膜中的 GPI 尾部而附着于神经元表面的 (Shyng1994), 但是却在被感染细胞的细胞质中发现了 PrP<sup>res</sup> (Taraboulos1990), 它很可能与晚期内体和溶酶体腔结合 (Arnold1995), 而且 PrP<sup>Sc</sup> 还位于来自感染脑的富集级分的无定形聚集体中 (Meyer1986).

[0011] 存在表明瘙痒病传染性与 PrP27-30 间的紧密关联的增多的证据. 甚至在最纯的样品中, 估计的 PrP 分子与传染性单位的比率也是  $\sim 10^4$  至  $10^5$  (Horwich1997, Bolton2001). 在如此低的传染性水平下, 传染性可能需要其它成分、辅因子或共价修饰. 对表达嵌合人-小鼠 PrP<sup>C</sup> 的小鼠易感性的转基因研究暗示, 除 PrP<sup>C</sup> 之外存在至少一种可能作为 PrP<sup>Sc</sup> 形成中的分子伴侣起作用的宿主因子, 暂时称作因子 X (Telling1995).

[0012] 朊病毒病的传染力和传播性

[0013] 朊病毒病是可传播的. 动物朊病毒病的传播性已经通过给健康动物接种感染动物的脑匀浆物实验性地建立了很久了, 比如将瘙痒病从绵羊接种给绵羊 (Cuill e1936) 和跨物种接种给山羊 (Pattison1957), 将库鲁症和 CJD 从人接种给黑猩猩 (Gajdusek1966, Gibbs1968). 重要突破是瘙痒病向小鼠的成功传播 (Chandler1961), 这通过提供一种实验模型大大促进了 TSE 研究. 近来的牛 BSE 和人中的 CJD 新变体 (vCJD) 的产生, 对于 BSE 而言被认为是由于食物接触了用于动物饲料的瘙痒病绵羊畜体混合物的结果 (Brown1997), 对于 vCJD 而言是由于食物接触了来自感染有 BSE 的牛的牛肉的结果 (Bruce1997). vCJD 与 BSE 间的关联还得到从与人最接近的模型 BSE- 适应的猕猴、以及从用引起 BSE 和 vCJD 的试剂接种的近交小鼠的研究获得的神经病理学证据的支持 (Lasm ezas1996). 对北美的黑尾鹿和驼鹿中的 CWD 的流行性扩张尤其关注的是, CWD 是否象 BSE 一样可以传染给可能通过打猎或处理及食用感染的肉而接触该疾病的人类. 朊病毒病在人类中的悲剧性无意识传播已经有文件证明, 比如通过食用已故同类的脑组织而引起的库鲁症流行, 以及通过使用激素、组织移植、以及污染的医疗器械而产生的医源性 CJD 传播.

[0014] 没有有力的证据表明任一种 CJD 病与可能具有交叉物种屏障的动物 TSE 有关. 库鲁症的流行已经为获得性人朊病毒病提供了最大的证据. 尽管没有 vCJD 患者已经被文

献记载为人-至-人传播的牺牲者,但是 BSE 与 vCJD 间的紧密关联仍旧吸引了相当的关注。对人感染的关注是基于这一观察的:PrP<sup>Sc</sup> 易于在 BSE 和 vCJD 的淋巴网状组织而不是在经典的 CJD 中检测到 (Hill1997),之后得到这一推测:从绵羊传递给牛的瘙痒病病原体已经改变了宿主范围并且变得更适应于人类。对于这样的行为的实验先例是熟知的:小鼠适应型瘙痒病品系经由仓鼠的传递改变了它们重新传递给小鼠的传播性 (Kimberlin1987, Kimberlin1989);人类的库鲁病或 CJD 品系直到传递给灵长类或猫才会传播给雪貂或山羊 (Gibbs1979);和牛 BSE 品系直到通过小鼠传递才会传播给仓鼠 (Foster1994)。作为选择,如果 BSE 源自牛中的一个自发突变,那么对这一新的传染性海绵状脑病 (TSE) 品系的物种易感性实验研究未曾得到足以预测到人不是易感的这样的发展。

[0015] 对人类 CJD 和 vCJD 病的研究表明,基因组易感性可能仍然是另一个可以影响 TSE 在人类中传播的因素。发现大多数散发性 CJD 患者对于第 129 位密码子的 Met/Met 或 Val/Val 是纯合的 (Belay1999)。无论如何,所有报道的 vCJD 病例都已经发现是 Met/Met 纯合的。

[0016] vCJD 流行的大小和持续期仍然是不确定的。根据所做的假设和所使用的模型计算,提出了不同的预测。对总 vCJD 的一种估计预计为少至 205 个病例 (Valleron2001)。另一方面,如果仅从 BSE 传染的话对下一个 80 年 vCJD 死亡率的另一种预测是 50 至 50,000。如果 BSE 被证实感染绵羊而且如果之后它能够进入人类食物链的话,它可能会上升至 150,000 (Ferguson2002)。尽管如果必要的参数要么是弄错了要么是得不到从而不可能做出准确的预测,但有一件事是确定的,即如果 vCJD 传染力存在于血液中,则任何预测都是低估的。此外,vCJD 已经被证实是一种新的疾病实体并且并非简单的是对人类 CJD 监视提高的结果 (Hillier2002)。

[0017] 政府已经采取了对策来消除 BSE 发病率的传播。在美国和英国禁止了反刍动物蛋白饲料 (1988)。已经采取了一系列措施来预防潜在的受感染肉进入人类的食物链。为进一步降低人类风险,FDA 和 CBER 已经在 2001 年 8 月发布了一项新政策,无限期推迟了在 1980-1996 年间在英国停留累积  $\geq 6$  个月的供体 (FDA2001)。

[0018] 朊病毒病的诊断测定

[0019] 开发用于朊病毒检测的灵敏而可靠的测定对于疾病监视、风险评估以及当与未来的疗法相结合时用于疾病预防和根治是绝对重要的。目前,基本有三种测定用于诊断朊病毒病。(1) 动物传染性生物测定是迄今为止用于测量啮齿类动物的实验性瘙痒病的传染性朊病毒的最灵敏方法,其通常通过用患病动物的脑匀浆物脑内注射给受体动物来完成。然而,在不同动物物种中对朊病毒病传染力的定量测量由于“物种屏障”以及所存在的在病理学、温育时间和 PrP<sup>Sc</sup> 分子特征方面有区别的不同朊病毒“品系”而受到限制。因此,这一耗时的昂贵的死后诊断大多用作一种用于区分啮齿类动物中的不同朊病毒品系的研究工具,并用作校准传染性脑材料的参考。(2) 目前的 PrP 免疫测定基于对蛋白酶抗性 -PrP<sup>Sc</sup> 的检测,这是所有朊病毒病的唯一已知的分子特点。多年来,通过免疫化学法对 PrP<sup>Sc</sup> 的检测 (免疫组织化学和蛋白印迹) 已经提供了对动物和人类中朊病毒病的最准确诊断 (Schaller1999, Biffiger2002)。它们被广泛用于死后诊断。为此已经得到了许多针对 PrP 的各个区域的单克隆和多克隆抗体,比如 US4806627 和 EP0861900 中所述的广泛使用的 3F4、6H4。然而,只有极少数声称能够区分 PrP<sup>C</sup> (常常以更大的量存在) 和 PrP<sup>Sc</sup>。Korth 在

1997 年报道的以及 Paramithiotis 在 2003 年报道的单克隆抗体都是 IgM, 而且用这些抗体没有开发出诊断测定. 因此, 几乎所有当前的免疫化学方法在检测 PrP<sup>Sc</sup> 之前都需要一个通常通过非特异性蛋白水解比如蛋白酶 K (PK) 消化来降低或去除 PrP<sup>C</sup> 的步骤. 这样的预处理从 PrP<sup>Sc</sup> 切除最初的 60-70 个残基, 得到一个称作 PrP<sup>res</sup> 的 PK- 抗性 PrP27kDa-30kDa 核心. 然后识别该蛋白剩余的 C 末端区域的抗 -PrP 抗体可以用于检测仅存在于病理学样品中的 N- 末端截短的 PrP<sup>Sc</sup> 或 PrP<sup>res</sup>. 为进行免疫组织化学染色, 还要预处理组织切片, 通常用酸水解以降低与 PrP<sup>C</sup> 相关的背景. 因此, PrP<sup>res</sup> 在这些免疫测定中是前体 PrP<sup>Sc</sup> 的替代品. 在各种免疫测定形式中, 根据双 -、单 - 和未糖基化 PrP 带的迁移, 蛋白印迹具有揭示详细 PrP 分子模式的优势. 该方法也已经被广泛用于区分人和动物朊病毒病中的不同的脑 PrP<sup>res</sup> 亚型. 除蛋白印迹外, 现在还已经开发了用于较高样品通量、灵敏度提高、以及更好定量的其它测定形式, 包括传统的 ELISA、解离增强的镧系元素荧光免疫测定 (DELFI, Barnard2000 和一种在 US20020137114A1 中描述的方法) 以及与 ELISA 和荧光检测相结合的构象依赖性免疫测定 (CDI) (Safar1998, US20010001061A1, US20020001817A1). 然而, 尽管有这一形式, 但 PrP<sup>Sc</sup> 只有在强制性 PK 消化后才能与 PrP<sup>C</sup> 区分开来, 这可能会难于最优化全异的生物样品. (3) 还描述了其它样品处理方法, 包括绵羊瘙痒病临床前诊断的第三眼睑淋巴组织的免疫组织化学 (O' Rourke2000, US6165784, US6261790), 用磷钨酸钠做化学处理以从脑和其它外周组织匀浆物富集 PrP<sup>Sc</sup> (Wadsworth2001), 以及在感染动物或人尿中检测一种新的朊病毒蛋白同工型 (Shaked2001b, W00233420A2). 其它检测系统也已经有文献记载, 包括毛细管电泳及傅立叶变换红外光谱学. 这些方法仍然处于它们的初期开发阶段, 并且在技术上很复杂. 除了通过去除细胞朊病毒、之后通过非区别性抗 - 朊病毒抗体识别来对病原性朊病毒所作的传统鉴定之外, 发现其它试剂能够将 PrP<sup>Sc</sup> 与 PrP<sup>C</sup> 区分开来, 比如纤溶酶原和血纤蛋白原. 所提供的证据提示, 各种物种的 PrP<sup>Sc</sup> 的共有特性, 而非朊病毒一级序列或各 PrP<sup>Sc</sup> 分子的特异性三级结构, 可能负责与纤溶酶原结合 (Fischer2000, Maissen2001). W00200713 和 US20010053533A1 中已经描述了利用纤溶酶原和其它血清 / 血浆蛋白捕获和检测病原性朊病毒蛋白的用途 (Aguzzi2001).

[0020] 所有目前制备的朊病毒诊断测定方法都利用脑组织作为样品来源. 欧洲委员会 (European Commission) 在 1999 年评估了来自不同生产商的四种 BSE 测试试剂盒 (Moynagh1999). 它们全都需要一个单独的样品制备程序. 根据试剂盒的说明书, 脑组织匀浆物需要加工, 包括变性、PK 消化或 PrP<sup>Sc</sup> 富集. DELFA、免疫印迹或平板 ELISA 形式中使用的测定检测系统利用了化学发光或比色底物.

[0021] 向临死前朊病毒病诊断的挑战

[0022] 基于 PrP<sup>Sc</sup> 的临死前测定的一个普遍问题是 PrP<sup>Sc</sup> 是否存在于周边组织或体液中. 由于技术难度, 获得了很少的关于 PrP<sup>Sc</sup> 在体液中的存在或其相关传染力的实验数据, 而且这一主题仍有争议. 在瘙痒病仓鼠模型中, 可以在血液中检测到低水平的传染力. 尽管从患病仓鼠血液衍生而来的淋巴细胞富集的棕黄层的传染力大于血浆中的, 但它只能说明与整个血液接种物相比的相对小部分. 存在于血液中的该传染物的分子定义是不清楚的. 在散发性 CJD 患者中寻找风险因子和可能的感染来源揭示了疾病与饮食、输血或接受其它血液产物没有显著的相关性. 尽管早期的报道显示了向小鼠脑内接种后在从 CJD 患者获得的血液中可能存在传染力 (Manuelidis1985, Tateishi1985), 但大量的传染力或

PrP<sup>res</sup> 总是在中枢神经系统中发现 (CNS), 而在经典的人朊病毒病的周边组织中没有总是发现它, vCJD 的情形除外. 在 vCJD 患者的周边淋巴网状组织比如扁桃体和脾脏和淋巴结中存在易于检测的 PrP<sup>Sc</sup> 已经引起了人们对如下情形的重要关注, 即存在于淋巴网状组织中的大量 PrP<sup>res</sup> 能够与循环系统互作, 且因此, 在 vCJD 患者血液中可能存在痕量 PrP<sup>Sc</sup> 从而可能发生血液传播. 血液中的其它 TSE 传染性也已经在各种动物实验中得到了证实. 大多数用于传染性研究的血液都获自 TSE- 适应的啮齿类动物, 比如小鼠和仓鼠. 通过脑内和静脉内传播已经建立了小鼠 - 适应的 BSE、小鼠 - 适应的 vCJD. 唯一的一个例外模型是一项在绵羊中完成的研究. 在该实验中, 用取自另一接种了 BSE 脑裂解物的绵羊的全血输血的绵羊发展了 BSE 症状 (Houston2000, Hunter2002). 然而, 这些实验结果仍然需要进行完全地评估. 期望在血液中寻找这样的传染物将有助于我们更好地理解 PrP<sup>Sc</sup> 与 TSE 病之间的关系.

[0023] 重要的是要注意到, 由于不同的蛋白含量、应用该测定到大的样品数的难度、不可避免的去蛋白酶敏感的 PrP<sup>Sc</sup> 折叠中间体或者甚至真实 PrP<sup>Sc</sup> 级分从而导致降低检测灵敏度, 所以用于消除 PrP<sup>C</sup> 背景的苛刻样品处理可能不适于其它周边组织样品或体液. 这可能尤其与利用周边组织和体液的测定有关, 因为可能只存在低水平的 PrP<sup>Sc</sup> (Horiuchi1999, Jackson1999, Swietnicki2000). 这些关注使得开发与 PrP<sup>Sc</sup> 具有高亲和力、可以不需要蛋白水解处理而进行特异性检测的免疫试剂成为必需的.

[0024] 发现新的 PrP<sup>Sc</sup> 检测捕获试剂

[0025] 无论接受“只有蛋白”或“只有朊病毒”的假说与否, 都进行着不断的努力来搜寻除朊病毒外的可以对朊病毒病发病机理有贡献的试剂或分子. 这一搜寻由许多未知的问题驱动着. 例如, 无任何污染的合成朊病毒蛋白, 不引发疾病; 触发正常 PrP<sup>C</sup> 向病原性 PrP<sup>Sc</sup> 同工型转变的机制是未知的. 另一个未解决的问题涉及在动物和人中观察到的各种根据疾病潜伏期、糖基化水平和损伤模式定义的朊病毒病表型. 在对单 PRNP 基因型纯合的近交小鼠中连续传代后, 所有的瘙痒病品系都保持它们的原始疾病特征 (profile). 这些观察结果将调查者引向这些问题: 不同表型的品系是否受相同细胞朊病毒前体的不同构象同工型的控制、或者是否存在另一种决定可遗传品系的表型的因子. 实际上, 无细胞反应中形成的体外转变模型 PrP<sup>res</sup> 从未显示出在动物中形成新的 TSE 传染性 (Caughey2003). 这些问题使许多人相信漏掉了一个仍然需去被发现的、被 Prusiner 建议为“X 蛋白”的成分.

[0026] 有人提出用朊病毒颗粒中存在一个紧密结合的 RNA 或 DNA 分子来解释具有不同表型的不同瘙痒病品系在 PRNP 基因纯合的动物中的增殖 (Weissmann1991). 经回行再聚焦 (return refocusing) 凝胶电泳高度纯化的瘙痒病朊病毒分析揭示了剩余核酸的小尺寸 (Kellings1992). 然而, 在最近的一份报道中, Narang 指出, 用纯化自瘙痒病 - 仓鼠脑、并与非病原性朊病毒混合的 ssDNA 接种的动物发展了临床疾病 (Narang2002). 根据他的发现, 他假定, 由该 ssDNA 编码的“辅助蛋白”可能参与从 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的转变. 根据那些体外构象和转变研究, 假定该 DNA 作为 PrP<sup>Sc</sup> 构象的守护者以及促进 PrP<sup>Sc</sup> 转变和聚焦的催化剂起作用 (Cordeiro2001). 最近有报道, PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>res</sup> 的体外化学计量转化需要特异性的 RNA 分子 (Deleault2003). 由 Ortho-Clinical Diagnostics 开发的能够区别性捕获 PrP<sup>Sc</sup> 而不捕获 PrP<sup>C</sup> 的抗核酸单克隆抗体 (US60/434, 627, US60/446, 217) 是另一个证实 PrP<sup>Sc</sup> 与核酸结合的证据.

[0027] 已知, 从病脑中分离出的 PrP<sup>Sc</sup> 还与大量聚糖结合. 它们包括朊病毒棒中

的 1,4-连接的葡萄糖单位、鞘脂、多糖和 PrP<sup>Sc</sup> 聚集体中的其它膜组分 (Appel1999, Klein1998)、和朊病毒淀粉样斑中的硫酸蛋白聚糖 (Snow1990), 这是在免疫组织化学中发现的一种特性, 其中已经显示通过硫酸乙酰肝素抗体 (抗-HS) 和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖抗体 (抗-HSPG) 的结合早在感染后 70 天以及在整個疾病过程中与异常 PrP 相关 (McBride1998)。通过可能不同于核酸参与从 PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 转变的机制, 聚糖也将细胞朊病毒蛋白转化为  $\beta$  折叠构象。PrP<sup>C</sup> 向 PrP<sup>Sc</sup> 的体外转变以及在朊病毒传染力重构实验中, 硫酸聚糖已经显示出促进转变或增强传染力 (Wong2001, Shaked2001a, Diaz-Nido2002)。利用重组 GST:: 全长朊病毒和 GST:: 朊病毒片段, Warner 最近证实了重组朊病毒与肝素和硫酸乙酰肝素的直接结合 (Warner2002)。朊病毒序列中的肽区域 23-52 在所有 HS 和 HSPG 结合测试中都是阳性的。由于该肽未能与全长朊病毒竞争结合肝素, 所以作者建议在完整 PrP<sup>C</sup> 中可能有另一个主要的 GAG- 结合位点。另一个有趣的观察结果是, 已经报道纤溶酶原结合脑-衍生的 PrP<sup>Sc</sup>, 但不与 PrP<sup>C</sup> 结合。尽管还没有证实纤溶酶原与 PrP<sup>Sc</sup> 直接互作, 但有人建议纤溶酶原的三环域 (Kringle region) 中有一个结合位点, 该区域具有已知的对肝素的亲和力。另一个值得注意的观察结果是, 来自不同物种 (牛和猪) 或来自不同器官 (肺、肾和肠) 的 GAG 已显示出对朊病毒结合的不同亲和力。亲和力的差异可能是由于朊病毒序列本身引起的, 或可能依赖于所测试 GAG 中特定糖单位的存在。

[0028] 根据这些观察结果, 提议了许多设计用于通过与独特 PrP<sup>Sc</sup> 构象或 PrP<sup>Sc</sup> 相关分子的肽亲和力选择性捕获 PrP<sup>Sc</sup> 而不是 PrP<sup>C</sup> 的肽。利用不经蛋白酶预处理的免疫沉淀通过从病脑匀浆物鉴定和捕获 PrP<sup>Sc</sup> 的能力筛选出这些肽。

[0029] (1) 肝素 / 硫酸乙酰肝素结合结构域肽:

[0030] 聚糖 (GAG) 比如肝素和硫酸乙酰肝素与 PrP<sup>Sc</sup> 淀粉样聚集体结合。由于 GAG::PrP<sup>Sc</sup> 中的结合亲和力远高于 GAG::PrP<sup>C</sup> 中的, 所以有可能利用特征为聚糖结合结构域以选择性捕获 PrP<sup>Sc</sup> 而非 PrP<sup>C</sup> 的肽。为此, 合成了描述为肝素或硫酸乙酰肝素结合结构域的肽: (1) 纤连蛋白羧基末端的 WQPPRARI (Woods1993, Hines1994), (2) 淀粉样蛋白前体的 NWCKRGRKNCKTH (Small1994), (3) 成纤维细胞生长因子 (FGF)-1 的 N-末端的 NYKKPKLG (Lou1996) 和 (4) 层粘连蛋白  $\alpha 1$  链的 C-末端 G-结构域的 KDFLSIELVRGRVK (Yoshida1999)。

[0031] (2) “缩合的”三环肽:

[0032] 三环域参与纤溶酶原与 PrP<sup>Sc</sup> 的选择性结合。还已知, 三环域具有肝素 / 硫酸乙酰肝素结合活性 (Mizuno1994), 其中涉及带正电荷的氨基酸 (比如 Arg 和 Lys) (Soeda1989)。在一份单独的出版物中, 在所建议的朊病毒序列中发现有两个保守三肽 “YYR”、或更确切的是三个不连续 “YYX” 与 PrP<sup>Sc</sup> 互作但不与 PrP<sup>C</sup> 互作 (Paramithiotis2003, W00078344A1)。在人纤溶酶原序列中有趣地发现, 五个三环域中的四个中有四个 Tyr-Arg-Gly 序列 (三环域 1、3、4 和 5); 在纤溶酶原中有六个 Tyr-Arg 或 Arg-Tyr 或 Arg-Lys 序列。此外, 通过在三环圈中形成二硫键使几个相距较远的 Tyr、Arg 或 Lys 残基靠近在一起 (图 1)。基于这些观察, 假定纤溶酶原三环域以及朊病毒序列中的氨基酸 Tyr、Arg 和 Lys, 可能通过与 PrP<sup>Sc</sup> 复合物结合的聚糖的互作, 可以解释与 PrP<sup>Sc</sup> 的选择性结合。为此, 合成了两个 “缩合的三环” 肽 YRGYRGYRGYRG 和 YRGRYGYKGYGYRG。

[0033] (3) 核酸结合肽:

[0034] 核酸是另一类与 PrP<sup>Sc</sup> 聚集体结合的分子。抗 -DNA 抗体已经被有效用于捕获 PrP<sup>Sc</sup>。组蛋白是一组已知与核 DNA 结合的蛋白。因此,为评估它们捕获 PrP<sup>Sc</sup> 的能力,合成了三个肽 (1)H2B(21-41) 的 AQKKDGGKKRKRSRKESYSIYV, (2)H3(1-21) 的 ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA, 和 (3)H4(2-24) 的 SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRL。

### [0035] II. 发明概述

[0036] 本发明的目的是提供一种分离、浓缩和监控 TSE 疾病相关的病原性朊病毒蛋白的非侵入性途径。本发明描述了八个肽 (肽 -1、肽 -2、肽 -3、肽 -5、肽 -6、肽 -7、肽 -8 和肽 -9) 和它们从朊病毒病感染的动物和人的脑匀浆物捕获 PrP<sup>Sc</sup> 的能力。这八个肽不从无朊病毒病的个体捕获细胞朊病毒蛋白。所提供用于支持本发明的证据证实,正如所研究的,PrP<sup>Sc</sup> 以高亲和力与许多其它分子比如核酸和聚糖结合。该证据还证实,这一结合是强的、对 PK 消化处理有抗性的,而且 PrP<sup>Sc</sup> 可以容易地用肽通过识别这样结合的结合配偶体分离出来。

[0037] 本发明涉及所述肽通过与 PrP<sup>Sc</sup> 高亲和力结合的聚糖或核酸连同用于检测 PrP<sup>Sc</sup> 的任何朊病毒序列特异性抗体用于捕获 PrP<sup>Sc</sup> 的用途。

[0038] 在另一方面,本发明涉及如上所述的肽,其优选与病原性朊病毒结合但不与朊病毒蛋白正常细胞形式结合。

[0039] 在另一方面,本发明涉及如上所述的肽,其用于通过所结合的聚糖或核酸的高亲和力识别连同朊病毒序列特异性抗体来检测 PrP<sup>Sc</sup>。

[0040] 在另一方面,本发明涉及如上所述用于在生物试剂生产中分离、纯化、捕获、去除及监控 PrP<sup>Sc</sup> 的肽。

[0041] 在另一方面,本发明涉及用于确定 PrP<sup>Sc</sup> 的存在的组合物和试剂盒,其包括如上所述用于测定方法中的捕获或者检测步骤的肽。

[0042] 在另一方面,本发明涉及用于确定 PrP<sup>Sc</sup> 抗体的存在的组合物和试剂盒,所述抗体是应答高亲和力结合的作为病原性朊病毒蛋白结合配偶体的聚糖或核酸而产生的。

[0043] 仍在另一方面,本发明涉及抗 -PrP<sup>Sc</sup> 抗体及利用所述能够与 PrP<sup>Sc</sup> 互作和 / 或与 PrP<sup>Sc</sup> 结合的聚糖或核酸对其的生产,以及它们在检测聚糖 ::PrP<sup>Sc</sup> 或核酸 ::PrP<sup>Sc</sup> 复合物和朊病毒病感染的用途。

[0044] 在另一方面,本发明涉及一种非苛刻样品处理程序,涉及为利用上述肽而进行聚糖酶或核酸酶消化。

### [0045] III. 附图简述

[0046] 图 1 人纤溶酶原序列和三环域。■,五个三环域中的四个具有四个 YRG 序列。■,有 6 个 YK、RY、RK 序列。●,在几个三环圈二硫键附近有许多 Y、R 或 K。

[0047] 图 2 仓鼠 PrP<sup>Sc</sup> 的 IP 捕获和免疫印迹。将正常 (4 μ l) 和瘙痒病 (3 μ l) 仓鼠脑匀浆物直接加样于凝胶中或利用缀合有生物素化的肽的链霉抗生物素蛋白磁珠直接做免疫沉淀。通过用 3F4 做免疫印迹检测 PrP。PK 消化瘙痒病裂解物以用于直接加样。用于 IP 捕获的匀浆物不经 PK 处理。

[0048] 图 3BSE PrP<sup>Sc</sup> 的 IP 捕获和免疫印迹。将来自正常牛 (10 μ l) 或来自 BSE (5 μ l) 的脑匀浆物加入 1ml IP 缓冲液中,用于肽 - 磁珠免疫沉淀。之后将免疫沉淀的 PrP 用 PK 处理并用 SDS-PAGE 和免疫印迹进行分析,用 6H4 检测。从 BSE 脑匀浆物中捕获的 PrP 是真

实的 PrP<sup>Sc</sup>, 因为用 PK 处理 (50 μg/ml, 37°C, 1 小时) 产生 PK- 抗性核心 PrP<sup>res</sup> 片段。还在不存在 (-) 或存在 (+) PK (50 μg/ml, 37°C, 1 小时) 时将从 BSE 和正常对照中澄清出的脑匀浆物温育或直接加样到 SDS 凝胶上作为对照。

[0049] 图 4 用肽从 vCJD 的脑中免疫捕获 PrP<sup>Sc</sup>。用肽缀合的磁珠在获自被路易体痴呆 (LBD) 或 vCJD (99/090) 影响的患者的 5 μL 澄清的脑匀浆物中免疫沉淀 PrP。然后将免疫沉淀物进行 SDS-PAGE (4-12% 凝胶) 分析以及利用抗 -PrP 抗体 3F4 做蛋白印迹。将 5 μL 未处理的 LBD 匀浆物和 5 μL 经 PK 处理或未处理的 vCJD 脑匀浆物直接加样到 SDS- 凝胶中以显示朊病毒含量。

[0050] IV. 详述

[0051] 脑匀浆物制备:

[0052] 从 Baltimore Research and Education Foundation 获得正常和瘙痒病仓鼠脑裂解物作为溶于 PBS 中的 10% 全脑组织匀浆物 (w/v)。向裂解物中加入 1/10 体积的 10× 去污剂匀浆缓冲液对该裂解物做进一步处理, 该缓冲液由溶于 PBS 中的 5% 脱氧胆酸钠和 5% Igal CA-630 (与 NP-40 相当) 组成, 4°C 温育 1 小时, 之后在 1000g 离心 10 分钟。收集所得上清液并用于测定。

[0053] 由英国 Veterinary Laboratories Agency (VLA) 提供正常和 BSE 牛脑组织。由英国 National CJD Surveillance Unit (NCJDSU) 提供人 vCJD 和路易体 (Lewy body) 痴呆脑组织。以与仓鼠脑匀浆物制备相同 (或类似) 的方式处理脑组织。

[0054] 合成肽:

[0055] 由 ResGen (Invitrogen Corporation 现在的一个部门) 合成、或从 Upstate Group, Inc. 购买, 得到了九个肽。各肽用生物素在带有氨基己酰间隔区 (K(Lc)) 的 C- 末端赖氨酸上进行标记, 或者通过氨基己酰间隔区 (AMCAP) 在 N- 末端上进行标记。

[0056]	肽 ID	肽序列	序列来源	制备单位
--------	------	-----	------	------

[0057]	肽一:	WQPPRARIG-K(Lc)-生物素	纤连蛋白	ResGen
--------	-----	---------------------	------	--------

[0058]	肽二:	生物素-AMCAP-NWCKRGRKNCKTH	淀粉样蛋白前体	ResGen
--------	-----	-------------------------	---------	--------

[0059]	肽三:	生物素-AMCAP-NYKKPKLG (FGF)-1	成纤维细胞生长因子	ResGen
--------	-----	----------------------------	-----------	--------

[0060]	肽四:	生物素-AMCAP-KDFLSIELVRGRVK	层粘连蛋白 A 链	ResGen
--------	-----	--------------------------	-----------	--------

[0061]	肽五:	YRGYRGYRGYRG-K(Lc)-生物素	“缩合的”三环 -A	ResGen
--------	-----	------------------------	------------	--------

[0062]	肽六:	YRGYRGYKGYGYRG-K(Lc)-生物素	“缩合的”三环 -B	ResGen
--------	-----	--------------------------	------------	--------

[0063]	肽七:	AQKKDGKKRKRSRKESYSIYV-GGK(Lc)-生物素	人组蛋白 2B	Upstate
--------	-----	-----------------------------------	---------	---------

[0064]	肽八:	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA-GGK(Lc)-生物素	人组蛋白 3	Upstate
--------	-----	-----------------------------------	--------	---------

[0065]	肽九:	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL	人组蛋白 4	Upstate
--------	-----	------------------------	--------	---------

R-GSGSK(Lc)-生物素

[0066] 肽十：生物素-AMCAP-TIADRYRETAR VP16 蛋白, HSV-2 ResGen

[0067] 将生物素化的肽以 1mg/mL 溶解于 PBS 中, 并于 -20°C 储藏直至使用。

[0068] 生物素化的肽与链霉抗生物素蛋白磁珠缀合：

[0069] 用 PBS 洗涤 0.5mL **Dynabeads®** M-280 链霉抗生物素蛋白 (DynaL Biotech, NY, 美国, Cat. #112.06) 两次, 用磁铁将珠子从缓冲液中分离出来 (DynaL Magnetic Particle Concentrator, MPC)。向洗涤过的珠子中加入 100ug 肽和 1mL PBS。于 37°C 下旋转温育 1-2 小时。用 MPC 将珠子从缓冲液中分离出来, 用 1ml PBS (0.1% BSA) 洗涤两次, 并于洗涤时在室温下旋转 5 分钟。然后于 37°C 用溶于含 0.1% BSA 的 0.2M Tris-HCl, pH8.0 中的 1mM 生物素封闭肽-缀合的珠子 2 小时。之后用 1ml PBS (0.1% BSA) 洗涤珠子 2 次, 并用 1ml PBS (0.1% BSA, 1% Tween20) 洗涤一次, 每次在室温下温育 10 分钟。然后用 1ml PBS (0.1% BSA) 洗涤珠子一次, 然后于 4°C 保存于 1ml PBS (0.05% 叠氮化钠) 中。

[0070] 蛋白酶 K 消化：

[0071] 脑裂解物 PK 消化的条件：用或不用非离子去污剂将脑匀浆物悬浮于 PBS 缓冲液中。总匀浆物蛋白浓度不超过 2.5mg/mL。以 50ug/mL 的终浓度加入 PK (Roche Diagnostics, IN, 美国, Cat. #1373196)。于 37°C 温育 0.5 至 1 小时。通过加入 Pefabloc SC (Roche Diagnostics, IN, 美国, Cat. #1585916) 至终浓度为 4mM 终止消化。

[0072] 免疫沉淀 (IP)、非还原电泳和 PrP<sup>Sc</sup> 的免疫印迹检测：

[0073] 用肽缀合的磁珠从脑匀浆物中通过免疫沉淀捕获 PrP<sup>Sc</sup>。IP 程序由下列操作组成：将 50uL 肽缀合的珠子与经 PK 处理过的或未经 -PK 处理的脑匀浆物在总计 1mL IP 缓冲液 (溶于 PBS 中的 3% Tween20 和 3% Igpal CA-630) 中混合, 并在 25°C 旋转温育 2.5 小时 → 用 MPC 装置分离珠子并用 IP 洗涤缓冲液 (溶于 PBS 中的 2% Tween20 和 2% Igpal CA-630) 洗涤珠子 3 次, 每次 30 秒涡旋 → 通过用 NuPAGE 样品缓冲液加热珠子 10-15 分钟将捕获的 PrP<sup>Sc</sup> 洗脱。将从 IP 捕获洗脱的样品加载到 4-12% **NuPAGE®** Bis-Tris Gel (Invitrogen, CA, 美国, Cat. #NP0302) 中, 并进行非还原电泳, 200V, 45 分钟。免疫印迹过程按照下述完成：于 30V 下将凝胶中分离的蛋白转移到 0.2um PVDF 膜上 (Invitrogen, Cat#LC2002) 60 分钟 → 用溶于 TBS 中的 Blocker™ Casein (0.05% Tween20) (Pierce Chemical Corp., IL, 美国, Cat. #37532) 在 25°C 振荡 1 小时或者在 4°C 下过夜以封闭该膜。 → 用 1:3000 稀度的 3F4 (Signet, MA, 美国, Cat. #9620-02) 或 1:5000 稀度的 6H4 (Prionics AG, 瑞士, Cat. #01-011) 作为第一抗体检测 PrP<sup>Sc</sup>。将膜与稀释的抗体在溶于 TBST 缓冲液中 (25mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 0.2% Tween20, pH8.0) 的 10% Blocker™ Casein 中在 25°C 振荡 1 小时。 → 用 TBST 缓冲液振荡洗涤 3×5 分钟。 → 将膜与 1:10,000 至 1:30,000 稀度的辣根过氧化物酶缀合的山羊多克隆抗小鼠 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, 美国, Cat. #115-035-003) 在溶于 TBST 缓冲液中的 50% Blocker™ Casein 中于 25°C 振荡温育 1 小时。 → 用 TBST 缓冲液振荡洗涤 6×5 分钟。 → 向膜上添加 ECL 化学发光底物 (Amersham Biosciences, NJ, 美国, Cat. #RPN2109) 或 SuperSignal West Dura 化学发光底物 (Pierce) 以显影 5 分钟。 → 通过暴光于 Bio Max MR-2 胶片 (Kodak, NY, 美国) 或 ChemiDoc Gel Documentation System (Bio-Rad, CA, 美国) 获得图像。

[0074] V. 优点

[0075] 本发明利用肽来通过识别 PrP<sup>Sc</sup> 复合物中的高亲和力结合分子比如聚糖、核酸以捕获 PrP<sup>Sc</sup>。由于这些分子只与 PrP<sup>Sc</sup> 而不与 PrP<sup>C</sup> 紧密结合,所以本发明提供了一种用于检测 PrP<sup>Sc</sup> 的非侵入性方法,而不需要 PK 消化或其它的蛋白修饰过程。预期温和的条件将会保持病原性朊病毒蛋白的原始结构和构象,从而提供了确定真实 PrP<sup>Sc</sup> 存在的机会,而将由于苛刻的样品处理而导致的 PrP<sup>Sc</sup> 形成最小化。

[0076] 使用合成肽提供了益处,因为它们不仅显示结合特异性,而且还在直接涂覆至固相以及进行缀合以连接于给出信号的试剂比如辣根过氧化物酶 (HRP) 或被其它所需诊断测定形式所采用时易于操作。

[0077] VI. 所引用的文献

[0078] Aguzzi A, Fischer MB, (2001) Prion-Binding Activity in Serum and Plasma., US20010053533A1

[0079] Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D. (1999) Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. Biol Chem 380(11):1295-306

[0080] Arnold, JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. J. Pathol. 176:403-411

[0081] Bernard G, Helmick B, Madden S, Gilbourne C and Patal R (2000) The measurement of prion protein in bovine brain tissue using differential

[0082] extraction and DELFIA as a diagnostic test for BSE Luminescence 2000;15:357-362

[0083] Belay ED (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. Annu. Rev. Microbiol. 53:283-314.

[0084] Biffiger K, Zwaid D, Kaufmann L, Briner A, Navki I, Purro M, Bottcher S, Struckmeyer T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbriggen A, Steck M, Moser M, Oesch B, Kubler E (2002) Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate. J Virol Methods 101(1-2):79-84.

[0085] Bolton DC (2001) Prions and proteins: distinguishing between conformations. The Lancet 358(9277):164-165

[0086] Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gaidusek DC, Castaigne P. (1987) The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15 year investigation in France and review of the world literature. Neurology 37:895-904.

[0087] Brown P. The risk of bovine spongiform encephalopathy ("mad cow disease") to human health. JAMA 1997;278:1008-1011

[0088] Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H and Bostock CJ. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature 389:498-501

[0089] Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Emst D, Hayes SF, Caughey, W. S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP<sup>27-30</sup> in water by

infrared spectroscopy. Biochemistry 30 :7672-7680.

[0090] Cauhey B and Kocisko DA. (2003) A nucleic-acid accomplice? Nature Oct16; 425(6959) :673-4

[0091] Chandler R. (1961) Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material. Lancet 1;1378-1379

[0092] Cohen FE, Prusiner SB. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. Annu Rev Biochem 67 :793-819

[0093] Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL. (2001) DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. J Biol Chem. 276(521) :49400-9.

[0094] Cuillé J, Chelle PL (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable? C. R. Acad. Sci. 203, 1552-1554

[0095] Deleault ND, Lucassen RW and Supattapone S. (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. Nature Oct16; 425(6959) :717-20

[0096] Diaz-Nido J, Wandosell F, and Avila J (2002) Glucosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. J Biol Chem Jul; 276(7) :1323-32

[0097] FDA and CBER. U. S. Department of Health and Human Services (2001) IV. RECOMMENDATIONS FOR DONOR DEFERRAL in Guidance for Industry: Revised Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products

[0098] Ferguson NM, Ghani AC, Donnelly CA, Hagensars T J, Anderson RM. (2002) Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. Nature 415(6870) :420-4

[0099] Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A. (2000) Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. Nature 408 :479-83.

[0100] Foster JD, Hope J, McConnell I, Bruce M, Fraser H. (1994) Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice, Ann N Y Acad Sci 724 : 300-3.

[0101] Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6617-6621.

[0102] Gaidusek DC, Gibbs CJ, Alpers MP (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees, Nature 209 :794-796

[0103] Gaidusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. Science 197 :943-60

[0104] Gibbs CJ, Gaidusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy) : transmission to

the chimpanzee. Science 161, 388-389

[0105] Gibbs CJ Jr, Gaidusek DC, Amyx H. (1979) Strain variation in the viruses of Creutzfeldt-Jakob disease and kuru. In: Prusiner SB, Hadlow WJ, editors. Slow transmissible diseases of the nervous system. Volume 2. New York: Academic Press; p. 87-110.

[0106] Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J (1997) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. Lancet 349 (9045): 99-100

[0107] Hillier CE, Salmon RL, Neal JW, Hilton DA. (2002) Possible underascertainment of variant Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 72 (3): 304-9

[0108] Hines KL, Kulkarni AB, McCarthy JB, Tian H, Ward JM, Christ M, McCartney-Francis NL, Furcht LT, Karlsson S, Wahl SM. (1994) Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor beta 1 knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA May 24; 91 (11): 5187-91.

[0109] Holada K, Simak J, Vostal JG (2000) Transmission of BSE by blood transfusion. Lancet 356 (9243): 1772

[0110] Hope J, Morton LJD, Farguhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH (1986). The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). EMBO J. 5. 2591-2597.

[0111] Horiuchi M, Caughey B. (1999) Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. EMBO J 18 (12): 3193-203.

[0112] Horwich AL, Weissman JS (1997) Deadly Conformations—Protein Misfolding in Prion Disease. Cell, 89: 499-510

[0113] Houston F (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. Lancet 356 (9234): 999-1000

[0114] Hunter N, Foster J, Chon A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. (2002) Transmission of prion diseases by blood transfusion. J Gen Virol Nov; 83 (Pt 11): 2897-905

[0115] Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. Science 283 (5409): 1935-7.

[0116] Kellings K, Meyer N, Miranda C, Prusiner SB, Riesner D (1992) Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. J. Gen. Virol. 73, 1025-1029.

[0117] Kimberlin RH, Cole S, Walker CA. (1987) Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to

rats and hamsters. J Gen Virol 68:75-81.

[0118] Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H. (1989) The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. J Gen Virol 70:2017-25.

[0119] Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R. and Riesner D (1998) Biol. Chem. 379:655-666

[0120] Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schuiz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrenscherer F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B. (1997) Prion (PrP<sup>Sc</sup>)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature 390 (6655):74-7

[0121] Lasmézas C, Deslys JP, Demaimay R, Adiou KT, Lamoury F, et al. (1996) BSE transmission to macaques. Nature 381:743-44

[0122] Luo Y, Gabriel JL, Wang F, Zhan X, Maciag T, Kan M, McKeehan WL. (1996) Molecular modeling and deletion mutagenesis implicate the nuclear translocation sequence in structural integrity of fibroblast growth factor-1. J Biol Chem. Oct 25; 271(43):2687-83.

[0123] Maissen M, Roeckl C, Markus G, Goldman W, Aguzzi A, (2001) Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species. Lancet 357:2026-8.

[0124] Manuelidis EE, Kim JH, Mericangas JR, Manuelidis L. (1985) Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. Lancet 2:896-97

[0125] McBride PA, Wilson MI, Eikelenboom P, Tunstall A, Bruce ME (1998) Heparan Sulfate Proteoglycan is Associated with Amyloid Plaques and Neuroanatomically Targeted PrP Pathology throughout the Incubation Period of Scrapie-Infected Mice. Experimental Neurol. 149:447-454

[0126] McGowan JP. (1922) Scrapie in sheep. Scott. J. Ac. 5:365-75

[0127] Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2310-2314.

[0128] Mizuno K, Incus H, Hagiya M, Shimizu S, Nose T, Shimohigashi Y, Nakamura T. (1994) Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. J Biol Chem. Jan 14; 269(2):1131-6. plasminogen

[0129] Moynagh J, Schimmel H (1999) The evaluation of tests for the diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathy in Bovines (8 July 1999) <http://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12-en.html>.

[0130] Narang HK (2002) A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: prion theory versus virus theory. Exp Biol Med. (Maywood) 227(1):4-19

[0131] O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE, Miller JM, Cutlip RC, Wells GA, et al. (2000) Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of

thirdeyelid lymphoid tissue. J Clin Microbiol 38 :3254-9.

[0132] Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB (1993) Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :10962-10966

[0133] Paramithiotis E et al (2003) A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. Nat Med Jul ;9(7) :893-9

[0134] Parizek P, Roeckl C, Weber J, Flechsig E, Aguzi A, Raeber AJ. (2001) Similar turnover and shedding of the cellular prion protein in primary lymphoid and neuronal cells.

[0135] Pattison I (1957) Transmission of scrapie to the goat. Lancet 272 :104-105.

[0136] Prusiner SB, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science (1982) 216 :136-44

[0137] Raymond GJ et al. (2000) Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. EMBO J Sept 1 ;19(17) :4425-30

[0138] Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. Nat. Med. 4(10) :1157-65

[0139] Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandevelde M, Heim D, Oesch B, Moser M. (1999) Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Acta Neuropathol (Berl) 98(5) :437-43.

[0140] Shaked GM, Meiner Z, Avraham I, Taraboulos A, Gabizon R (2001a) Reconstitution of Prion Infectivity from Solubilized Protease-resistant PrP and Nonprotein Components of Prion Rods. J. Biol. Chem. 276(17) :14324-14328

[0141] Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R, (2001b) A Protease-resistant Prion Protein Isoform Is Present in Urine of Animals and Humans Affected with Prion Diseases. J. Biol. Chem., 276(34) :31479-82

[0142] Shyng SL, Heuser JE, Harris DA, (1994) Glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. J. Cell Biol. 125 :1239-50

[0143] Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clais H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL. (1994) A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. J. Neurosci. Apr ; 14(4) :2117-27

[0144] Snow AD (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. Lab Invest. 63(5) :601-1

- [0145] Soeda S, Ohki H, Shimeno H, Nagamatsu A (1989) Further characterization of the binding of plasminogen to heparan: evidence for the involvement of lysine residues, Blochim Biophys Acta. Nov 9 ;999(1) :29-35. Plasminogen
- [0146] Swietnicki W, Morilles M, Chen SG, Gambetti P, Surewicz WK. (2000) Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP<sup>90-231</sup>. Biochemistry 39(2) :424-31.
- [0147] Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. J. Cell. Biol. 110 :2117-32
- [0148] Tateishi J. (1985) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. Lancet 2 :1074
- [0149] Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R., Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates an interaction of cellular PrP with another protein. Cell 83 :79-90.
- [0150] Valleron AJ, Boelle PY, Will R, Cesbron JY. (2001) Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. Science 294(5547) :1726-8
- [0151] Wadsworth JD, Joiner S, et al. (2001) Tissue distribution of protease-resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. Lancet 358(9277) :171-80
- [0152] Warner RG, Hundt C, Weiss S, Tumbull JE (2002) Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. J Biol Chem. May 24 :277(21) :18421-30
- [0153] Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, et al. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. Vet. Rec. 31 :419-20
- [0154] Williams ES, Young S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. J. Wildl. Dis. 16 :89-98
- [0155] Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, Caughey B (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP<sup>Sc</sup>-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein EMBO J 20(3) :377-386
- [0156] Wds A, McCarthy JB, Furcht LT, Couchman JR. (1993) A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. Mol Biol Cell. Jun ;4(6) :605-13
- [0157] Yoshida I, Tashiro K, Monii A, Nagata I, Hayashi Y, Mitsuyama Y, Tashiro N. (1999) Identification of a heparin binding site and the biological activities of the laminin alpha 1 chain carboxy-terminal globular domain. J Cell Physiol. Apr :179(1) :18-28.

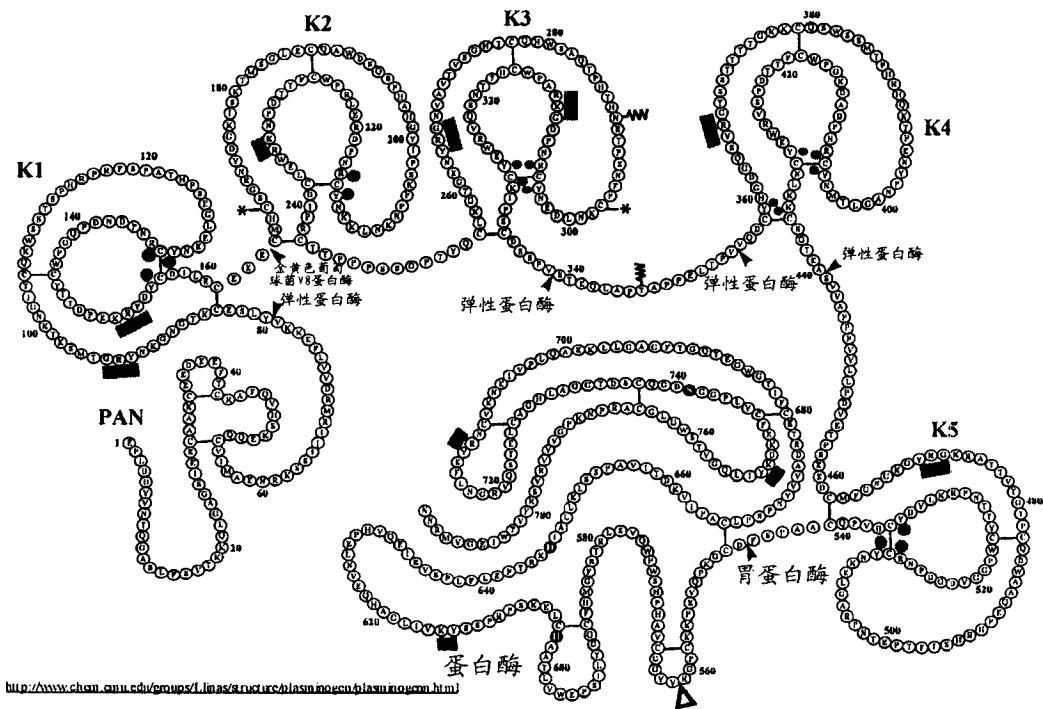


图 1

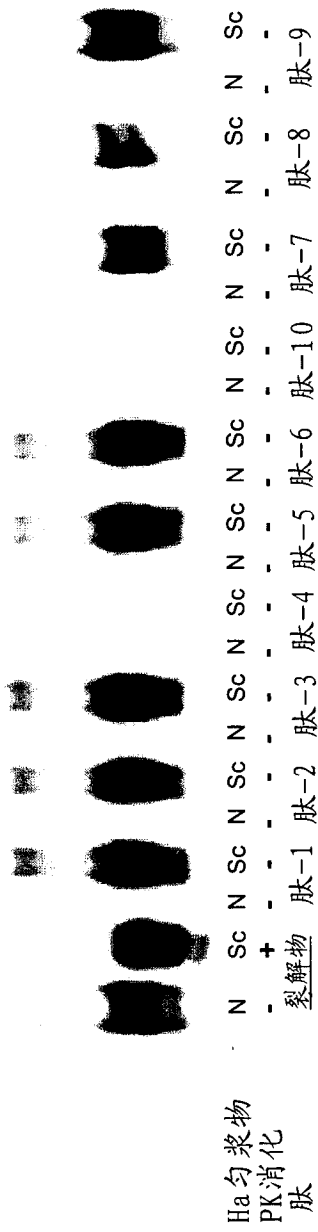


图 2

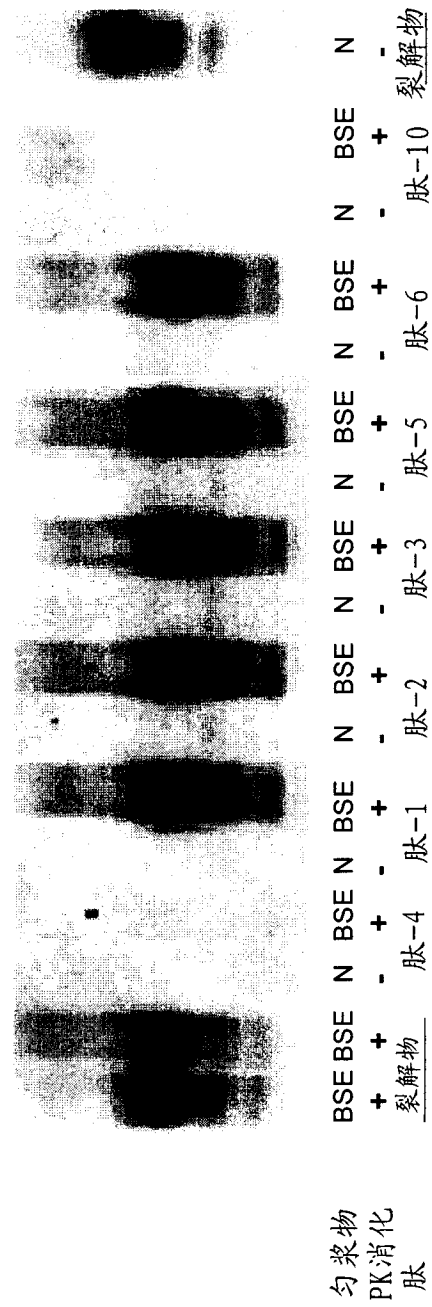


图 3



专利名称(译)	用于区别朊病毒的肽		
公开(公告)号	<a href="#">CN1804628B</a>	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	CN200510106486.8	申请日	2005-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
[标]发明人	J郑		
发明人	J· 郑		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C07K5/06 C07K5/08 C07K5/10 C07K7/06		
CPC分类号	C07K7/08 G01N2800/2828 C07K14/4711 C07K14/50 C07K7/06 G01N2333/968 C07K14/78 G01N33/6896 G01N33/54313		
代理人(译)	王景朝		
优先权	60/614533 2004-09-30 US		
其他公开文献	CN1804628A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于在人和动物中检测朊病毒病的肽，也描述了用于确定朊病毒病的组合物和试剂盒。

