



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103974978 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201280057908. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 26

C07K 16/40 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/53 (2006. 01)

11190787. 9 2011. 11. 25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/073608 2012. 11. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/076304 EN 2013. 05. 30

(71) 申请人 德国弗劳恩霍夫协会债权安格万特
学术研究所

地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 S · 巴恩 K · 科尔伯格 C · 帕特曼
S · 施密斯

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 马莉华 崔佳佳

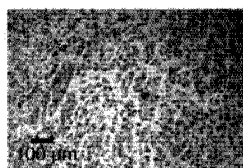
权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

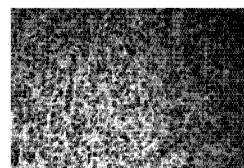
用于检测 SNAP/CLIP 标记物的单克隆抗体

(57) 摘要

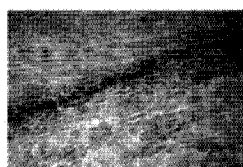
一种与 SNAP 基序和 CLIP 标记物特异性结合的单克隆抗体, 包含具有氨基酸序列 SEQ ID No. 3, 4, 5 和 8, 9, 10 的 CDR。



PBS-对照



抗-SNAP Ak



H22-SNAP+抗-SNAP Ak



425 (scFv) -SNAP+抗-SNAP Ak

1. 一种与 SNAP 标记物基序和 CLIP 标记物特异性结合的单克隆抗体,所述单克隆抗体包含具有氨基酸序列 SEQ ID No. 3, 4, 5 和 8, 9, 10 的 CDR。
2. 如权利要求 1 所述的抗体,其特征在于,所述抗体是鼠科抗体。
3. 一种编码权利要求 1 或 2 所述抗体的核酸。
4. 如权利要求 3 所述的核酸,其特征在于,所述核酸具有 SEQ ID No. 1 或 6 所示的核酸序列。
5. 一种制备权利要求 1 所述抗体的方法,其特征在于,借助 SNAP 标记物蛋白在非人类哺乳动物,特别是小鼠中实施免疫,从中获得杂交瘤细胞,通过结合试验鉴定同时识别 SNAP 和 CLIP 标记物的抗体细胞系。
6. 如权利要求 1 或 2 所述抗体的用途,用于检测 SNAP 和 / 或 CLIP 标记物。

用于检测 SNAP/CLIP 标记物的单克隆抗体

[0001] 本发明涉及用于检测 SNAP/CLIP 标记物的单克隆抗体, 编码该抗体的核酸和该抗体用于检测含有 SNAP/CLIP 标记物的蛋白的用途。

[0002] SNAP 和 CLIP 标记技术是一种相对年轻的技术。它是给靶蛋白, 特别是融合蛋白提供所需配体的精细方法。

[0003] WO20009/114748A1 披露了 SNAP-25 组合物, 制造 α -SNAP-25 抗体的方法, α -SNAP-25 抗体, 检测 BoNT/A 活性的方法和检测中和 α -BoNT/A 抗体的方法, 所述 α -SNAP-25 抗体与某种表位结合, 而所述表位包含 SNAP-25 切割产物的 BoNT/A 切割位点易切断键的 P1 残基处的羧基末端。

[0004] M. Yamamoto, L. Hassinger, J. E. Crandall 在 *Journal of Neurocytology* 19, 619-627 (1990) 报道了阶段特异性神经突相关蛋白在发育中大鼠大脑和小脑皮质中的超微结构定位。SNAP/TAG-1 是 135kDa 的糖蛋白, 在发育的啮齿动物 CNS 中生长轴突子集的表面表达。采用免疫电子显微术和识别 SNAP/TAG-1 (4D7) 的单克隆抗体以及过氧化物酶偶联的二抗, 分析了大鼠的胚胎期第 17 天大脑皮层和出生后第 4 天和第 8 天小脑皮层中这种抗原的超微结构定位。在胚胎皮层, 免疫反应性与位于中间区 (intermediate zone), 基板 (subplate) 和皮质板 (cortical plate) 的有限组的神经轴突的质膜, 神经元胞体 (neuronal somata) 以及它们的主导过程相关。免疫反应性轴突结合在一起成为 10-20 个的一组, 并与非免疫反应性轴突隔开。有些生长锥呈免疫反应性, 然而不是所有 4D7- 免疫反应性轴突的生长锥显示染色。在出生后的小脑中, 免疫反应活性与位于外部颗粒细胞层 (external granule cell layer) 的最内部分的颗粒细胞的胞体和轴突相关。在大脑和小脑皮层, 免疫反应活性以间插方式出现在相邻细胞膜的对应点, 规律性的周期为 100-200nm。该文献讨论了 SNAP/TAG-1 用作发育 CNS 中特定亚组轴突的粘附分子的可能性。

[0005] Richard J Ward, John D Pediani, 和 Graeme Milligan 在 *British Journal Pharmacology* (2011), 162, 1439-1452 中报道了通过 N-端 SNAP 和 CLIP- 标记技术评估配体诱导的食欲肽 OX_1 和大麻素 CB_1 受体的内在化。通过抗体识别表位标签和荧光团与 O^6 - 烷基鸟嘌呤 -DNA 烷基转移酶变体的共价结合检测每一种受体结构的细胞表面形态。可采用各方法监测对激动剂而非拮抗剂作起反应的受体内在化, 但当使用 SNAP 标记物的新型、时间分辨荧光探针时, 灵敏度最高是其它方法的 6-10 倍以上。然而, 就 CLIP 标记物而言, 灵敏度没有提高, 可能由于非特异性结合水平较高。

[0006] SNAP 标记物基于人 DNA 修复酶 O(6)- 烷基鸟嘌呤 -DNA 烷基转移酶。后者已通过引入突变而得到改变, 其改变程度使得可以选出具有更小分子体积并对苄基鸟嘌呤具有极高亲和力的蛋白变体。SNAP 标记物与苄基鸟嘌呤衍生物高度特异性反应, 使苄基与自身共价偶联的底物结合并切除鸟嘌呤。作为一种重组蛋白标记物, 它能共价和化学计量地限定各种苄基鸟嘌呤修饰底物与融合蛋白的偶联。CLIP 标记物是通过诱变从 SNAP 形成, 其与苄基胞嘧啶衍生物而非苄基鸟嘌呤发生高度特异性反应。因此, 可能在一个实验方法中同时差别性标记 SNAP 和 CLIP 标记物。SNAP 技术 (SNAP/CLIP 质粒和底物) 由新英格兰生物试验室公司 (NEB) 分销。

[0007] 在“Journal of Biomedicine and Biotechnology”, Vol. 2010 的 ID658954, doi:10.1155/2010/658954 的文章中 Aliprandi 等人披露了一种以 VHH 形式的重组抗 SNAP 的抗体。

[0008] 有一种能同时检测 CLIP 和 SNAP 标记物的分析工具是最好。

[0009] 本发明的目的通过权利要求 1 所述的抗体得以实现。本发明的单克隆抗体特异性地结合 SNAP 标记物基序和 CLIP 标记物并包含具有氨基酸序列 SEQ ID No. 3, 4, 5 和 8, 9, 10 的 CDR。特别是, 本发明的抗体是鼠科抗体。

[0010] 本发明的主题也是编码本发明抗体的核酸, 特别是具有 SEQ ID No. 1 或 6 所示核酸序列的核酸。

[0011] 本发明抗体可通过本发明方法获得, 其中借助 SNAP 标记物蛋白在非人类哺乳动物, 特别是小鼠中实施免疫, 以及从中获得杂交瘤细胞, 通过结合试验鉴定同时识别 SNAP 和 CLIP 标记物的抗体细胞系。

[0012] 本发明抗体同时检测 SNAP 和 CLIP 标记物的用途。Aliprandi 等描述了能识别 SNAP 标记物的重组抗体。本发明的抗体可以用于染色组织切片。本发明的鼠科抗 -SNAP 抗体可以用于, 特别是染色冷冻切片和石蜡切片。与 Aliprandi 等人已经发表过的抗体相比, 本发明抗体的优越性在于其更高的价位, 重组蛋白只能识别一个表位, 而本发明抗体能识别两个表位。

[0013] 图 1: 免疫组织化学; 用 HAI (抗 -EGFR) 和 M2D11 染色从小鼠获得的 A431 肿瘤冷冻切片。

[0014] 图 2: 流式细胞术; 图片显示在流式细胞术中 M2D11 和两种不同的 SNAP 融合蛋白结合。

[0015] 图 3: Western blot 分析: 两个图片显示, 一方面在变性凝胶中 M2D11 与 SNAP 和 CLIP-EGF 两种蛋白结合。

[0016] 图 4: Western blot 分析; 此图片显示检测溶液中 M2D11 和 SNAP 蛋白结合的天然聚丙烯酰胺凝胶印迹。

[0017] 本发明的抗体能同时检测 SNAP 标记物和 CLIP 标记物。本发明的抗体的优势在于可以在流式细胞术中检测 SNAP 融合蛋白。该抗体在 ELISA (酶联免疫吸附测定) 和 Western blot 中的灵敏度与 Aliprandi 等人描述的抗体相似。

[0018] 除了描述的方法, 免疫组织化学试验中测验本发明抗体。它可以用于检测冷冻切片和石蜡切片中的 SNAP 融合蛋白。

[0019] 在特定的实施例中, 抗体是单克隆抗体。特别是, 抗体可以是鼠源的。鼠科抗体有优越性的原因在于鼠科 IgG 抗体属于分子生物学研究中最常用的抗体形式。因此, 很多实验室的技术人员熟悉使用这类抗体和检测鼠科 IgG 抗体。

[0020] 本发明抗体的重链可变区示于 SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 1 涉及编码该区的核酸。

[0021] 本发明抗体的轻链可变区示于 SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 6 涉及编码该区的核酸。

[0022] 本发明抗体重链的 CDR 见氨基酸序列 SEQ ID No. 3-5。本发明抗体轻链的 CDR 见氨基酸序列 SEQ ID No. 8-10。

[0023] 本发明也涉及编码所述蛋白的核酸, 尤其是 SEQ ID No. 1 和 6。

[0024] 本发明还涉及制备本发明抗体的方法, 其中借助 SNAP 标记物蛋白在非人类哺乳

动物,特别是小鼠中实施免疫。从中获得杂交瘤细胞系以及通过相应的结合试验鉴定能同时识别 SNAP 和 CLIP 标记物的抗体细胞系。

[0025] 本发明的抗体可以分别用于检测 SNAP 和 CLIP 标记物,也可以是二者的组合。

实施例

[0026] 聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot

[0027] 在 Laemmli 缓冲液中使待分析的样本变性(或在不含 SDS 的天然样本缓冲液中)并在 12% (w/v) SDS 的聚丙烯酰胺凝胶和聚丙烯酰胺凝胶 (160V, 60min) 上进行电泳。蛋白用考马斯染色法显色或转移到硝酸纤维素膜 (Whatman, Schleicher&Schuell, Dassel, 德国) (350mA, 70 分钟) 显现。转移后,膜在室温下用 1% (w/v) BSA 阻断 1 小时。在 PBS-T 中洗涤三次后,蛋白印迹与一抗温育 (1 小时)。在进一步三次洗涤步骤后,用酶偶联的二抗 (1 小时) 和对应的底物 (10 分钟) 检测特异性结合。在对 SNAP 和 CLIP 蛋白的分析中,样本在变性前和 BG 或 BC 底物温育。结果在图 3 中显示。

[0028] 图 3. Western blot 分析。两张图片 3A, 3B 和 3C 显示,一方面, M2D11 与两种蛋白 SNAP 和 CLIP EGF 在变性凝胶中结合。抗体显示与其它 His₆- 标记蛋白 (GFP-Ki4) 没有交叉反应。此外,图 3B 显示抗体不与 SNAP 底物竞争与 SNAP 的结合。用 BG 生物素生物素化 SNAP 蛋白后,用 M2D11 进一步检测蛋白。另外,图 3C 显示抗体与不同的 SNAP-scFv 融合物 (H22-SNAP, SNAP-2715) 和与 CLIP-scFv-SNAP 融合蛋白结合。

[0029] 图 4: Western blot 分析。该图显示检测溶液中 M2D11 和 SNAP 蛋白结合的天然聚丙烯酰胺凝胶印迹。图 A 部分显示通过 Myc 标记物标记蛋白表明有 SNAP 蛋白存在。可以明显看出,在溶液中蛋白也与 M2D11 结合,而游离蛋白只有超过 1:4 的比例能被检测到。在图 B 部分,抗体被额外检测到以致可以显示两种蛋白的共定位 (colocalization)。

[0030] 免疫组织化学

[0031] 从源自具有 A-431 肿瘤的 BALB/c 小鼠 (DSMZ No. ACC91) 的 EGFR 阳性皮下肿瘤制备组织切片。杀死动物后,把肿瘤包埋入“荣格组织冷冻介质”(Leica Microsystems, Nussloch, 德国) 并冷冻于液氮。用 Leica3050s kryostat 制备 8um 的冷冻切片并干燥过夜。切片用丙酮固定 10 分钟,干燥并用 Immunopen (Sigma Aldrich) 勾画出轮廓。肿瘤细胞用 EGFR 特异性 scFv 融合蛋白 425scFv SNAP (0.034mg/ml) 作为一抗染色。用 PBST 三次洗涤后,用不同浓度的过氧化物酶标记抗体 M2D11 (储备液: 657ng/ μ l) 检测 SNAP 融合蛋白。两种抗体孵化步骤在室温下进行 45 分钟,洗涤步骤在室温下进行 5 分钟并振荡。用 PBST 洗涤两次和用 TBST 洗涤一次后,组织切片在 3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC) 溶液中温育直至染色可见。随后用苏木精进行复染,然后将切片安置在甘油凝胶中。结果显示于图 1。

[0032] 图 1: 免疫组织化学。用 425(scFv)-SNAP (抗-EGFR) 和 M2D11 染色从小鼠获得的 A431 肿瘤冷冻切片。

[0033] 流式细胞术

[0034] 用流式细胞仪 (Becton&Dickinson) 和 CellQuest 软件,通过流式细胞术分析 M2D11 的功能。就像检测 SNAP 融合蛋白与细胞特异性结合一样检测与不同细胞系细胞表面的非特异性结合。大约 4×10^5 细胞先在 100ul 的 PBS 中与 1-2 μ g SNAP/CLIP 融合蛋

白温育,然后在 100ul 的 PBS 中与 3.3ng M2D11 在冰上温育 30 分钟。为作检测,细胞与 GaM-PE(1:100,Dianova, 汉堡, 德国)在冰上温育 30 分钟。细胞随后用流式细胞术分析。在所有步骤之间,用标准细胞洗涤离心机进行 PBS 洗涤步骤。将细胞重悬在 300ul PBS 中以便测试。结果在图 2 中显示。

[0035] 图 2:流式细胞术;图片显示在流式细胞术中 M2D11 与两种不同的 SNAP 融合蛋白结合。在两种细胞系上,没有检测到或只检测到非常少的抗体与细胞表面的交叉反应。本文显示的 Mono Mac1 和 A431 细胞是例子。利用 PC-3、CHO-K1、Kasumi、Mcf-7、L3.6pl、L540 和 FG 细胞系额外进行了分析。

序 列表

〈120〉 用于检测SNAP/CLIP标记物的单克隆抗体

<130> 121843W0

<150> EP11190787.9

<151> 2011-11-25

<160> 10

«170» PatentIn version 3.3

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 336

<212> DNA

〈213〉 小鼠

 $\langle 400 \rangle$ 1.

caggtecaac	tgcagcagtc	tgggcctgaa	ctgatgagge	ctgggacttc	agtaaagatg	60
tcttgcgaagg	cttcaggcta	tctcttcacc	agttatttga	tgcactgggt	gaacacagagg	120
cctggacaag	gccttgagtg	gattgccatg	atcgatcctt	ccaatagtga	gacttgggtg	180
aateagaatt	tcaaggacaa	ggccacattg	aatgtagaca	aatcctccaa	gacagcctac	240
atgcagctca	gcaacctgac	atctgaggac	tcctgcagtct	attaactgtgc	aagaggggac	300
tactggggccc	aaggcaccac	tctcacagtc	tcttca			336

<210> 2

112

<212> PRT

〈213〉 小鼠

<400> 2

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Met	Arg	Pro	Gly	Thr
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Ala	Met	Ile	Asp	Pro	Ser	Asn	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asn	Gln	Asn	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Asn	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Lys	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Gln	Leu	Ser	Asn	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
			100					105					110		

7

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Gly Asp Tyr
1

<210> 6
<211> 330
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 6

gacattgtgc tgacacagtc tectgettcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc	60
atctcataca gggccagcaa aagtgtcagt acatctgget atagttatat geactggaac	120
caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatc ttgtatccaa cctagaatct	180
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acattaggga gcttacgttc	300
ggagggggga ccaagctgga aatcaaacgt	330

<210> 7
<211> 110
<212> PRT

[0003]

<213> 小鼠

<400> 7

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
           20           25           30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
           35           40           45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
           50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65           70           75           80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg
           85           90           95
Glu Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
           100          105          110

```

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

```

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1           5           10           15

```

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

```

Leu Val Ser Asn Leu Gln Ser
1           5

```

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

```

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr
1           5

```

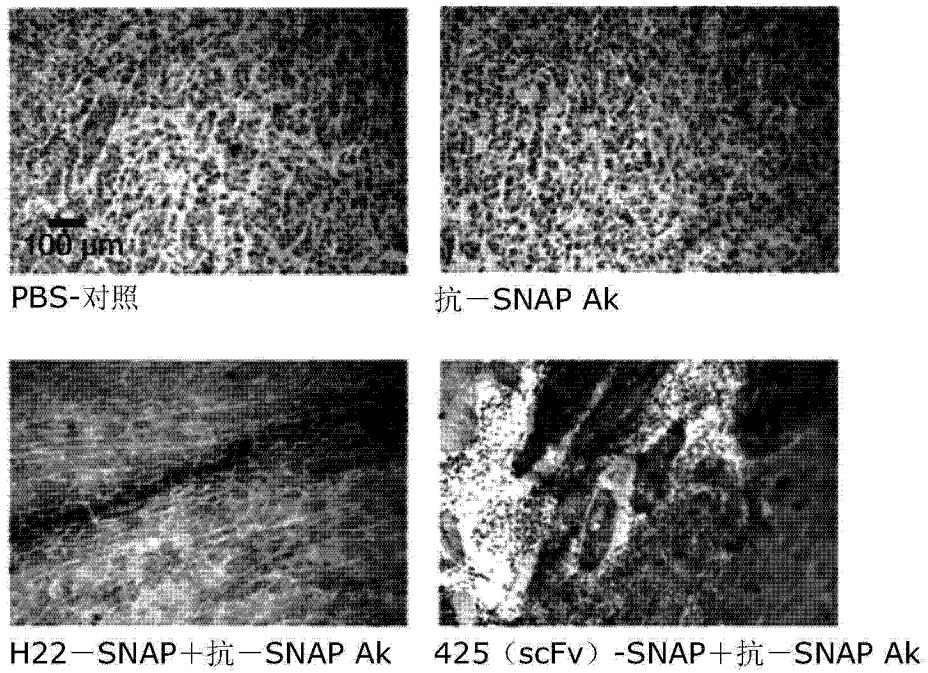


图 1

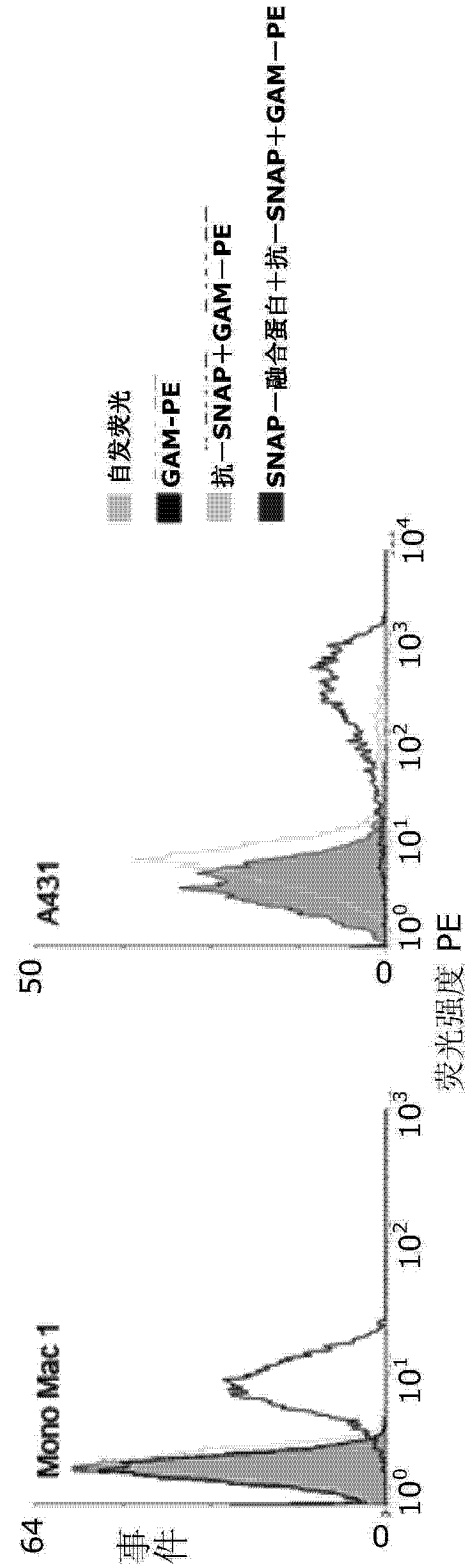


图 2

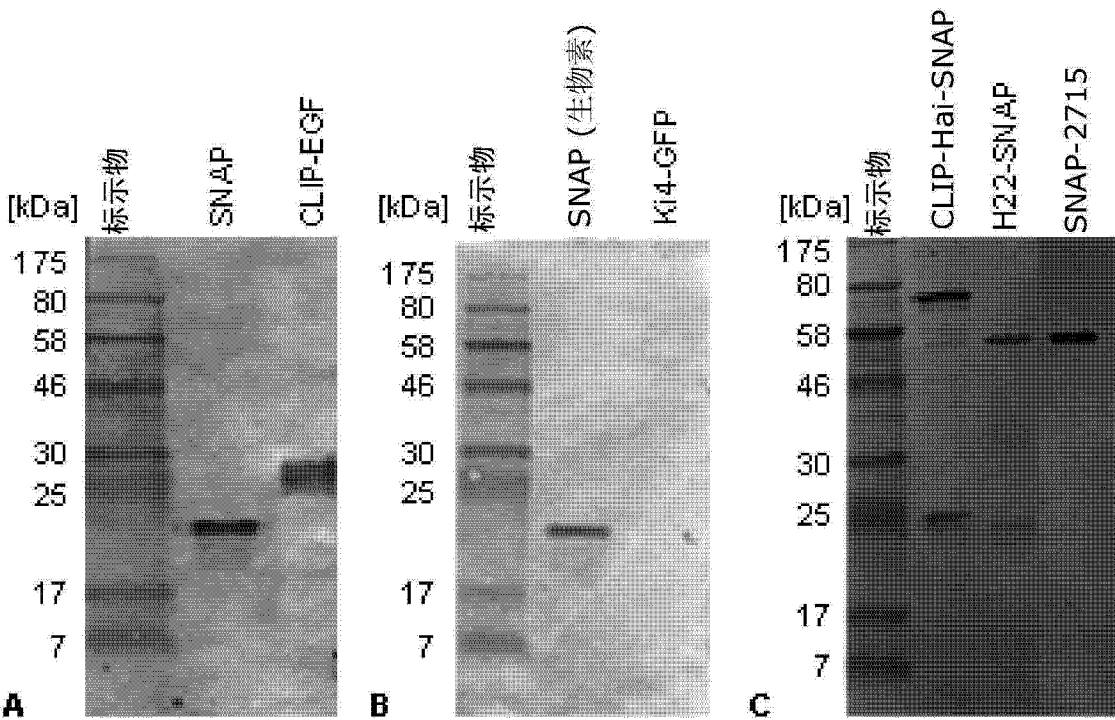


图 3

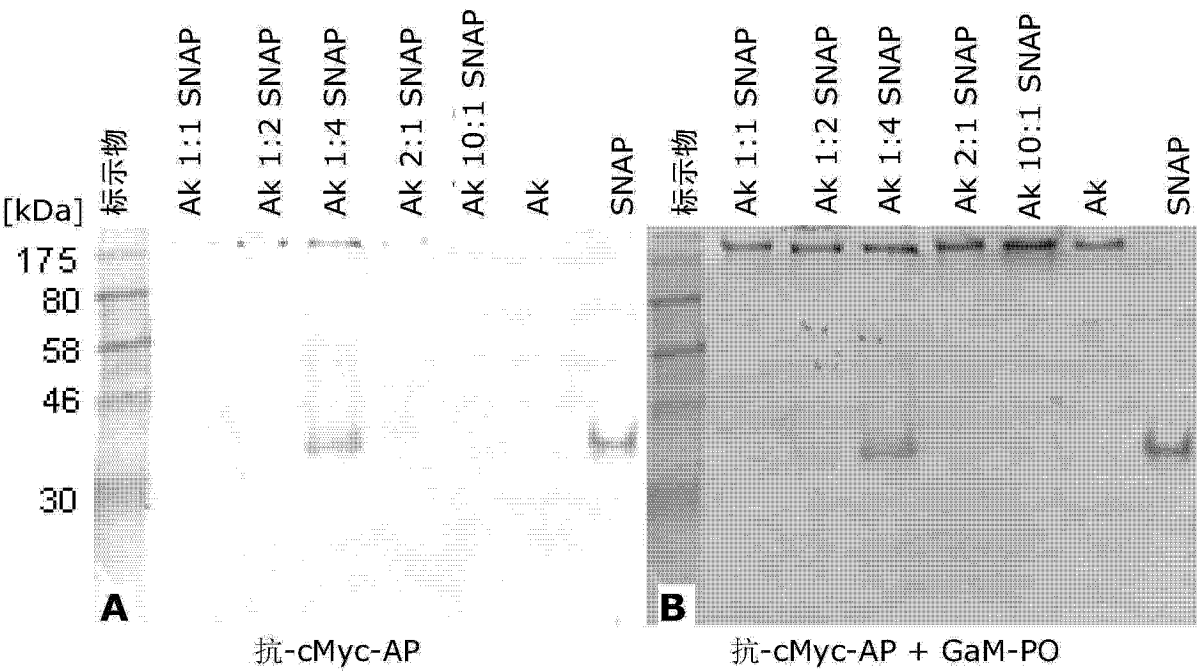
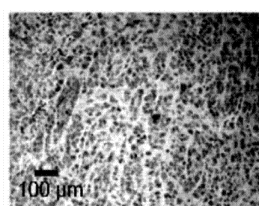


图 4

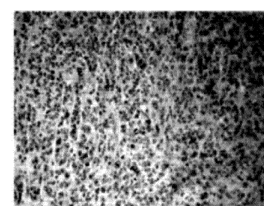
专利名称(译)	用于检测SNAP/CLIP标记物的单克隆抗体		
公开(公告)号	CN103974978A	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201280057908.5	申请日	2012-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	弗劳恩霍夫应用研究促进协会		
申请(专利权)人(译)	德国弗劳恩霍夫协会债权安格万特学术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	德国弗劳恩霍夫协会债权安格万特学术研究所		
[标]发明人	S巴思 K科尔伯格 C帕特曼 S施密斯		
发明人	S·巴思 K·科尔伯格 C·帕特曼 S·施密斯		
IPC分类号	C07K16/40 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2333/91011 C07K16/40 G01N33/573 G01N33/581 C07K2317/565		
代理人(译)	马莉华 崔佳佳		
优先权	2011190787 2011-11-25 EP		
其他公开文献	CN103974978B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

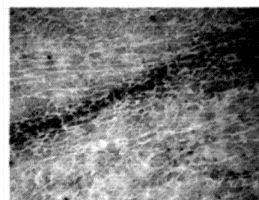
一种与SNAP基序和CLIP标记物特异性结合的单克隆抗体，包含具有氨基酸序列SEQ ID No.3,4,5和8,9,10的CDR。



PBS-对照



抗-SNAP Ak



H22-SNAP+抗-SNAP Ak



425 (scFv)-SNAP+抗-SNAP Ak