



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201425334 A

(43) 公開日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 01 日

(21) 申請案號：101149718

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 12 月 25 日

(51) Int. Cl. :

C07K16/00 (2006.01)

C07K16/08 (2006.01)

(71) 申請人：國立陽明大學 (中華民國) NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (TW)

臺北市北投區立農街 2 段 155 號

(72) 發明人：陳宜民 CHEN, YI MING ARTHUR (TW) ; 黃思惟 HUANG, SI WEI (TW) ; 林盈
妤 LIN, YING YU (TW)

(74) 代理人：蔡坤旺

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：7 共 28 頁

(54) 名稱

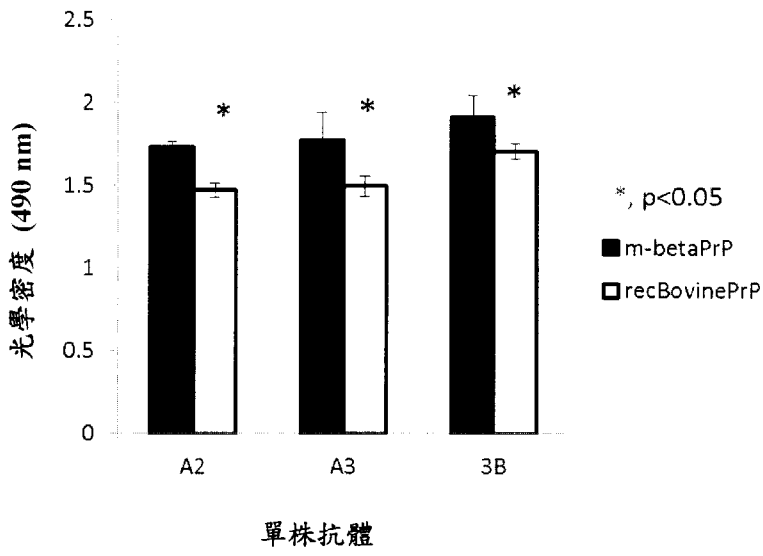
可辨認感染性普立昂蛋白質 (scrapie prion protein, PrP^{Sc}) 之單
株抗體及其用途

(57) 摘要

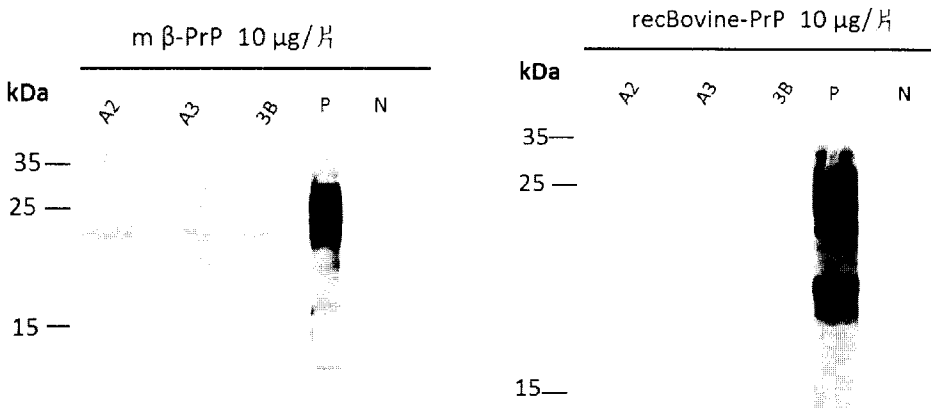
本發明係關於可用於特異性辨認感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之單株抗體，本發明之單株抗體特徵在於不需要經過蛋白水解酶的反應，就能夠直接特異性地辨認 PrP^{Sc} 蛋白，可提供用來建立一種高特異性及高靈敏度的普立昂疾病檢測方法與套組。

圖一

A.



B.



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101149718

※申請日：101.12.25

※IPC 分類：

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/08 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

可辨認感染性普立昂蛋白質(scrapie prion protein, PrP^{Sc})之單株抗體及其用途

二、中文發明摘要：

本發明係關於可用於特異性辨認感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之單株抗體，本發明之單株抗體特徵在於不需要經過蛋白水解酶的反應，就能夠直接特異性地辨認 PrP^{Sc} 蛋白，可提供用來建立一種高特異性及高靈敏度的普立昂疾病檢測方法與套組。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a monoclonal antibody against PrP^{Sc} protein. The anti-PrP^{Sc} mAbs produced in this invention can identify PrP^{Sc} protein from normal mouse brain homogenates without pre-treatment with protease K, which may be used in developing a diagnostic method and kit for prion disease with high specificity and sensitivity.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於可專一性辨認感染性普立昂蛋白質(scrapie prion protein, PrP^{Sc})之單株抗體，特別地，係關於可與普立昂蛋白質 C 端以 β 褶版(β sheet)為主的片段結合之單株抗體，及其用於檢測普立昂疾病之用途。

【先前技術】

普立昂疾病(prion diseases)又稱作傳染性海綿體腦部病變(Transmissible spongiform encephalopathies, 以下簡稱 TSE)，病理特徵是在腦部會出現海綿狀空洞、神經元細胞死亡、星狀細胞增生、組織染色出現澱粉斑塊(amyloid plaque)；臨床特徵通常在長時間的潛伏下會出現漸進式的行為、運動失調、癡呆等(Ludlam, C.A., *Lancet* **351**:1289-1290, 1998; Soto, C., *Nature reviews Microbiology* **2**:809-819, 2004)，雖與其他神經性退化疾病如阿茲海默(Alzheimer disease)、帕金森氏症(Parkinson disease)相似，但是獨特的地方在於其具有傳染性，會嚴重影響動物如羊騷癢症(Scrapie)、狂牛症(bovine spongiform encephalopathy, 以下簡稱 BSE)，以及人類如庫賈氏症(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、Gerstmann-Straussler-Scheinker 氏症(GSS)、致死性家族失眠症(Fatal familial insomnia, FFI)等。人類的普立昂疾病的致病原因可分為遺傳性：GSS、FFI、fCJD；後天獲得：Kuru、iCJD、vCJD；未知：sCJD，動物則是因為有吃自己同類屍體的習慣，而有傳染性貂腦病變(Transmissible mink encephalopathy)，及因牛誤食羊騷癢症(Scrapie)的羊製成的肉骨粉，而產生的狂牛症(BSE)。

在西元 1986 年，英國首次爆發從未出現過造成大量牛隻死亡的疾病，即為後來所知的狂牛症(Wells, G.A., et al., *The*

Veterinary record 121:419-420, 1987), 接著幾年也開始在其他國家陸續出現案例, 造成大規模流行。目前研究顯示, BSE 的爆發可能是因為在做為牛飼料添加之肉骨粉中, 含有大量的羊搔癢症病原所致, 這也暗示 TSE 似乎會跨越種別差異, 而造成另一物種的疾病發生, 人類的庫賈氏病在 1920 年代初期被發現, 為一種相當罕見的疾病, 發生率約為每百萬人口 0.5~1 名病例。此病的病理症狀與狂牛症類似。

過去幾年來各國已經確信 BSE 是嚴重的問題, 目前在病原的鑑定上, 主要之檢體來源都是“死後”的腦部組織, 僅可由嚴重感染的牛隻腦部組織做成乳劑後, 以人工接種感染小鼠來證實 BSE 的病原是可傳播感染的; 但這類接種感染的方式卻最少須 150 幾天的感染期才能證實有無感染成立。而現今 WHO 及 OIE 所承認的診斷方法, 是以死後檢查臨床疫情、症狀、顯微病理變化、免疫組織化學染色技術及西方免疫墨點轉漬法等, 來作為普立昂疾病的診斷依據(Hardt, M., et al., *Journal of comparative pathology* 122:43-53, 2000; Ingrosso, L., et al., *Trends in molecular medicine* 8, 273-280, 2002)。以下將分別敘述現有常用的幾個 TSE 檢測方法:

1. 西方免疫墨點轉漬法: 原理是依據 PrP^{Sc} 被蛋白酶 K 水解後會產生 27~30 kDa (PrP^{res}) 大小的訊號, 將腦組織均質液與蛋白酶 K 反應後, 接著利用單株抗體 6H4 (抗原決定位: DYEDRYRE) 偵測, 此方法的好處是可以減少檢測上的錯誤率, 因為相對於用酵素免疫分析法(ELISA) 全長 PrP^C 部分沒被水解掉進而干擾 PrP²⁷⁻³⁰ 訊號的現象, 此外也可以發現新的 PrP^{Sc} 種(strain)。

2. CEA/BioRad 檢測: 是將腦組織先經過一連串去活性(denaturation)及濃縮步驟後, 進行利用兩種單株抗體三明治型的酵素免疫分析法。此方法較其他方法的偵測靈敏度高, 可到 0.5-2.0 pmol, 但是相對於其他方法, 從純化到濃縮腦組織液需要耗費相對多的時間及人力, 也同樣有會受到未完全被水解掉

的 PrP^C 片段干擾的困擾。

3. 結構依據(conformation dependent)免疫分析：係利用抗體對於原始及變性後的 PrP 有不同的鍵結能力，而建立的三明治酵素免疫分析法。抗體會辨認只在 PrP^{Sc} 變性後才出現的結構依據抗原決定位(conformational epitope)，特別是不用依賴蛋白水解酵素，故對於 proteinase K 敏感的 PrP^{Sc} strain 仍舊可以偵測的到，但缺點是相對於其他快速檢測方式，其需要較多的處理步驟。

上述方式都具有潛在性的問題，由於其偵測極限過高(目前具備最低偵測極限的檢測方法是 CEA/Biorad 檢測)，而使許多牛隻可能處於 PrP^{Sc} 潛伏階段，還未出現任何臨床症狀，以致所獲得的化學檢測結果呈現偽陰性(false negative)。另外，類似的情況也會發生在人類，目前對於“活著”的 CJD 患者之症狀出現前(pre-symptom)檢測仍舊在發展中，所以同樣的問題在於，如果 vCJD 患者在未知的狀態下進行手術、捐贈器官、輸血等醫療行為，而鑑於 PrP^{Sc} 耐高溫、不怕殺菌劑之特性，其一旦附著在手術器具上，便無法清除乾淨，接著就會發生傳染造成 iatrogenic CJD 案例的發生。另外，根據 PrP^{Sc} 的特性，檢體取得後通常需要經過蛋白水解酶的處理，但是這樣的處理會使得原本存在少量的 PrP^{Sc} 損失，逃過偵測極限而得到另外一種偽陰性的發生。總結上述，目前仍需要發展一種於臨床症狀發生前、活體狀態下，採取的檢體不需要經過蛋白水解酶的處理，而能夠直接特異性地辨認 PrP^{Sc}，並且提升偵測極限的檢測方法。

發展專一結合 PrP^{Sc} 結構的抗體，是一直以來研究普立昂疾病的重點，而普立昂蛋白的特點在於，它並不像其他感染性物質如病毒、細菌能夠引起強烈的免疫反應，在 PrP 蛋白正常表達的動物(Prnp^{+/+})於普立昂疾病發生的過程，因為正常 B 細胞、T 細胞表面即有廣泛分布的 PrP^C，而 PrP^{Sc} 的初級結構可能與 PrP^C 相似，使得 B 細胞有免疫耐受性而沒有免疫反應

(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)。

這幾年來嘗試不同策略，但仍舊無法發展出專一性高的辨認 PrP^{Sc} 抗體，最早在 1997 年，Korth 的團隊利用重組牛蛋白製造出 15B3，該抗體雖然可以免疫沉澱牛、小鼠、人類的 PrP^{Sc} 而非 PrP^C，但是在實際應用上卻因為其對於普立昂蛋白質相對弱的結合能力，而使其無法實現於臨床診斷(Korth, C., et al., *Nature* **390**:74, 1999)。因此，開始修正採用全長片段(不包含 N 端)的免疫原策略，製造 β 褶版為主的重組蛋白、增加 tyrosine 殘基，根據不同的物種 tyrosine-tyrosine-arginine 重複序列設計合成胜肽片段(Paramithiotis, et al. 2003)，使用羊搔癢症相關纖維絲 scrapie-associated fibril (SAF)(Morel, N., et al., *The Journal of biological chemistry* **279**:30143-30149, 2004)也生產出能夠辨認 PrP^{Sc} 的抗體，但之後的實驗卻發現其仍舊能夠辨認 PrP^C。截至目前，雖然生產出許多的抗 PrP 抗體能夠辨認各種形式的 PrP，但是對於純化原始狀態(native) PrP^{Sc} 的辨認，僅只剩下微弱的訊號。

【發明內容】

於是，本發明之一方面，係關於一種特異性辨認感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之單株抗體，其特徵在於與包含普立昂蛋白之胺基酸 141-182 (SEQ ID NO. 1)之肽片段結合。

於本發明之一具體實施態樣，所述之單株抗體可辨識在結構上以 β 褶版為主之普立昂蛋白。於本發明之一具體實施態樣，所述之普立昂蛋白係形成 β 寡聚體。

於本發明之一些具體實施態樣，所述之單株抗體係與包含普立昂蛋白之胺基酸 141-152 (SEQ ID NO. 2)之肽片段結合。於本發明之一些具體實施態樣，所述之單株抗體係與包含普立

昂蛋白之胺基酸 171-182 (SEQ ID NO. 3) 之肽片段結合。

本發明之另一方面，係關於一種特異性偵測感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之抗體的製造方法，其包含製備一種在結構上以 β 褶版為主之重組型普立昂蛋白；將所得之重組型普立昂蛋白免疫小鼠產生抗體；及分離及純化出該抗體。所述之抗體包單株抗體及多株抗體。

於本發明之一具體實施態樣，所述之重組型普立昂蛋白在結構上會自動由 α 轉變成 β 褶版形式為主，且自動聚合成 β 寡聚體。於本發明之另一具體實施態樣，所述之重組型普立昂蛋白包含 Ser-132、Asn-181、Cys179、Cys-214 四個位點之突變。

本發明之又一方面，係關於一種特異性偵測感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之診斷套組，其特徵在於包含本發明之單株抗體。

本發明之又另一方面，係關於一種普立昂疾病檢測方法，其包含取得腦部組織樣本；及利用本發明之單株抗體進行免疫分析，偵測樣本中是否存在感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})。於本發明之一些具體實施態樣，所述之腦部組織樣本為腦組織均質液。於本發明之其他具體實施態樣，所述之腦部組織樣本為腦部組織切片。

於本發明之一具體實施態樣，所述之感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})係在結構上以 β 褶版為主之普立昂蛋白。於本發明之另一具體實施態樣，所述之感染性普立昂蛋白係形成 β 寡聚體。

【實施方式】

本發明之其他特色及優點將於下列實施範例中被進一步舉例與說明，而該實施範例僅作為輔助說明，並非用於限制本發明之範圍。

根據本發明所呈現的各種實施例，下述各種儀器、裝置、方法和其相關結果者，實施例中為了方便讀者閱讀所使用的標題或副標題，並不被限制在本發明的範圍之內。

實施例 1：單株抗體之製造及特性分析

單株抗體之製造

首先將小鼠普立昂蛋白之四個位點 Ser-132、Asn-181、Cys179、Cys-214 作突變，得到重組小鼠普立昂蛋白，接著以電子順磁共振(Electron paramagnetic resonance, EPR)、Circular dichroism 進行分析發現，該重組的 mouse prion 蛋白在低鹽 pH=7 室溫的狀態下，會自動由 α 轉變成 β 褶版形式為主，且自動聚合成 β 寡聚體。因此將所製得會自發性結構轉變的小鼠 prion protein，即 mouse β PrP (被認為結構近似於 PrP^{Sc})，做為免疫小鼠的免疫原，製造出獨特的單株抗體。

每隻 BALB/c 小鼠以 50ug 的大腸桿菌生產之重組小鼠普立昂蛋白，結構以 β 褶版為主(mouse β PrP，簡稱 m β PrP)加入 1X PBS 將體積帶大到 250 ul，並加入 250 ul 完全 Freund's 佐劑，在注射筒內混合均勻，以腹腔注射的方式將抗原打入小鼠的體內，接著 2 週後進行追加注射，每隻小鼠再以 50 ug 的 m β PrP 加入 1XPBS 將體積帶大到 250 ul，並加入 250 ul 不完全 Freund's 佐劑(InComplete Freund's adjuvate)，在注射筒內混合均勻，以腹腔注射的方式將抗原打入小鼠的體內，之後每次追加注射後 1 週採集血液並分離血清進行酵素免疫分析法，於第 5 次追加注射後，抽血後分離出血清進行酵素免疫分析法，決定小鼠，準備進行細胞融合。

施打 m β PrP 重組蛋白過後，會促使脾臟內的 B 細胞產生特定抗體，與癌化細胞融合行成可在體外培養且具特定抗體之細胞株，本實驗利用抗原免疫之小鼠(BABL/c mice)的脾臟與骨髓瘤細胞株 NS-1 進行融合。接著將細胞培養於 HAT growth medium，分裝到 6 個 96 孔培養盤中，靜置 7~14 天觀察細胞生長狀況。以 3 種限制性稀釋(快速稀釋細胞法，慢速稀釋細胞法及細胞計數法)的方式，得到單一母細胞所產生的單株抗體，並以酵素免疫分析法及西方墨點法進行特異性確認。最後我們分

別得到 3 株 m β PrP 單株抗體細胞，A2、A3 及 3B (圖一)。

接著將單株抗體細胞株殖入小鼠腹腔內生長，由腹水取得高濃度的單株抗體。由於單株抗體細胞培養液中的 HAT 培養基對於小鼠是具有毒性的，所以須將篩選出的單株抗體細胞更換成一般 RPMI 培養液，才能殖入小鼠體內得到高濃度的單株抗體。之後進行腹水中之單株抗體純化，將 0.5ml protein G plus protein A agrose 裝到管柱內，以 1ml 1XPBS 清洗 agrose，將 1XPBS 等量混合均勻的腹水共 6ml 加到管柱內，重複流過管柱 3~5 次，加入 5 ml 的 1XPBS 清洗 agrose，再加入 10ml 0.5M NaOAc (pH=3) + 0.01% 疊氮化鈉(sodium azide)到管柱，純化出抗體，重複 3-5 次，加入 2.5 ml 2M Tris base + 0.01% 疊氮化鈉到第一批純化抗體，平衡酸鹼值；加入 5ml 10mM 甘胺酸 (pH=3) + 0.01% 疊氮化鈉到管柱，純化出抗體，重複 3-5 次，加入 1.25 ml 2M Tris base + 0.01% 疊氮化鈉到第二批純化出的抗體，平衡酸鹼值。取出濃縮離心管，將二批抗體混合，使用濃縮管濃縮至 1ml 以下，濃度定量後，分裝每管 100 μ g 的量(用於嗜菌體呈現技術)，其餘存放在 -20 $^{\circ}$ C/-80 $^{\circ}$ C。

抗-m β PrP 單株抗體 mAb-A2、A3、3B 之異構型鑑定

將 2.5 μ g/ml 免疫球蛋白覆蓋在 96 孔免疫酵素分析盤內，一抗用培養中的融合瘤細胞 A2、A3、3B 的培養上清液，二抗使用不同免疫球蛋白(結合 HRP 辨識重鏈的抗-IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3 抗體；結合 HRP 辨識輕鏈的抗- κ 鏈及 λ 鏈抗體)，測讀 490 波長，可測得單株抗體之免疫球蛋白的重鏈與輕鏈。結果顯示，本發明所製得的三株 m β PrP 單株抗體 A2、A3 及 3B 之免疫球蛋白，其重鏈為 IgM，輕鏈為 κ 鏈(參見圖二)。

使用 dot plot 方法比較單株抗體 A2、A3 與 3B 對於不同量的 m β PrP 和重組牛 PrP 的辨認差異

利用點轉漬(Dot blot)分析在原始的(native)結構狀態下，相

同物種之 PrP 蛋白會以不同的立體結構存在型式， $m\alpha$ PrP 是以單體(monomer)存在， $m\beta$ PrP 則以寡聚合體(oligomer)存在。將 5 μ g、1 μ g、0.5 μ g、及 0.1 μ g 之 $m\beta$ PrP 及 $m\alpha$ PrP 點在 PVDF 轉漬膜上，接著加入 5%牛奶 blocking，使用不同倍率稀釋的 mAb A2、A3、3B 單株抗體反應為一級抗體，以小鼠免疫前的血清作為負對照組，進行反應。結果參見圖三。

由圖三 A 顯示，A2 單株抗體在 10 μ g/ml 到 50 μ g/ml 濃度之間對於 $m\beta$ PrP 辨認的極限較好，能夠偵測到 0.1 μ g 的蛋白，但是對於 5 $m\alpha$ PrP 只偵測能到 1 μ g；濃度 1 μ g/ml 下之 A2 單株抗體對於 10 μ g $m\alpha$ PrP 有微弱的訊號，相對在 $m\beta$ PrP 則沒有。圖三 B 顯示，A3 單株抗體在 10 μ g/ml 到 50 μ g/ml 濃度之間對於 $m\beta$ PrP 的辨識訊號較對於 $m\alpha$ PrP 好，尤以星號標示處更為顯著，但在抗體濃度 1 μ g/ml 下，其對於該二蛋白之辨識度就無差異。圖三 C 則顯示，單株抗體 3B 在濃度 1 μ g/ml 到 20 μ g/ml 濃度之間對於 5 μ g $m\beta$ PrP 的辨認情形較對於 $m\alpha$ PrP 的優，且 3B 單株抗體在濃度 50 μ g/ml 下，對於 0.1 μ g $m\beta$ PrP 的辨認情形比 $m\alpha$ PrP 好，其他則沒有太大的差異。綜合上述，mAb A2、A3、3B 三個單株抗體對於 $m\alpha$ PrP 或 $m\beta$ PrP 皆能夠辨認，而該等單株抗體在 10 μ g/ml 到 50 μ g/ml 之濃度間，對於 $m\beta$ PrP 的偵測極限較對於 $m\alpha$ PrP 的好。

ELISA 分析抗-PrP 單株抗體 A2、A3、3B 對於 $m\beta$ PrP 及 α PrP 辨識的差異

亦進行 ELISA 分析，將各單株抗體對於不同蛋白的辨認情形以數值方式呈現。將 200 ng/well 之小鼠 β PrP、 α PrP 蛋白各自覆蓋於免疫酵素分析盤之孔內，接著加入經不同倍率稀釋的 mAbs A2、A3、3B 單株抗體為第一抗體，二抗為抗-小鼠 IgM (1:4000)，進行反應，接著以 OPD 成色，結果。結果顯示，單株抗體 A2、A3 及 3B 在 1 μ g/ml 到 200 μ g/ml 濃度之間，對於 $m\beta$ PrP 的辨認較對於 $m\alpha$ PrP 之辨視能力好(參見圖四)。在重組蛋白辨識的結果統合包括圖一結果，可以知道在蛋白質存在

自然(native)型式下，本發明的單株抗體可以辨認另外一個物種(牛)來源之 PrP，並且對於單體及寡聚合體有不同的親和性。

實施例 2：單株抗體之抗原決定位序列分析

胜肽掃描(peptide scan)分析

將 93-230 的 mPrP 序列分成 22 段，每段 12 個胺基酸組成，各有 6 個胺基酸重複，將這些胜肽片段覆蓋於 96 免疫酵素分析盤內，進行 ELISA 分析，一抗使用純化過的 A2、A3、3B 單株抗體，並利用抗-小鼠 IgM 結合 HRP 的多株抗體做為二次抗體。

利用胜肽掃描結果如圖五，發現單株抗體 A3 之胜肽抗原決定位在 141-152 GNDWEDRYREN (SEQ ID NO. 2)，而單株抗體 A2 與 3B 之抗原決定位則是位在同一位置，171-182 QNNFVHDAVCIT (SEQ ID NO. 3)。

嗜菌體呈現技術

隨機挑選經過四次篩選的嗜菌體群落並且抽取其 DNA 送定序整理結果如下，序列後的括號代表(出現次數/所挑選的全部序列數量)，粗體字代表交叉比對都有出現的序列，統整可能的序列於每個表格最下面一列，底線代表比對回去有的序列。

抗體：mAb-A2

嗜菌體群落之序列	<u>PVSAVRP</u> (5/10) TAP <u>V</u> SPI/S (2/10) PGQD <u>A</u> VM (1/10) GPRDPRD (1/10) TAAG-S- (1/10)
可能的抗原決定位	164- <u>RPVDQYSNQNNFVHDAVCIT</u> -182

抗體：mAb-A3

嗜菌體群落之序列	RVNTK L/P I (11/20) LKTRVIS (5/20) TPARHIY (1/20) AYPSAHR (1/20) - RLVLFF- (1/20)
可能的抗原決定位	NA

抗體：mAb-3B

嗜菌體群落之序列	<u>DIPYQQ</u> F/ <u>S</u> (10/20) <u>RPK</u> xxxx (1/20) ASNRPYV (7/20) ITLSGGI (1/20) TPPRHIY (1/20)
可能的抗原決定位	23-MKK <u>RPK</u> PGGWNTGGSRYP <u>GQGSP</u> -45

整合上述結果，A2 總共得到 5 種嗜菌體序列，利用交叉比對的方式對照出有重複出現的序列對回小鼠 PrP 為 163-RPVDQYSNQN NFVHDAVCIT-182 (SEQ ID NO. 4)，A3 得到的 5 種序列，無法找到相對應的序列，3B 則是由 5 種序列統合，比對到接近 N 端的位置 23-MKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSP-45 (SEQ ID NO. 5) 三個抗體的決定位。

因此得知，A3 的抗原決定位為 141-152 GNDWEDRYREN (SEQ ID NO. 2)，A2、3B 則在同一位置 171-182 QNNFVHDAVCIT (SEQ ID NO. 3)，三種單株抗體的抗原決定位在不同物種的氨基酸序列有高度保留性。

實施例三：抗-PrP^{Sc} 單株抗體對正常小鼠腦組織及感染性小鼠腦組織的辨識

西方墨點轉漬法分析

本實驗係利用西方墨點轉漬法分析 mAb-A2、A3、3B 對正常小鼠腦組織均質液及感染性小鼠腦組織均質液的辨識差異，樣品來源分為正常小鼠腦組織均質液, NBH (lane 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15)及感染性 PrP^{Sc} (10%, 22L)小鼠腦組織均質液 (lane 1, 2, 5, 6, 9, 10 及 13)，有(+)或無(-)經過 50 µg/mL proteinase K 於 37°C 下處理 1 小時，接著加入 5 mM PMSF 處理 10 分鐘以中止反應。將反應完的樣品跑 SDS-PAGE 做西方墨點轉於 PVDF 膜上，一級抗體使用 mAb-A2、A3、3B、SAF32，二級抗體係用結合 HRP 之抗-小鼠 IgM、IgG 抗體 (1:10000) 進行反應，接著以 ECL 成色。

由西方墨點轉漬法分析結果可發現，在沒有經過蛋白水解酶 K 的處理下，本發明之單株抗體都能夠辨認 PrP^{Sc}，且彼此之間對於醣基化的辨認 pattern 有所不同，辨認訊號強度也較正常小鼠腦組織強(參見圖六)。由上述結果，本發明知單株抗體可應用於發展在臨床症狀發生前、活體狀態下，採取的檢體不需要經過蛋白水解酶的反應，就能夠直接特異性的辨認 PrP^{Sc} 之診斷方法及套組，有效節省樣本處理與偵測所需耗費的勞力與時間。

免疫組織染色(Immunohistochemistry)

利用本發明製得的三株可辨認 PrP 的單株抗體-A2、A3、3B，對已感染 22L PrP^{Sc} 病變的小鼠腦部切片，和正常小鼠健康的腦部切片(normal control)進行免疫組織染色，來偵測 PrP^{Sc} 蛋白在小鼠腦部組織的表現。樣品切片來源分別為正常小鼠腦部(normal control)，以及感染性小鼠腦部，染色後，以顯微鏡觀察並照相(倍率 100 倍及 200 倍)，小腦區域為主，同時利用小鼠免疫前(pre-immune)的血清作為 Negative control，結果如圖七所示。

由切片之免疫組織染色結果可看到，以單株抗體 A2 染色係呈現點狀(plaque)訊號，主要分布在小腦灰質的顆粒層、分子層的神經細胞附近，以單株抗體 3B 之訊號也是以點狀方式散

布在小腦的顆粒層、分子層，而單株抗體 A3 的免疫組織染色訊號，則是散布(diffuse)在小腦白質(white matter)，然而，以這些抗體染正常小鼠腦組織則沒有看到明顯的訊號。

由於本發明之單株抗體的抗原決定位，在不同物種中具有高度保留性，所以能用於偵測各個物種的感染性普立昂蛋白，以及用於檢測普立昂疾病，包括例如動物之狂牛症(BSE)、羊搔癢症(Scrapie)、人類之不同類型庫賈氏症 CJD (包括散發型(sporadic)、變異型(variant)、醫源性(atrogenic)、家族遺傳性(familial)等)。而且，本發明之單株抗體除了能夠於臨床偵測 PrP^{Sc} 的存在，如抗體組織切片染色以及 Capture EIA 技術偵測血液、腦脊液檢體之外，還能結合表面電漿共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR)技術，進一步提升偵測極限與靈敏度。

其他具體態樣

本說明書中所揭示之全部特徵可以任何組合方式組合。於是，本說明書中所揭示之各別特徵可由依相同、相等或類似目的之替代特徵取代。因此，除非另行清楚地指示，所揭示之各特徵僅為一系列同等物或類似特徵之實例。

從前述之說明，習於該項技藝人士可容易地確定本發明之基本特徵，且在未偏離其範圍下，可進行本發明之各種改變與修飾，以使其適於各種不同用途與狀況。因此，於申請專利範圍內亦包含其他具體態樣。

【圖式簡單說明】

圖一顯示利用 ELISA 分析(A)及 Strip western blot 分析(B)，確認 A2、A3、3B 融合瘤細胞在 HAT 培養篩選下抗體的分泌情況。

圖二顯示抗-mβPrP 單株抗體 mAb -A2、A3 及 3B 之抗體異構型分析結果。

圖三顯示利用 dot plot 方式比較單株抗體 A. A2、B. A3、C. 3B 對於不同量的 mouse β PrP 和重組 bovine PrP 之辨認差異。

圖四顯示以 ELISA 的方式比較 A2 (A)、A3 (B)及 3B (C) 對於 mouse β PrP 及 α PrP 辨識的差異之結果。

圖五為用胜肽掃描(peptide scan)分析單株抗體抗體抗原決定位序列結果。其中 A-C 係將 93-230 的 mouse PrP 序列分成 22 段，並將這些胜肽片段覆蓋於 96 免疫酵素分析盤內，進行 ELISA 分析。D 為藉由胜肽掃描所得到抗原決定位，相對抗體之示意圖。

圖六為以西方墨點轉漬法分析 mAb-A2、A3、3B 對正常小鼠腦組織均質液及感染性小鼠腦組織均質液的辨識。其中樣品包括，有(+)或無(-)經過 50 μ g/mL 蛋白酶 K 處理之正常小鼠腦組織均質液, NBH (lane 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15)，及感染性 PrP^{Sc} (10% 22L)小鼠腦組織均質液 (lane 1, 2, 5, 6, 9, 10 及 13)。

圖七顯示利用實驗室自製的三株可辨認 PrP 的單株抗體 -A2、A3、3B 對已感染 22L PrP^{Sc} 病變的小鼠腦部切片和正常小鼠健康的腦部切片(normal control)進行免疫組織染色，所呈現的結果為小腦區域。免疫前(Pre-immune)組是利用 BALB/c 小鼠免疫前血清，在此作為陰性對照組(Negative control)，左側標示為所使用的抗體，包括免疫前、A2、3B、A3；下方標示為顯微鏡放大倍率，前兩欄為感染性小鼠切片，第三欄是正常小鼠腦部切片。

【主要元件符號說明】

序列表

<110> 國立陽明大學

<120> 可辨認感染性普立昂蛋白質(scrapie prion protein, PrP^{Sc})之單株抗體及其用途

<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



201425334

<213> 人造序列

<220>

<221> mPrP171-182

<400> 3

Gln Asn Asn Phe Val His Asp Ala Val Cys Ile Thr
1 5 10

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> mPrP163-182

<400> 4

Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Ala Val
1 5 10 15
Cys Ile Thr
 20

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<221> mPrP23-45

<400> 5

Met Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr
1 5 10 15
Pro Gly Gln Gly Ser Pro
 20

七、申請專利範圍：

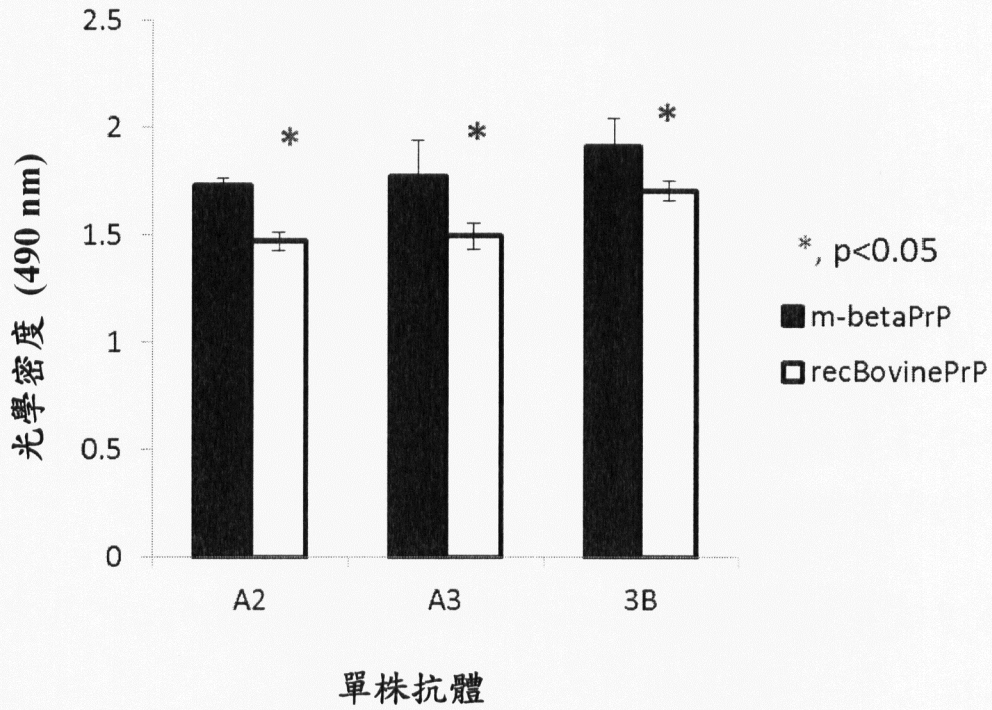
1. 一種特異性辨認感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之單株抗體，其特徵在於與具有普立昂蛋白之胺基酸 141-182 (SEQ ID NO. 1) 之肽片段結合。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之單株抗體，其中該單株抗體可辨識在結構上以 β 褶版為主之普立昂蛋白。
3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之單株抗體，其中該單株抗體可辨識形成 β 寡聚體之普立昂蛋白。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之單株抗體，其中該單株抗體之抗原決定位係位於普立昂蛋白之胺基酸 141-152 (SEQ ID NO. 2)。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之單株抗體，其中該單株抗體之抗原決定位係位於普立昂蛋白之胺基酸 171-182 (SEQ ID NO. 3)。
6. 一種特異性偵測感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之抗體的製造方法，其包含：
 - (a) 製備一種在結構上以 β 褶版為主之重組型普立昂蛋白；
 - (b) 將所得之重組型普立昂蛋白免疫小鼠產生抗體；及
 - (c) 分離及純化出該抗體。
7. 根據申請專利範圍第 6 項之製造方法，其中該抗體包括單株抗體及多株抗體。
8. 根據申請專利範圍第 6 項之製造方法，其中該重組型普立昂蛋白在結構上會自動由 α 轉變成 β 褶版形式為主，且自動聚合成 β 寡聚體。

9. 根據申請專利範圍第 6 項之製造方法，其中該重組型普立昂蛋白包含 Ser-132、Asn-181、Cys179、Cys-214 四個位點之突變。
10. 一種特異性偵測感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})之診斷套組，其特徵在於包含根據申請專利範圍第 1 項之單株抗體。
11. 一種普立昂疾病檢測方法，其包含：
 - (a) 取得腦部組織樣本；及
 - (b) 利用如申請專利範圍第 1 項所述之單株抗體進行免疫分析，偵測樣本中是否存在感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})。
12. 根據申請專利範圍第 11 項之普立昂疾病檢測方法，其中該腦部組織樣本為腦組織均質液。
13. 根據申請專利範圍第 12 項之普立昂疾病檢測方法，其中該免疫分析為西方墨點轉漬法。
14. 根據申請專利範圍第 11 項之普立昂疾病檢測方法，其中該腦部組織樣本為腦部組織切片。
15. 根據申請專利範圍第 14 項之普立昂疾病檢測方法，其中該免疫分析為免疫組織染色(Immunohistochemistry)。
16. 根據申請專利範圍第 11 項之普立昂疾病檢測方法，其中該感染性普立昂蛋白(PrP^{Sc})係在結構上以 β 褶版為主之普立昂蛋白。
17. 根據申請專利範圍第 16 項之普立昂疾病檢測方法，其中該感染性普立昂蛋白係形成 β 寡聚體。

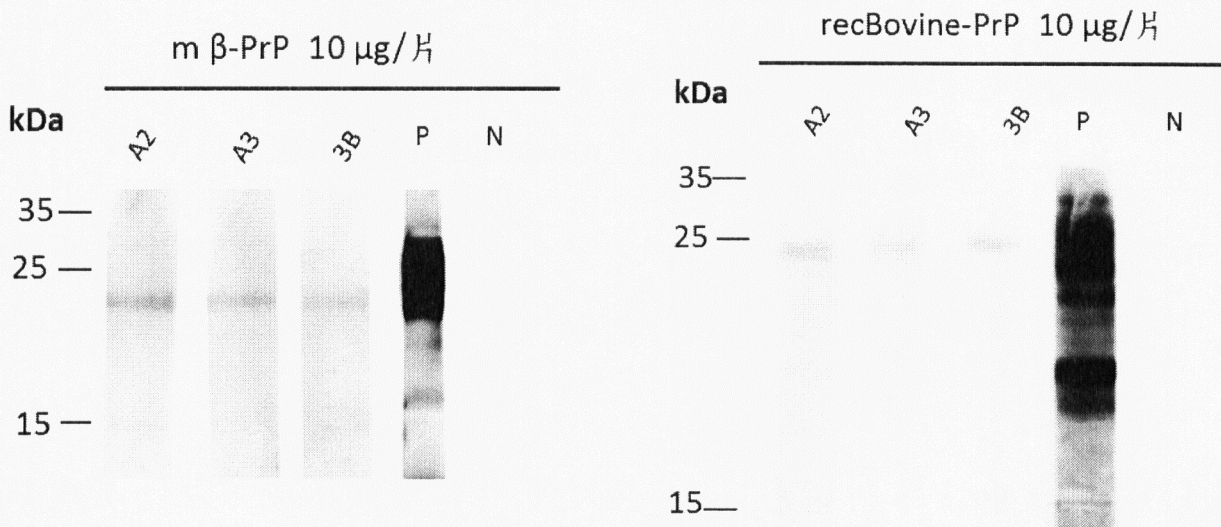
八、圖式：

圖一

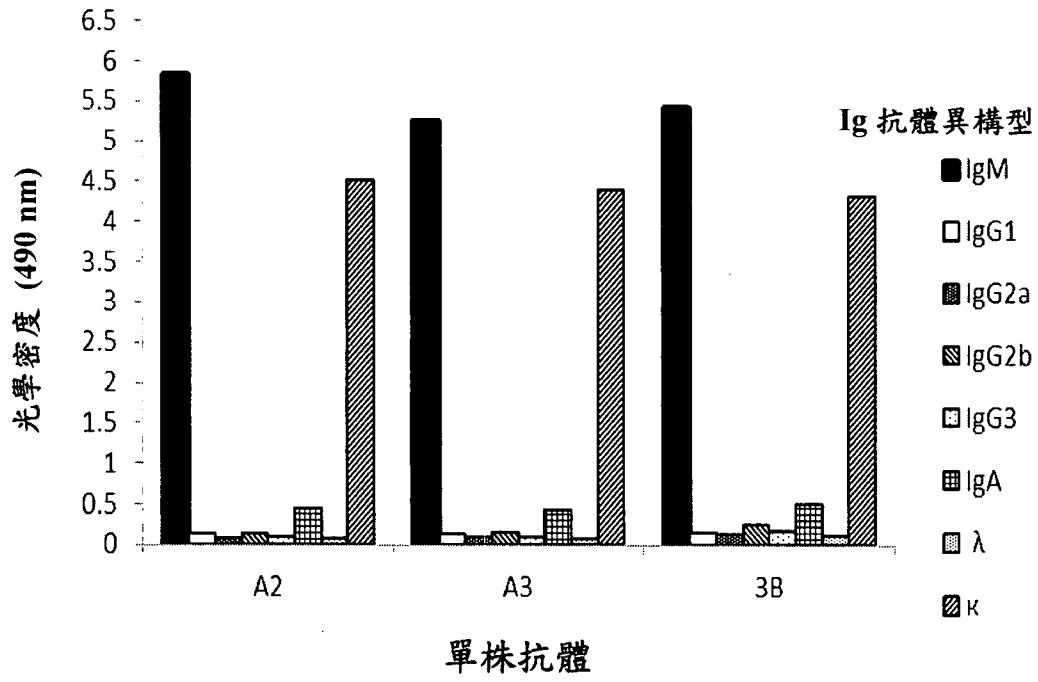
A.



B.

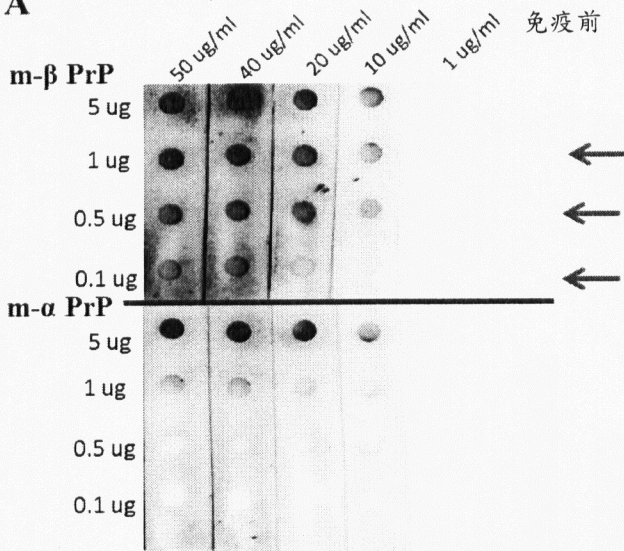


圖二

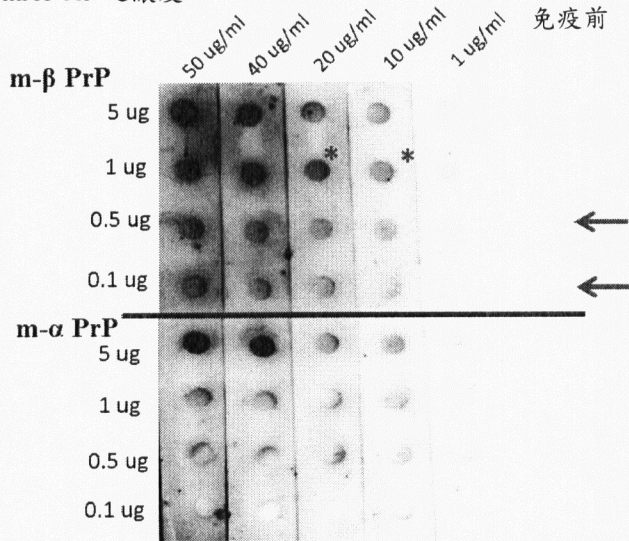


圖三

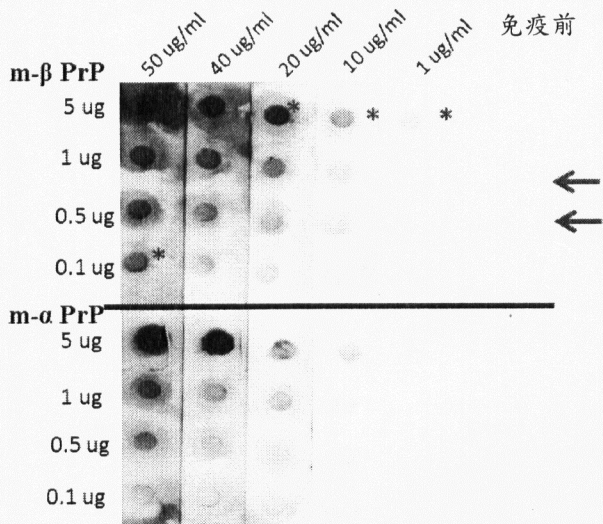
A mAb-A2 之濃度



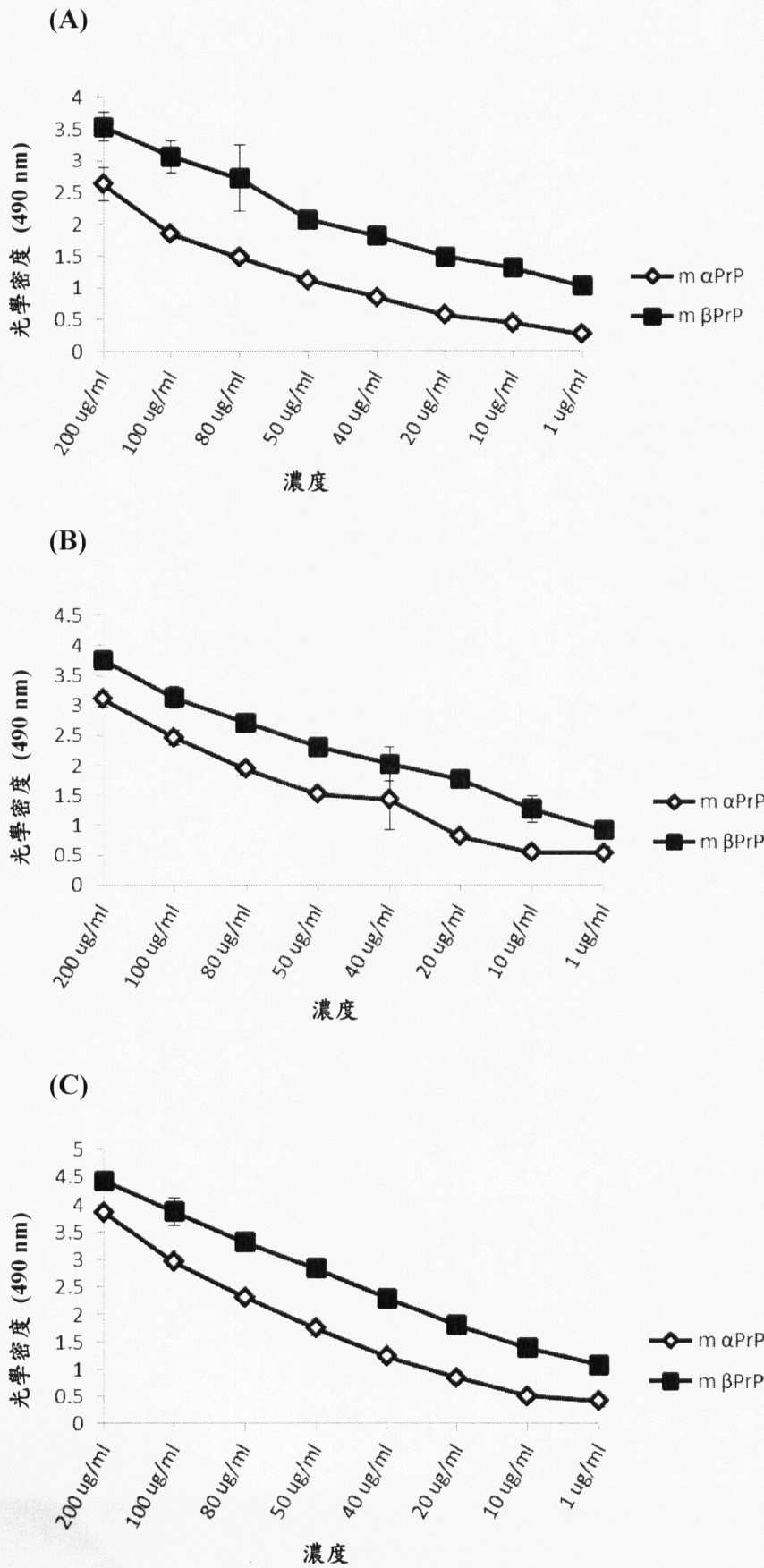
B mAb-A3 之濃度



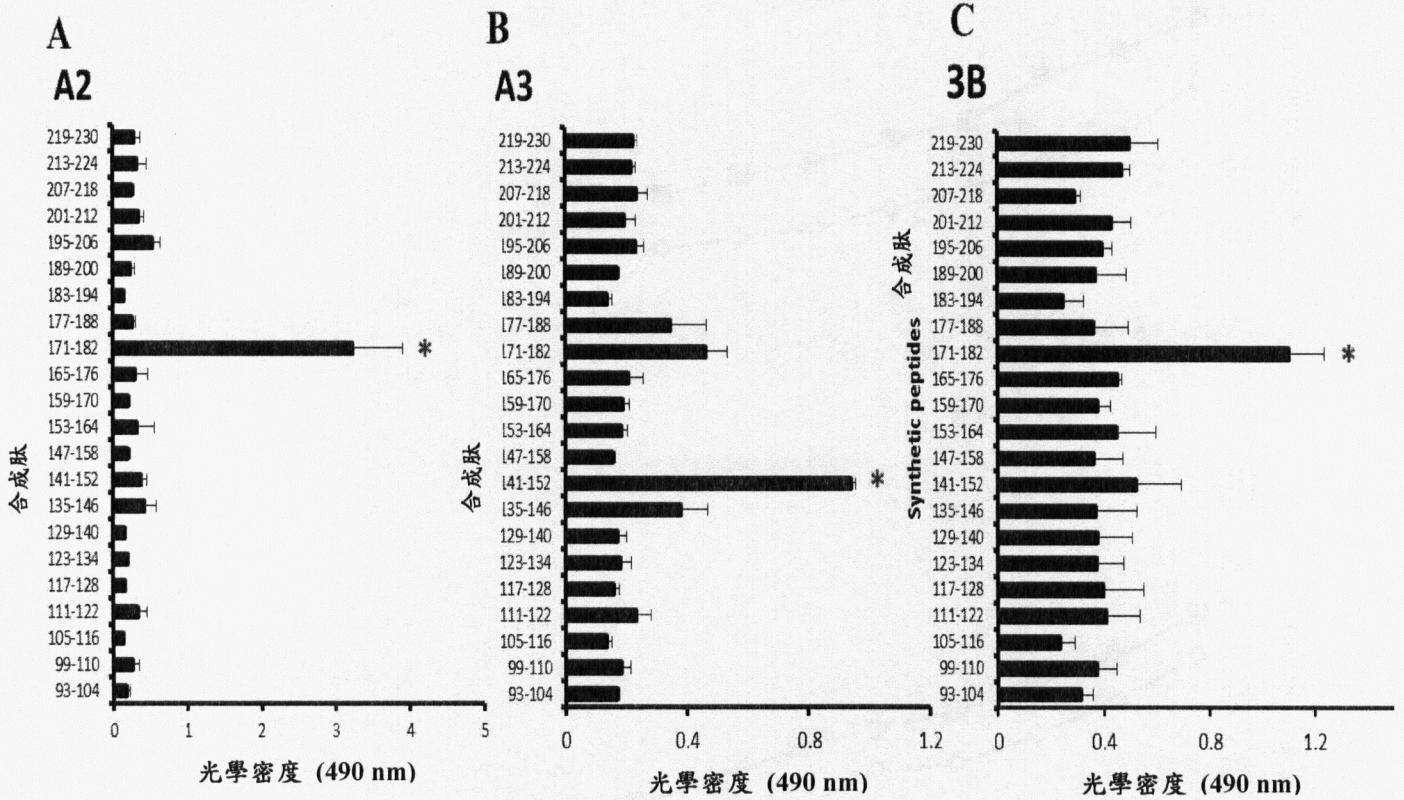
C mAb-3B 之濃度



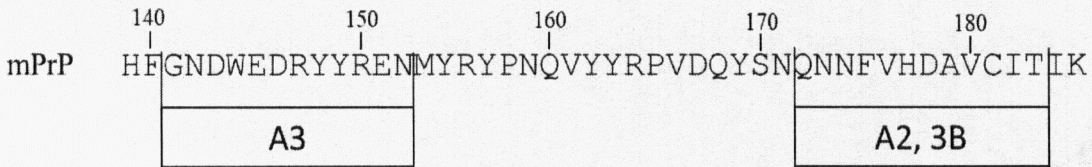
圖四



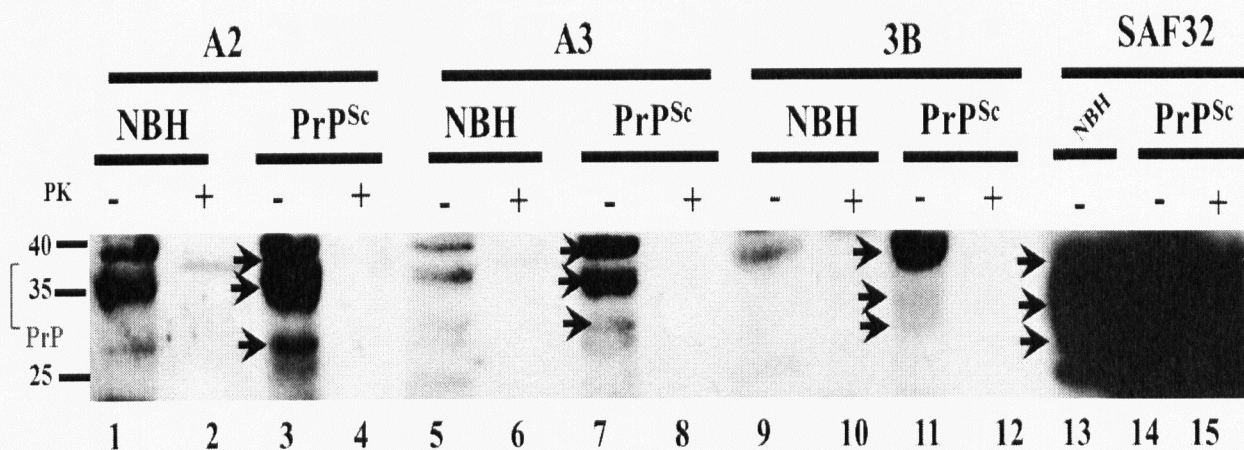
圖五



D



圖六



圖七

