



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103897056 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201310662163. 1

(22) 申请日 2013. 12. 09

(30) 优先权数据

101149718 2012. 12. 25 TW

(71) 申请人 法玛科技顾问股份有限公司

地址 中国台湾台中市西区公益路 161 号 14 楼之 1

(72) 发明人 陈宜民 黄思惟 林盈好

(74) 专利代理机构 北京中博世达专利商标代理有限公司 11274

代理人 申健

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

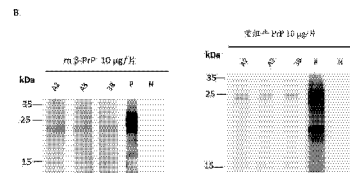
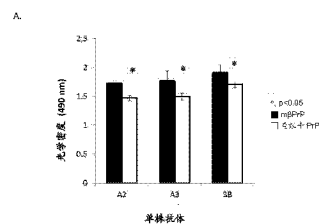
序列表2页 附图6页

(54) 发明名称

可辨认感染性普立昂蛋白质的单株抗体及其用途

(57) 摘要

本发明是关于可用于特异性辨认感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的单株抗体,本发明的单株抗体特征在于不需要经过蛋白水解酶的反应,就能够直接特异性地辨认 PrP^{Sc} 蛋白,可提供用来建立一种高特异性及高灵敏度的普立昂疾病检测方法与套组。



1. 一种特异性辨认感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的单株抗体,其特征在于与具有普立昂蛋白的胺基酸 141-182(SEQ ID NO. 1) 的肽片段结合。
2. 根据权利要求 1 所述的单株抗体,其特征在于,该单株抗体可辨识在结构上以 β 褶版为主的普立昂蛋白。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的单株抗体,其特征在于,该单株抗体可辨识形成 β 寡聚体的普立昂蛋白。
4. 根据权利要求 1 所述的单株抗体,其特征在于,该单株抗体的抗原决定位位于普立昂蛋白的胺基酸 141-152(SEQ ID NO. 2)。
5. 根据权利要求 1 所述的单株抗体,其特征在于,该单株抗体的抗原决定位位于普立昂蛋白的胺基酸 171-182(SEQ ID NO. 3)。
6. 一种特异性侦测感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的抗体的制造方法,其特征在于,包含:
 - (a) 制备一种在结构上以 β 褶版为主的重组型普立昂蛋白;
 - (b) 将所得的重组型普立昂蛋白免疫小鼠产生抗体;及
 - (c) 分离及纯化出该抗体。
7. 根据权利要求 6 所述的制造方法,其特征在于,该抗体包括单株抗体及多株抗体。
8. 根据权利要求 6 所述的制造方法,其特征在于,该重组型普立昂蛋白在结构上会自动由 α 转变成 β 褶版形式为主,且自动聚合成 β 寡聚体。
9. 根据权利要求 6 所述的制造方法,其特征在于,该重组型普立昂蛋白包含 Ser-132、Asn-181、Cys179、Cys-214 四个位点的突变。
10. 一种特异性侦测感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的诊断套组,其特征在于包含根据权利要求 1 所述的单株抗体。
11. 一种普立昂疾病检测方法,其特征在于,包含:
 - (a) 取得脑部组织样本;及
 - (b) 利用如权利要求 1 所述所述的单株抗体进行免疫分析,侦测样本中是否存在感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc})。
12. 根据权利要求 11 所述的普立昂疾病检测方法,其特征在于,该脑部组织样本为脑组织均质液。
13. 根据权利要求 12 所述的普立昂疾病检测方法,其特征在于,该免疫分析为西方墨点转渍法。
14. 根据权利要求 11 所述的普立昂疾病检测方法,其特征在于,该脑部组织样本为脑部组织切片。
15. 根据权利要求 14 所述的普立昂疾病检测方法,其特征在于,该免疫分析为免疫组织染色。
16. 根据权利要求 11 所述的普立昂疾病检测方法,其特征在于,该感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 在结构上以 β 褶版为主的普立昂蛋白。
17. 根据权利要求 16 所述的普立昂疾病检测方法,其特征在于,该感染性普立昂蛋白形成 β 寡聚体。

可辨认感染性普立昂蛋白质的单株抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明关于可专一性辨认感染性普立昂蛋白质 (scrapie prion protein, PrP^{Sc}) 的单株抗体,特别地,是关于可与普立昂蛋白质 C 端以 β 褶版 (β sheet) 为主的片段结合的单株抗体,及其用于检测普立昂疾病的用途。

背景技术

[0002] 普立昂疾病 (prion diseases) 又称作传染性海绵体脑部病变 (Transmissible spongiform encephalopathies, 以下简称 TSE), 病理特征是在脑部会出现海绵状空洞、神经元细胞死亡、星状细胞增生、组织染色出现淀粉斑块 (amyloid plaque); 临床特征通常在长时间的潜伏下会出现渐进式的行为、运动失调、痴呆等 (Ludlam, C. A., Lancet 351:1289-1290, 1998; Soto, C., Nature reviews Microbiology 2:809-819, 2004), 虽与其他神经性退化疾病如阿兹海默 (Alzheimer disease)、帕金森氏症 (Parkinson disease) 相似,但是独特的地方在于其具有传染性,会严重影响动物如羊骚痒症 (Scrapie)、狂牛症 (bovine spongiform encephalopathy, 以下简称 BSE), 以及人类如库贾氏症 (Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、**Gerstmann**-Straussler-Scheinker 氏症 (GSS)、致死性家族失眠症 (Fatal familial insomnia, FFI) 等。人类的普立昂疾病的致病原因可分为遗传性 :GSS、FFI、fCJD; 后天获得 :Kuru、iCJD、vCJD; 未知 :sCJD, 动物则是因为有吃自己同类尸体的习惯,而有传染性貂脑病变 (Transmissible mink encephalopathy), 及因牛误食羊骚痒症 (Scrapie) 的羊制成的肉骨粉,而产生的狂牛症 (BSE)。

[0003] 在公元 1986 年,英国首次爆发从未出现过造成大量牛只死亡的疾病,即为后来所知的狂牛症 (Wells, G. A., et al., The Veterinary record 121:419-420, 1987), 接着几年也开始在其他国家陆续出现案例,造成大规模流行。目前研究显示,BSE 的爆发可能是因为作为牛饲料添加的肉骨粉中,含有大量的羊骚痒症病原所致,这也暗示 TSE 似乎会跨越种别差异,而造成另一物种的疾病发生,人类的库贾氏病在 1920 年代初期被发现,为一种相当罕见的疾病,发生率约为每百万人口 0.5 ~ 1 名病例。此病的病理症状与狂牛症类似。

[0004] 过去几年来各国已经确信 BSE 是严重的问题,目前在病原的鉴定上,主要的检体来源都是“死后”的脑部组织,仅可由严重感染的牛只脑部组织做成乳剂后,以人工接种感染小鼠来证实 BSE 的病原是可传播感染的;但这类接种感染的方式却最少须 150 几天的感染期才能证实有无感染成立。而现今 WHO 及 OIE 所承认的诊断方法,是以死后检查临床症状、症状、显微病理变化、免疫组织化学染色技术及西方免疫墨点转渍法等,来作为普立昂疾病的诊断依据 (Hardt, M., et al., Journal of comparative pathology 122:43-53, 2000; Ingrosso, L., et al., Trends in molecular medicine 8, 273-280, 2002)。以下将分别叙述现有常用的几个 TSE 检测方法:

[0005] 1. 西方免疫墨点转渍法:原理是依据 PrP^{Sc} 被蛋白酶 K 水解后会产生 27 ~ 30kDa (PrP^{res}) 大小的讯号,将脑组织均质液与蛋白酶 K 反应后,接着利用单株抗体 6H4 (抗原决定位: DYEDRYRE) 侦测,此方法的好处是可以减少检测上的错误率,因为相对于用酵

素免疫分析法 (ELISA) 全长 PrP^C 部分没被水解掉进而干扰 PrP27-30 讯号的现象,此外也可以发现新的 PrP^{Sc} 种 (strain)。

[0006] 2. CEA/BioRad 检测:是将脑组织先经过一连串去活性 (denaturation) 及浓缩步骤后,进行利用两种单株抗体三明治型的酵素免疫分析法。此方法较其他方法的侦测灵敏度高,可到 0.5-2.0pmol,但是相对于其他方法,从纯化到浓缩脑组织液需要耗费相对多的时间及人力,也同样有会受到未完全被水解掉的 PrP^C 片段干扰的困扰。

[0007] 3. 结构依据 (conformation dependent) 免疫分析:是利用抗体对于原始及变性后的 PrP 有不同的键结能力,而建立的三明治酵素免疫分析法。抗体会辨认只在 PrP^{Sc} 变性后才出现的结构依据抗原决定位 (conformational epitope),特别是不用依赖蛋白水解酵素,故对于蛋白酶 K 敏感的 PrP^{Sc} 株 (strain) 仍旧可以侦测的到,但缺点是相对于其他快速检测方式,其需要较多的处理步骤。

[0008] 上述方式都具有潜在性的问题,由于其侦测极限过高 (目前具备最低侦测极限的检测方法是 CEA/Biorad 检测),而使许多牛只可能处于 PrP^{Sc} 潜伏阶段,还未出现任何临床症状,以致所获得的化学检测结果呈现伪阴性 (false negative)。另外,类似的情况也会发生在人类,目前对于“活着”的 CJD 患者的症状出现前 (pre-symptom) 检测仍旧在发展中,所以同样的问题在于,如果 vCJD 患者在未知的状态下进行手术、捐赠器官、输血等医疗行为,而鉴于 PrP^{Sc} 耐高温、不怕杀菌剂的特性,其一旦附着在手术器具上,便无法清除干净,接着就会发生传染造成医源性 (iatrogenic) CJD 案例的发生。另外,根据 PrP^{Sc} 的特性,检体取得后通常需要经过蛋白水解酶的处理,但是这样的处理会使得原本存在少量的 PrP^{Sc} 损失,逃过侦测极限而得到另外一种伪阴性的发生。总结上述,目前仍需要发展一种于临床症状发生前、活体状态下,采取的检体不需要经过蛋白水解酶的处理,而能够直接特异性地辨认 PrP^{Sc},并且提升侦测极限的检测方法。

[0009] 发展专一结合 PrP^{Sc} 结构的抗体,是一直以来研究普立昂疾病的重点,而普立昂蛋白的特点在于,它并不像其他感染性物质如病毒、细菌能够引起强烈的免疫反应,在 PrP 蛋白正常表达的动物 (Prnp^{+/+}) 于普立昂疾病发生的过程,因为正常 B 细胞、T 细胞表面即有广泛分布的 PrP^C,而 PrP^{Sc} 的初级结构可能与 PrP^C 相似,使得 B 细胞有免疫耐受性而没有免疫反应 (Bueler, H., et al., Cell 73, 1339-1347, 1993; Kascsak, R. J., et al., Journal of virology 61:3688, 1987; Prusiner, S. B., et al., The Journal of infectious diseases 167:602-613, 1993)。

[0010] 这几年来尝试不同策略,但仍旧无法发展出专一性高的辨认 PrP^{Sc} 抗体,最早在 1997 年, Korth 的团队利用重组牛蛋白制造出 15B3, 该抗体虽然可以免疫沉淀牛、小鼠、人类的 PrP^{Sc} 而非 PrP^C,但是在实际应用上却因为其对于普立昂蛋白质相对弱的结合能力,而使其无法实现于临床诊断 (Korth, C., et al., Nature 390:74, 1999)。因此,开始修正采用全长片段 (不包含 N 端) 的免疫原策略,制造 β 褶版为主的重组蛋白、增加酪胺酸 (tyrosine) 残基,根据不同的物种酪胺酸 - 酪胺酸 - 精胺酸 (tyrosine-tyrosine-arginine) 重复序列设计合成胜肽片段 (Paramithiotis, et al. 2003), 使用羊搔痒症相关纤维丝 (scrapie-associated fibril, SAF) (Morel, N., et al., The Journal of biological chemistry 279:30143-30149, 2004) 也生产出能够辨认 PrP^{Sc} 的抗体,但之后的实验却发现其仍旧能够辨认 PrP^C。截至目前,虽然生产出许多的抗 PrP 抗体能够辨认各种形式的 PrP,

但是对于纯化原始状态 (native)PrP^{Sc} 的辨认, 仅只剩下微弱的讯号。

发明内容

[0011] 于是, 本发明的一方面, 是关于一种特异性辨认感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的单株抗体, 其特征在于与包含普立昂蛋白的胺基酸 141-182 (SEQ ID NO. 1) 的肽片段结合。

[0012] 于本发明的一具体实施态样, 所述的单株抗体可辨识在结构上以 β 褶版为主的普立昂蛋白。于本发明的一具体实施态样, 所述的普立昂蛋白形成 β 寡聚体。

[0013] 于本发明的一些具体实施态样, 所述的单株抗体与包含普立昂蛋白的胺基酸 141-152 (SEQ ID NO. 2) 的肽片段结合。于本发明的一些具体实施态样, 所述的单株抗体与包含普立昂蛋白的胺基酸 171-182 (SEQ ID NO. 3) 的肽片段结合。

[0014] 本发明的另一方面, 是关于一种特异性侦测感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的抗体的制造方法, 其包含制备一种在结构上以 β 褶版为主的重组型普立昂蛋白; 将所得的重组型普立昂蛋白免疫小鼠产生抗体; 及分离及纯化出该抗体。所述的抗体包单株抗体及多株抗体。

[0015] 于本发明的一具体实施态样, 所述的重组型普立昂蛋白在结构上会自动由 α 转变成 β 褶版形式为主, 且自动聚合成 β 寡聚体。于本发明的另一具体实施态样, 所述的重组型普立昂蛋白包含 Ser-132、Asn-181、Cys179、Cys-214 四个位点的突变。

[0016] 本发明的又一方面, 是关于一种特异性侦测感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 的诊断套组, 其特征在于包含本发明的单株抗体。

[0017] 本发明的又另一方面, 是关于一种普立昂疾病检测方法, 其包含取得脑部组织样本; 及利用本发明的单株抗体进行免疫分析, 侦测样本中是否存在感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc})。于本发明的一些具体实施态样, 所述的脑部组织样本为脑组织均质液。于本发明的其他具体实施态样, 所述的脑部组织样本为脑部组织切片。

[0018] 于本发明的一具体实施态样, 所述的感染性普立昂蛋白 (PrP^{Sc}) 在结构上以 β 褶版为主的普立昂蛋白。于本发明的另一具体实施态样, 所述的感染性普立昂蛋白形成 β 寡聚体。

附图说明

[0019] 图 1 显示利用 ELISA 分析 (A) 及西方墨点法 (western blot) 分析 (B), 确认 A2、A3、3B 融合瘤细胞在 HAT 培养筛选下抗体的分泌情况。

[0020] 图 2 显示抗 -m β PrP 单株抗体 mAb-A2、A3 及 3B 的抗体异构型分析结果。

[0021] 图 3 显示利用点转渍 (dot plot) 方式比较单株抗体 A、A2、B、A3、C、3B 对于不同量的小鼠 β PrP 和重组牛 PrP 的辨认差异。

[0022] 图 4 显示以 ELISA 的方式比较 A2 (A)、A3 (B) 及 3B (C) 对于小鼠 β PrP 及 α PrP 辨识的差异的结果。

[0023] 图 5 为用胜肽扫描 (peptide scan) 分析单株抗体抗体抗原决定位序列结果。其中 A-C 将 93-230 的小鼠 PrP 序列分成 22 段, 并将这些胜肽片段覆盖于 96 免疫酵素分析盘内, 进行 ELISA 分析。D 为藉由胜肽扫描所得到抗原决定位, 相对抗体的示意图。

[0024] 图 6 为以西方墨点转渍法分析 mAb-A2、A3、3B 对正常小鼠脑组织均质液及感染性

小鼠脑组织均质液的辨识。其中样品包括,有 (+) 或无 (-) 经过 $50 \mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K 处理的正常小鼠脑组织均质液, NBH(lane3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15), 及感染性 PrP^{Sc}(10%22L) 小鼠脑组织均质液 (lane1, 2, 5, 6, 9, 10 及 13)。

[0025] 图 7 显示利用实验室自制的三株可辨认 PrP 的单株抗体 -A2、A3、3B 对已感染 22L PrP^{Sc} 病变的小鼠脑部切片和正常小鼠健康的脑部切片 (normal control) 进行免疫组织染色, 所呈现的结果为小脑区域。免疫前 (Pre-immune) 组是利用 BALB/c 小鼠免疫前血清, 在此作为阴性对照组 (Negative control), 左侧标示为所使用的抗体, 包括免疫前、A2、3B、A3; 下方标示为显微镜放大倍率, 前两栏为感染性小鼠切片, 第三栏是正常小鼠脑部切片。

具体实施方式

[0026] 本发明的其他特色及优点将于下列实施范例中被进一步举例与说明, 而该实施范例仅作为辅助说明, 并非用于限制本发明的范围。

[0027] 根据本发明所呈现的各种实施例, 下述各种仪器、装置、方法和其相关结果者, 实施例中为了方便读者阅读所使用的标题或副标题, 并不被限制在本发明的范围之内。

[0028] 实施例 1: 单株抗体的制造及特性分析

[0029] 单株抗体的制造

[0030] 首先将小鼠普立昂蛋白的四个位点 Ser-132、Asn-181、Cys179、Cys-214 作突变, 得到重组小鼠普立昂蛋白, 接着以电子顺磁共振 (Electron paramagnetic resonance, EPR)、旋光光谱仪 (Circular dichroism) 进行分析发现, 该重组的小鼠普立昂蛋白在低盐 pH=7 室温的状态下, 会自动由 α 转变成 β 褶皱形式为主, 且自动聚合成 β 寡聚体。因此将所制得会自发性结构转变的小鼠普立昂蛋白, 即小鼠 β PrP (被认为结构近似于 PrP^{Sc}), 做为免疫小鼠的免疫原, 制造出独特的单株抗体。

[0031] 每只 BALB/c 小鼠以 $50 \mu\text{g}$ 的大肠杆菌生产的重组小鼠普立昂蛋白, 结构以 β 褶皱为主 (mouse β PrP, 简称 m β PrP) 加入 1X PBS 将体积带大到 250ul, 并加入 250ul 完全 Freund's 佐剂, 在注射筒内混合均匀, 以腹腔注射的方式将抗原打入小鼠的体内, 接着 2 周后进行追加注射, 每只小鼠再以 $50 \mu\text{g}$ 的 m β PrP 加入 1XPBS 将体积带大到 250ul, 并加入 250ul 不完全 Freund's 佐剂 (Incomplete Freund's adjuvate), 在注射筒内混合均匀, 以腹腔注射的方式将抗原打入小鼠的体内, 之后每次追加注射后 1 周采集血液并分离血清进行酵素免疫分析法, 于第 5 次追加注射后, 抽血后分离出血清进行酵素免疫分析法, 决定小鼠, 准备进行细胞融合。

[0032] 施打 m β PrP 重组蛋白过后, 会促使脾脏内的 B 细胞产生特定抗体, 与癌化细胞融合行成可在体外培养且具特定抗体的细胞株, 本实验利用抗原免疫的小鼠 (BALB/c mice) 的脾脏与骨髓瘤细胞株 NS-1 进行融合。接着将细胞培养于 HAT 培养基 (HAT growth medium), 分装到 6 个 96 孔培养盘中, 静置 7 ~ 14 天观察细胞生长状况。以 3 种限制性稀释 (快速稀释细胞法, 慢速稀释细胞法及细胞计数法) 的方式, 得到单一母细胞所产生的单株抗体, 并以酵素免疫分析法及西方墨点法进行特异性确认。最后我们分别得到 3 株 m β PrP 单株抗体细胞, A2、A3 及 3B (图 1)。

[0033] 接着将单株抗体细胞株植入小鼠腹腔内生长, 由腹水取得高浓度的单株抗体。由于单株抗体细胞培养液中的 HAT 培养基对于小鼠是具有毒性的, 所以须将筛选出的单株抗

体细胞更换成一般 RPMI 培养液,才能植入小鼠体内得到高浓度的单株抗体。之后进行腹水中的单株抗体纯化,将 0.5ml 蛋白 G/A 琼脂糖 (protein G plus protein A agarose) 装到管柱内,以 1ml 1XPBS 清洗琼脂糖,将 1XPBS 等量混合均匀的腹水共 6ml 加到管柱内,重复流过管柱 3~5 次,加入 5ml 的 1XPBS 清洗琼脂糖,再加入 10ml 0.5M NaOAC (pH=3)+0.01% 迭氮化钠 (sodium azide) 到管柱,纯化出抗体,重复 3-5 次,加入 2.5ml 2M Tris base+0.01% 迭氮化钠到第一批纯化抗体,平衡酸碱值;加入 5ml 10mM 甘氨酸 (pH=3)+0.01% 迭氮化钠到管柱,纯化出抗体,重复 3-5 次,加入 1.25ml 2M Tris base+0.01% 迭氮化钠到第二批纯化出的抗体,平衡酸碱值。取出浓缩离心管,将二批抗体混合,使用浓缩管浓缩至 1ml 以下,浓度定量后,分装每管 100 μ g 的量 (用于嗜菌体呈现技术),其余存放在 -20°C / -80°C 。

[0034] 抗 $-m\beta$ PrP 单株抗体 mAb-A2、A3、3B 的异构型鉴定

[0035] 将 2.5 μ g/ml 免疫球蛋白覆盖在 96 孔免疫酵素分析盘内,一抗用培养中的融合瘤细胞 A2、A3、3B 的培养上清液,二抗使用不同免疫球蛋白 (结合 HRP 辨识重链的抗 $-IgA$ 、 IgM 、 $IgG1$ 、 $IgG2a$ 、 $IgG2b$ 及 $IgG3$ 抗体;结合 HRP 辨识轻链的抗 $-k$ 链及 λ 链抗体),测读 490 波长,可测得单株抗体的免疫球蛋白的重链与轻链。结果显示,本发明所制得的三株 $m\beta$ PrP 单株抗体 A2、A3 及 3B 的免疫球蛋白,其重链为 IgM ,轻链为 k 链 (参见图 2)。

[0036] 使用点转渍 (dot plot) 方法比较单株抗体 A2、A3 与 3B 对于不同量的 $m\beta$ PrP 和重组牛 PrP 的辨认差异

[0037] 利用点转渍 (Dot blot) 分析在原始的 (native) 结构状态下,相同物种的 PrP 蛋白会以不同的立体结构存在型式, $m\alpha$ PrP 是以单体 (monomer) 存在, $m\beta$ PrP 则以寡聚体 (oligomer) 存在。将 5 μ g、1 μ g、0.5 μ g、及 0.1 μ g 的 $m\beta$ PrP 及 $m\alpha$ PrP 点在 PVDF 转渍膜上,接着加入 5% 牛奶阻断 (blocking),使用不同倍率稀释的 mAb A2、A3、3B 单株抗体反应为一级抗体,以小鼠免疫前的血清作为负对照组,进行反应。结果参见图 3。

[0038] 由图 3A 显示,A2 单株抗体在 10 μ g/ml 到 50 μ g/ml 浓度之间对于 $m\beta$ PrP 辨认的极限较好,能够侦测到 0.1 μ g 的蛋白,但是对于 $m\alpha$ PrP 只侦测能到 1 μ g;浓度 1 μ g/ml 下的 A2 单株抗体对于 10 μ g $m\alpha$ PrP 有微弱的讯号,相对在 $m\beta$ PrP 则没有。图 3B 显示,A3 单株抗体在 10 μ g/ml 到 50 μ g/ml 浓度之间对于 $m\beta$ PrP 的辨识讯号较对于 $m\alpha$ PrP 好,尤以星号标示处更为显著,但在抗体浓度 1 μ g/ml 下,其对于该二蛋白的辨识度就无差异。图 3C 则显示,单株抗体 3B 在浓度 1 μ g/ml 到 20 μ g/ml 浓度之间对于 5 μ g $m\beta$ PrP 的辨认情形较对于 $m\alpha$ PrP 的优,且 3B 单株抗体在浓度 50 μ g/ml 下,对于 0.1 μ g $m\beta$ PrP 的辨认情形比 $m\alpha$ PrP 好,其他则没有太大的差异。综合上述,mAb A2、A3、3B 三个单株抗体对于 $m\alpha$ PrP 或 $m\beta$ PrP 皆能够辨认,而该等单株抗体在 10 μ g/ml 到 50 μ g/ml 之浓度间,对于 $m\beta$ PrP 的侦测极限较对于 $m\alpha$ PrP 的好。

[0039] ELISA 分析抗 $-PrP$ 单株抗体 A2、A3、3B 对于 $m\beta$ PrP 及 α PrP 辨识的差异

[0040] 亦进行 ELISA 分析,将各单株抗体对于不同蛋白的辨认情形以数值方式呈现。将 200ng/well 的小鼠 β PrP、 α PrP 蛋白各自覆盖于免疫酵素分析盘的孔内,接着加入经不同倍率稀释的 mAbs A2、A3、3B 单株抗体为第一抗体,二抗为抗-小鼠 IgM (1:4000),进行反应,接着以 OPD 成色。结果显示,单株抗体 A2、A3 及 3B 在 1 μ g/ml 到 200 μ g/ml 浓度之间,对于 $m\beta$ PrP 的辨认较对于 $m\alpha$ PrP 的辨视能力好 (参见图 4)。在重组蛋白辨识的结果统合包括图 1 结果,可以知道在蛋白质存在自然 (native) 型式下,本发明的单株抗体可以辨认另

外一个物种（牛）来源的 PrP, 并且对于单体及寡聚合体有不同的亲和性。

[0041] 实施例 2 : 单株抗体的抗原决定位序列分析

[0042] 胜肽扫描 (peptide scan) 分析

[0043] 将 93-230 的 mPrP 序列分成 22 段, 每段 12 个氨基酸组成, 各有 6 个氨基酸重复, 将这些胜肽片段覆盖于 96 免疫酵素分析盘内, 进行 ELISA 分析, 一抗使用纯化过的 A2、A3、3B 单株抗体, 并利用抗 - 小鼠 IgM 结合 HRP 的多株抗体做为二次抗体。

[0044] 利用胜肽扫描结果如图 5, 发现单株抗体 A3 的胜肽抗原决定位在 141-152GNDWEDRYREN (SEQ ID NO. 2), 而单株抗体 A2 与 3B 的抗原决定位则是位在同一位置, 171-182QNNFVHDAVCIT (SEQ ID NO. 3)。

[0045] 嗜菌体呈现技术

[0046] 随机挑选经过四次筛选的嗜菌体群落并且抽取其 DNA 送定序整理结果如下, 序列后的括号代表 (出现次数 / 所挑选的全部序列数量), 粗体字代表交叉比对都有出现的序列, 统整可能的序列于每个表格最下面一列, 底线代表比对回去有的序列。

[0047] 抗体 : mAb-A2

[0048]

嗜菌体群落的序列	PVSAVRP (5/10) TAP V SPI/S (2/10) PGQD A VM (1/10) GPRDPRD (1/10) TAAG-S- (1/10)
可能的抗原决定位	164-R PVD QYSNQN NFVHD A VCIT-182

[0049] 抗体 : mAb-A3

[0050]

嗜菌体群落的序列	RVNTK L/P I (11/20) LKTRVIS (5/20) TPARHIY (1/20) AYPSAHR (1/20) - RLVLF- (1/20)
可能的抗原决定位	NA

[0051] 抗体 : mAb-3B

[0052]

嗜菌体群落的序列	DIPYQQ F/S (10/20)
	<u>RPK</u> xxxx (1/20)
	ASNRPYV (7/20)
	ITLSGGI (1/20)
	TPPRHIY (1/20)
可能的抗原决定位	23-MKK <u>RPK</u> PGGWNTGGSRY <u>PGQG</u> SP-45

[0053] 整合上述结果, A2 总共得到 5 种嗜菌体序列, 利用交叉比对的方式对照出有重复出现的序列对回小鼠 PrP 为 163-RPVDQYSNQNNFVHDAVCIT-182 (SEQ ID NO. 4), A3 得到的 5 种序列, 无法找到相对应的序列, 3B 则是由 5 种序列统合, 比对到接近 N 端的位置 23-MKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSP-45 (SEQ ID NO. 5) 三个抗体的决定位。

[0054] 因此得知, A3 的抗原决定位为 141-152GNDWEDRYREN (SEQ ID NO. 2), A2、3B 则在同一位置 171-182QNNFVHDAVCIT (SEQ ID NO. 3), 三种单株抗体的抗原决定位在不同物种的氨基酸序列有高度保留性。

[0055] 实施例三: 抗 -PrP^{Sc} 单株抗体对正常小鼠脑组织及感染性小鼠脑组织的辨识

[0056] 西方墨点转渍法分析

[0057] 本实验利用西方墨点转渍法分析 mAb-A2、A3、3B 对正常小鼠脑组织均质液及感染性小鼠脑组织均质液的辨识差异, 样品来源分为正常小鼠脑组织均质液, NBH (lane3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15) 及感染性 PrP^{Sc} (10%, 22L) 小鼠脑组织均质液 (lane1, 2, 5, 6, 9, 10 及 13), 有 (+) 或无 (-) 经过 50 μg/mL 蛋白水解酶 K 于 37°C 下处理 1 小时, 接着加入 5mM PMSF 处理 10 分钟以中止反应。将反应完的样品跑 SDS-PAGE 做西方墨点转于 PVDF 膜上, 一级抗体使用 mAb-A2、A3、3B、SAF32, 二级抗体用结合 HRP 的抗 - 小鼠 IgM、IgG 抗体 (1:10000) 进行反应, 接着以 ECL 成色。

[0058] 由西方墨点转渍法分析结果可发现, 在没有经过蛋白水解酶 K 的处理下, 本发明的单株抗体都能够辨认 PrP^{Sc}, 且彼此之间对于糖基化的辨认型态 (pattern) 有所不同, 辨认讯号强度也较正常小鼠脑组织强 (参见图 6)。由上述结果, 本发明知单株抗体可应用于发展在临床症状发生前、活体状态下, 采取的检体不需要经过蛋白水解酶的反应, 就能够直接特异性的辨认 PrP^{Sc} 的诊断方法及套组, 有效节省样本处理与侦测所需耗费的劳力与时间。

[0059] 免疫组织染色 (Immunohistochemistry)

[0060] 利用本发明制得的三株可辨认 PrP 的单株抗体 -A2、A3、3B, 对已感染 22LPrP^{Sc} 病变的小鼠脑部切片, 和正常小鼠健康的脑部切片 (normal control) 进行免疫组织染色, 来侦测 PrP^{Sc} 蛋白在小鼠脑部组织的表现。样品切片来源分别为正常小鼠脑部 (normal control), 以及感染性小鼠脑部, 染色后, 以显微镜观察并照相 (倍率 100 倍及 200 倍), 小脑区域为主, 同时利用小鼠免疫前 (pre-immune) 的血清作为阴性对照组 (Negative control), 结果如图 7 所示。

[0061] 由切片的免疫组织染色结果可看到, 以单株抗体 A2 染色呈现点状 (plaque) 讯

号,主要分布在小脑灰质的颗粒层、分子层的神经细胞附近,以单株抗体 3B 的讯号也是以点状方式散布在小脑的颗粒层、分子层,而单株抗体 A3 的免疫组织染色讯号,则是散布(diffuse)在小脑白质(white matter),然而,以这些抗体染正常小鼠脑组织则没有看到明显的讯号。

[0062] 由于本发明的单株抗体的抗原决定位,在不同物种中具有高度保留性,所以能用于侦测各个物种的感染性普立昂蛋白,以及用于检测普立昂疾病,包括例如动物的狂牛症(BSE)、羊搔痒症(Scrapie)、人类的不同类型库贾氏症 CJD(包括散发型(sporadic)、变异型(variant)、医源性(atrogenic)、家族遗传性(familial)等)。而且,本发明的单株抗体除了能够于临床侦测 PrP^{Sc} 的存在,如抗体组织切片染色以及 Capture EIA 技术侦测血液、脑脊液检体之外,还能结合表面电浆共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)技术,进一步提升侦测极限与灵敏度。

[0063] 其他具体态样

[0064] 本说明书中所揭示的全部特征可以任何组合方式组合。于是,本说明书中所揭示的各别特征可由依相同、相等或类似目的的替代特征取代。因此,除非另行清楚地指示,所揭示的各特征仅为一系列同等物或类似特征的实例。

[0065] 从前述的说明,习于该项技艺人士可容易地确定本发明的基本特征,且在未偏离其范围下,可进行本发明的各种改变与修饰,以使其适于各种不同用途与状况。因此,于申请专利范围内亦包含其他具体态样。

[0001]

序列表

<110>法玛科技顾问股份有限公司

<120>可辨认感染性普立昂蛋白质(scrapie prion protein, PrP^{Sc})的单株抗体及其用途

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> mPrP141-182

<400> 1

Gly	Asn	Asp	Trp	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Met	Tyr	Arg	Tyr	Pro
1				5					10					15		
Asn	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Gln	Tyr	Ser	Asn	Gln	Asn	Asn	Phe
		20					25					30				
Val	His	Asp	Ala	Val	Cys	Ile	Thr									
35					40											

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> mPrP141-152

<400> 2

Gly	Asn	Asp	Trp	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn
1				5					10		

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

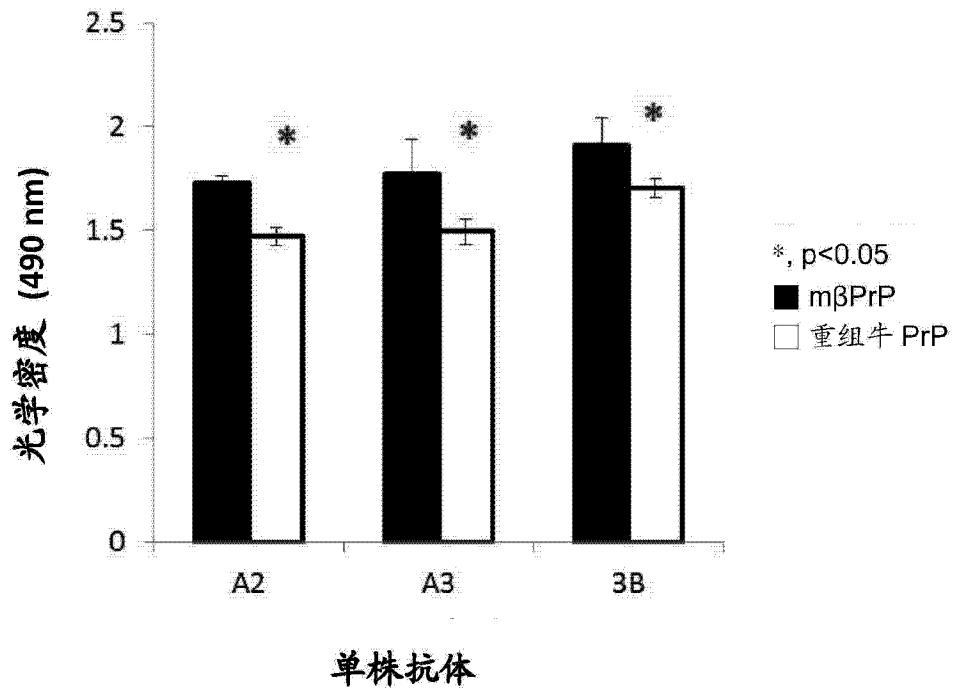
<213> 人造序列

<220>

<221> mPrP171-182

[0002]

A.



B.

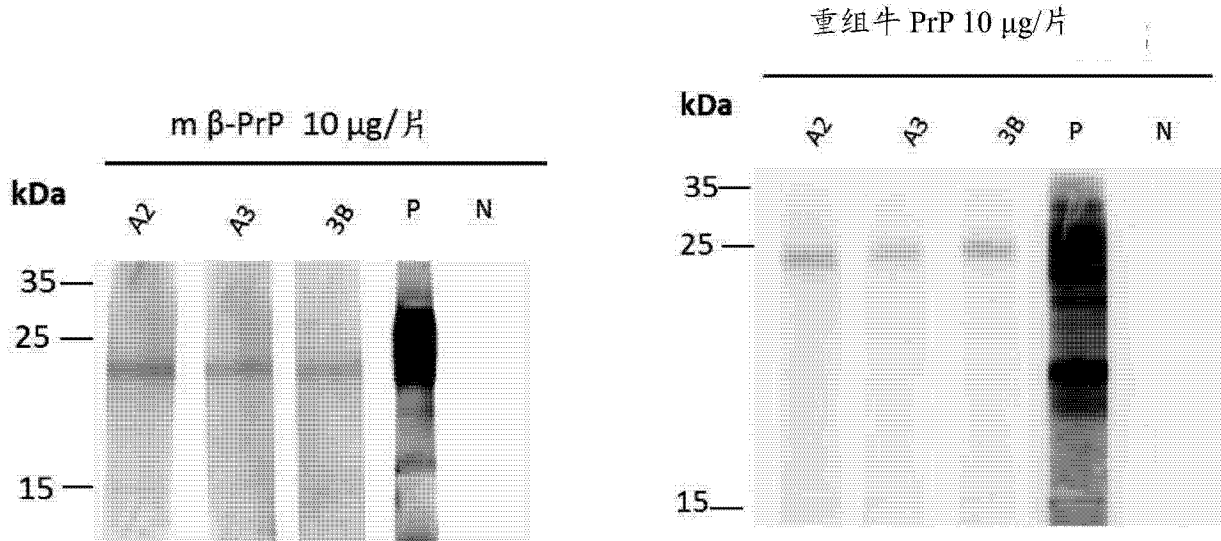


图 1

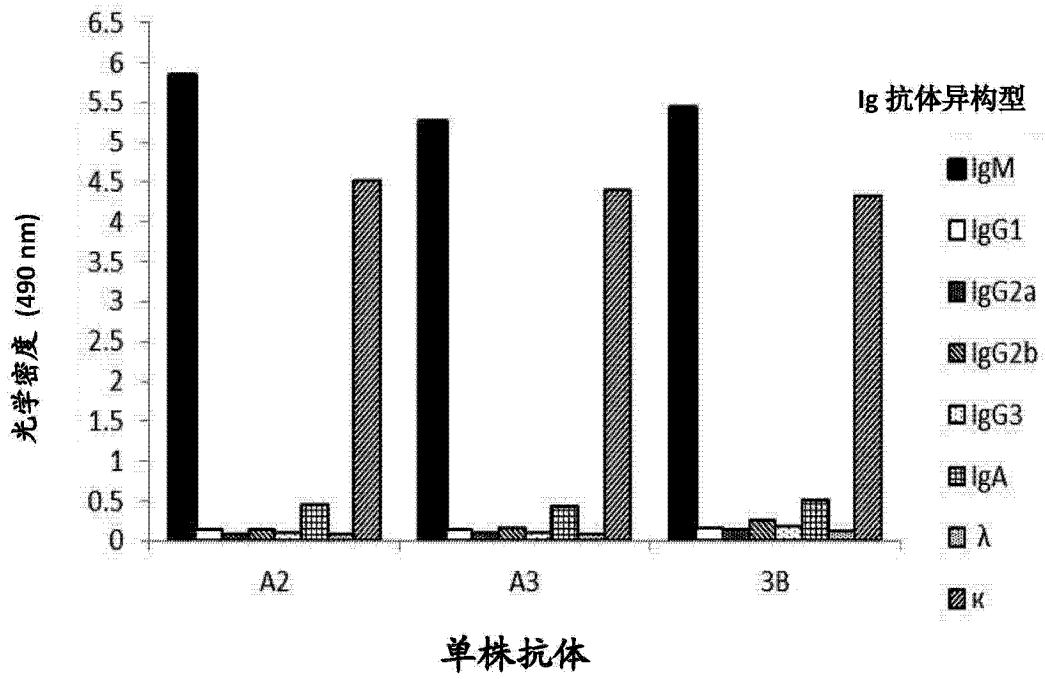


图 2

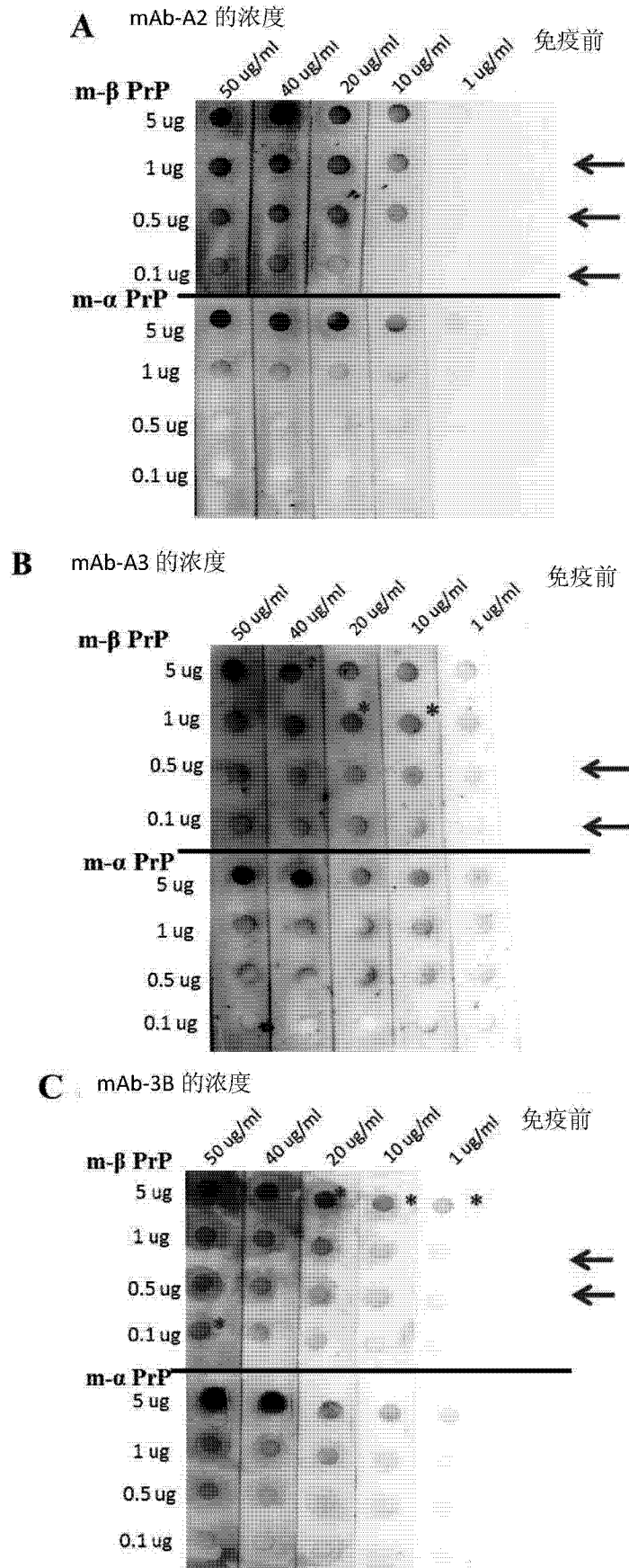


图 3

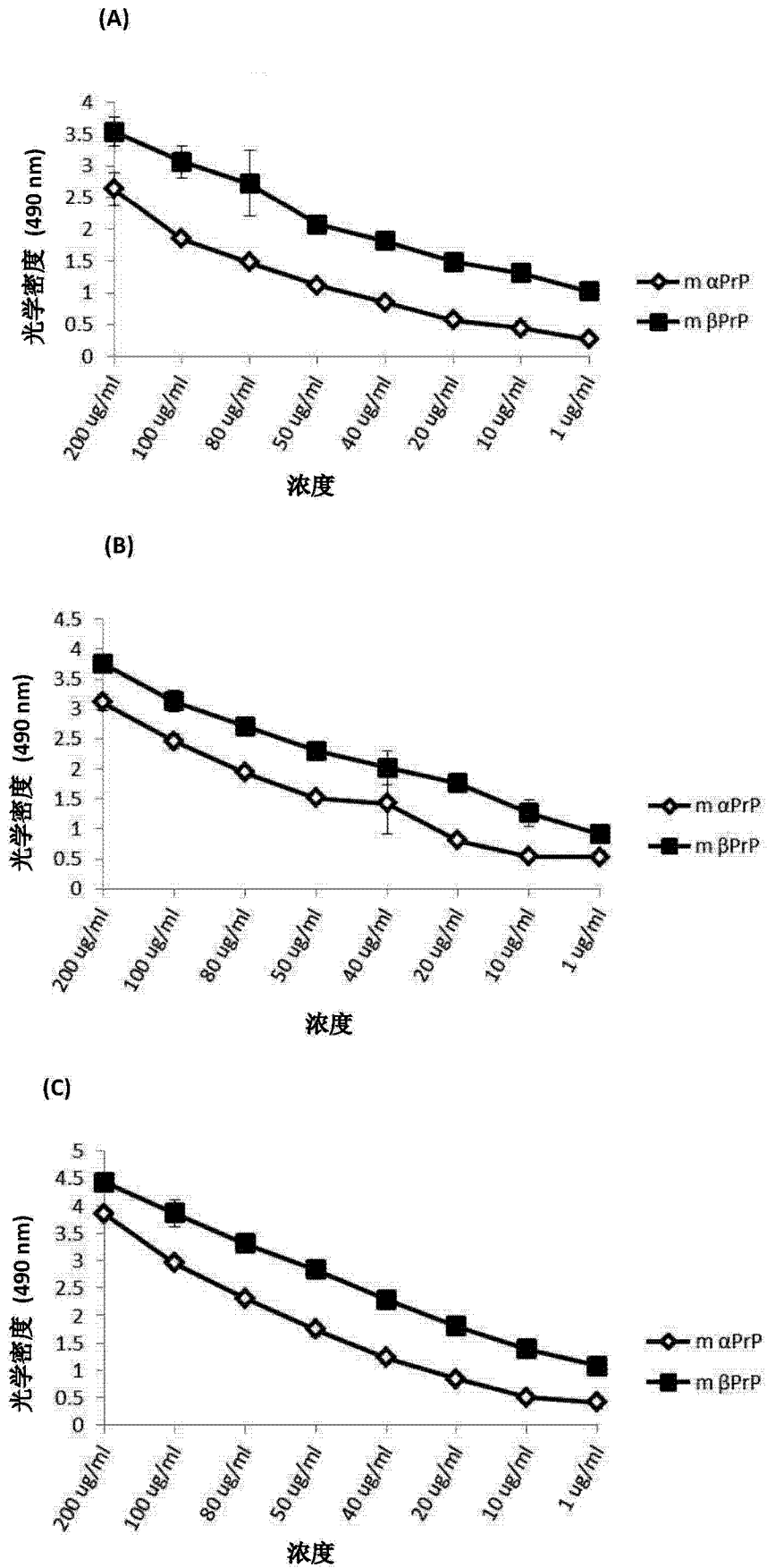
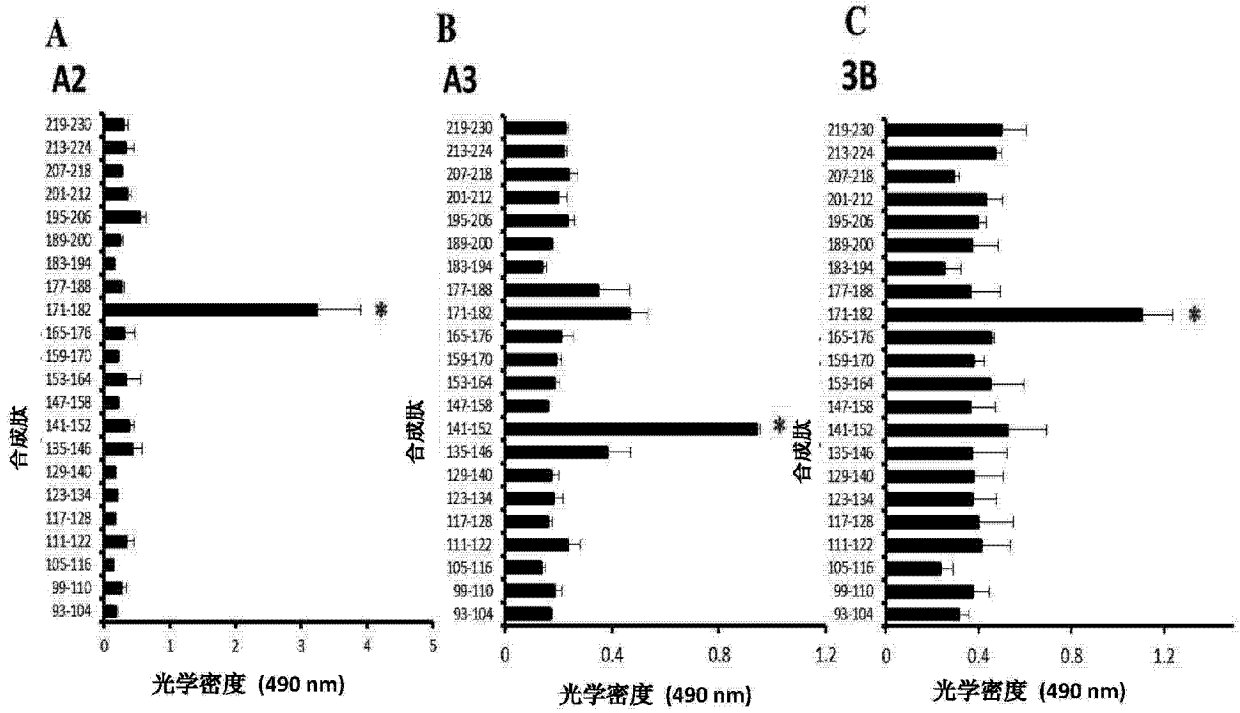


图 4



D

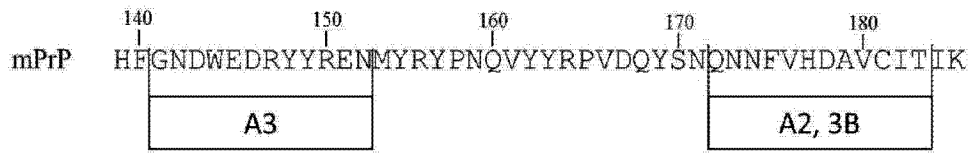


图 5

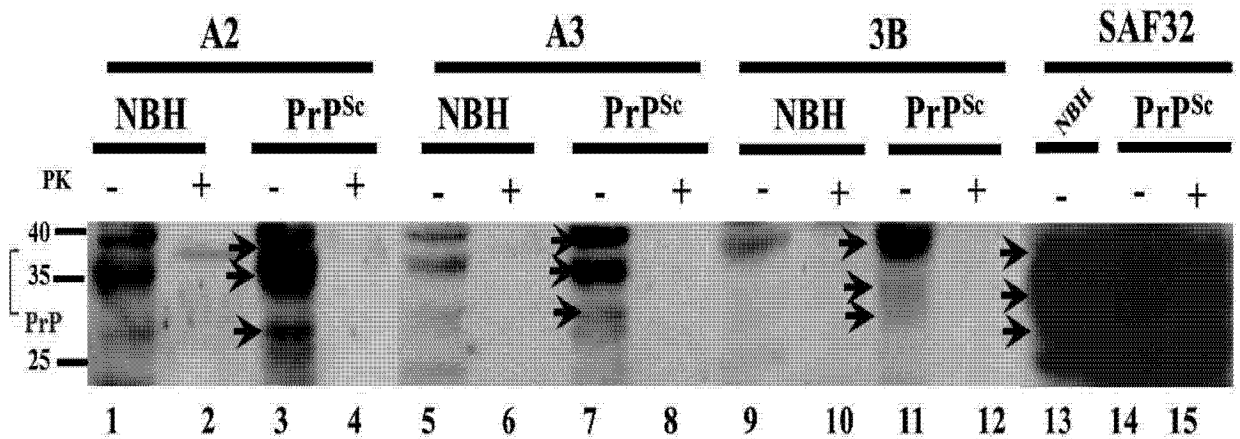
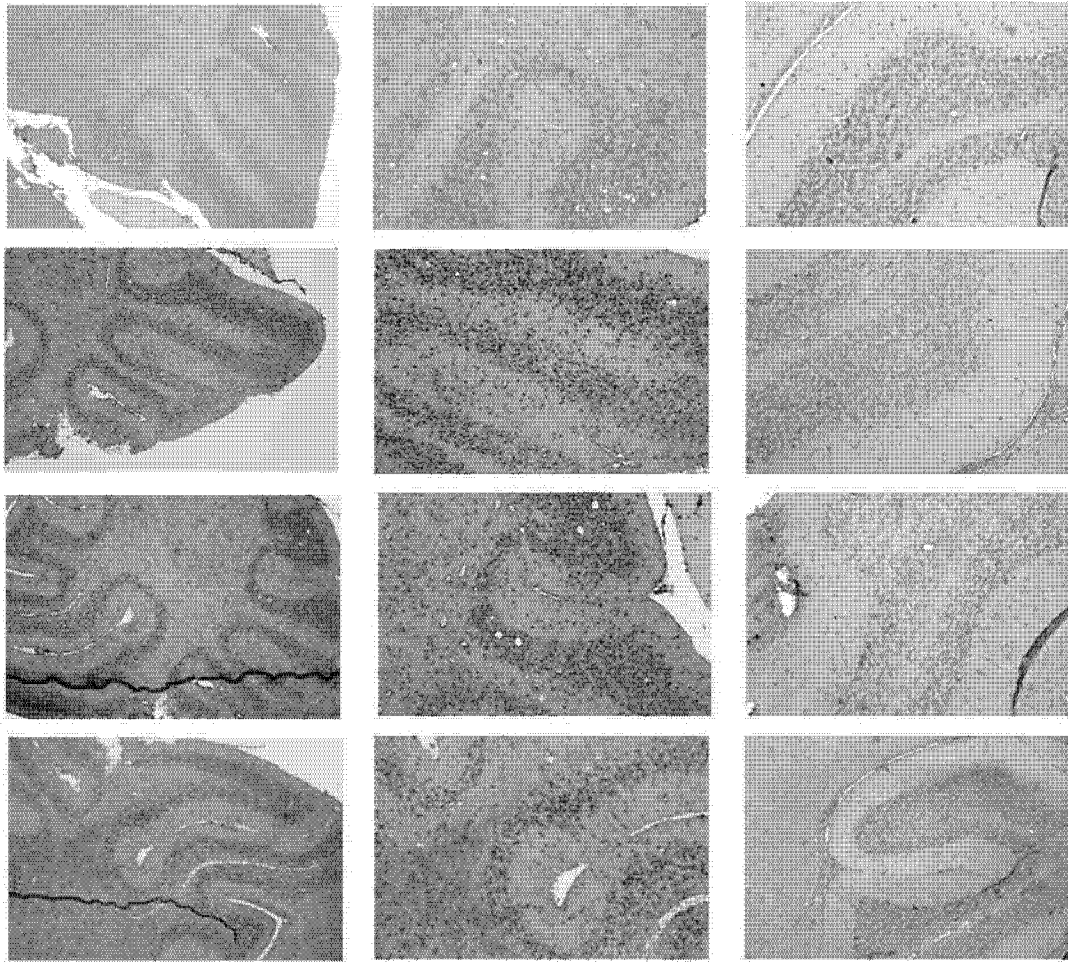


图 6

受 PrP^{Sc} 感染

正常对照组



100X

200X

200X

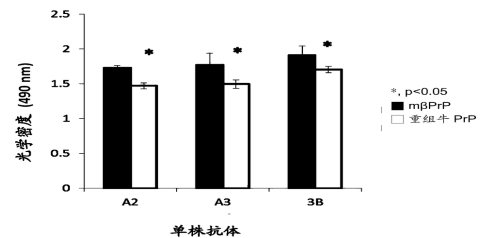
图 7

专利名称(译)	可辨认感染性普立昂蛋白质的单株抗体及其用途		
公开(公告)号	CN103897056A	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201310662163.1	申请日	2013-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	法玛科技顾问股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	法玛科技顾问股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	法玛科技顾问股份有限公司		
[标]发明人	陈宜民 黄思惟 林盈好		
发明人	陈宜民 黄思惟 林盈好		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K2317/34 G01N33/577 C07K2317/33 C07K2317/52 G01N33/6854 G01N33/6878 C07K16/18 C07K16/44 C07K16/2872 G01N33/6896 G01N2800/2828		
代理人(译)	申健		
优先权	101149718 2012-12-25 TW		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是关于可用于特异性辨认感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})的单株抗体，本发明的单株抗体特征在于不需要经过蛋白水解酶的反应，就能够直接特异性地辨认PrP^{Sc}蛋白，可提供用来建立一种高特异性及高灵敏度的普立昂疾病检测方法与套组。

A.



B.

