



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105348393 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 24

(21) 申请号 201510814932. 4

(22) 申请日 2015. 11. 17

(71) 申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710038 陕西省西安市长乐西路 169 号

(72) 发明人 常婷 林宏 李柱一

(51) Int. Cl.

*G07K 19/00*(2006. 01)

*G01N 33/68*(2006. 01)

*G01N 33/53*(2006. 01)

*A61K 49/00*(2006. 01)

*A61K 38/17*(2006. 01)

*A61K 47/48*(2006. 01)

*A61P 37/02*(2006. 01)

*A61P 21/04*(2006. 01)

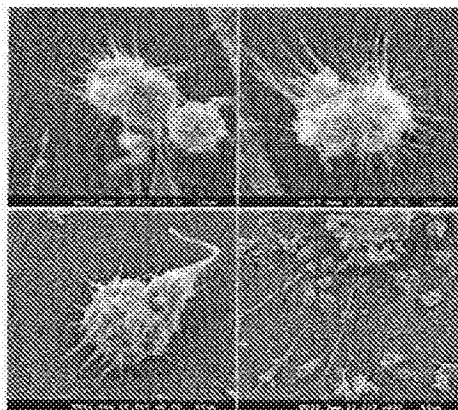
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

### (54) 发明名称

一种偶联抗体的合成、检测方法和应用

### (57) 摘要

本发明提供一种偶联抗体的合成和应用,公开了 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体合成方法:包括以下步骤:① H $\alpha$  1-210 蛋白表达、纯化、鉴定,② DEC-205 单克隆抗体,③ H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体合成;同时公开了 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体的体外细胞系实验方法和在体分析方法。本发明的有益效果是不降低机体免疫力的情况下,仅抑制针对 AchR 的异常免疫应答,起到治疗 MG 的作用。



1. 一种偶联抗体的合成方法,其特征在于:包括以下步骤:

① H $\alpha$  1-210 蛋白表达、纯化、鉴定:采用 RT-PCR 的方法从表达人 AchR 的细胞系 TE671 中扩增 AchR  $\alpha$  1 亚单位胞外段基因 H $\alpha$  1-210,同原核表达载体 pET16b 连接,构建重组表达载体,转化 BL21 感受态菌, IPTG 诱导表达;

② DEC-205 单克隆抗体纯化:MiniPerm 系统中连续旋转培养分泌 DEC-205, GL-117 单克隆抗体的大鼠杂交瘤细胞,培养上清超滤浓缩后经 50%饱和硫酸铵沉淀,最后经蛋白 A/G 亲和层析柱纯化;

③ H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体合成:纯化后的抗体经 2-巯基乙胺·盐酸还原后,同异型双功能交联剂 SMCC 活化的 H $\alpha$  1-210 蛋白混合,4℃过夜连接。

2. H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体的体外细胞系实验方法,其特征在于:包括以下步骤:

① 抗体标记及 iDC 培养:生物素标记表达纯化的 H $\alpha$  1-210-DEC205、H $\alpha$  1-210-GL117 偶联抗体以及 H $\alpha$  1-210,无菌取 C57BL/6 小鼠 (B6 鼠) 骨髓细胞,体外诱导培养 iDC;

② 亲和力检测:将生物素标记的偶联抗体同 iDC 共孵育后以 PE-Avidin 染色、流式细胞仪 (FlowCytometry, FCM) 分析 H $\alpha$  1-210-DEC205 与 iDC 的亲和力;

③ 体外 T 细胞增殖实验:通过皮下注射 H $\alpha$  1-210 与完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 的方案免疫 B6 鼠构建 EAMG 模型;无菌取 EAMG 鼠脾脏和淋巴结,制备单细胞悬液,抗小鼠 CD4 抗体免疫磁珠分离 T 细胞,作为反应细胞;分别加入不同偶联抗体与丝裂霉素 C 预处理的 iDC 共孵育体系, BrdU 掺入法分析 T 细胞的增殖;

④ 凋亡检测: FITC-AnnexinV/PI 染色分析 T 细胞的凋亡;

⑤ 细胞因子的检测: ELISA 检测培养上清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-10 等相关细胞因子的表达。

3. H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在体分析方法,其特征在于:包括以下步骤:

① 体内靶向 iDC:将生物素标记的不同偶联抗体皮下注射 EAMG 动物模型,注射后 24h,无菌取小鼠腹股沟淋巴结,制作冰冻切片, Avidin-PE (red) 染色,同时结合 FITC 标记抗 CD11c、抗 B220、以及抗 CD3 的抗体染色 (green),激光扫描共聚焦显微镜观察 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体对 iDC 的靶向性;

② EAMG 病情影响:偶联抗体同上治疗 4 周后评估 EAMG 症状的变化; ELISA 法检测血清抗 AchR 抗体水平;

③ 免疫耐受检测:取引流淋巴结体外培养,抗 CD11C 抗体免疫磁珠分离 DC 并鉴定其表型;抗 CD4 抗体分离 T 细胞并分别给予相关刺激后观察 AchR 特异性 T 细胞免疫耐受;培养细胞以 CD4、CD25 抗体标记后, FCM 分析 Treg 细胞的含量;

④ 长期治疗作用观察:偶联抗体同上作用后继续饲养 EAMG 小鼠 2 月,观察其长期治疗作用、测定 AchR 抗体水平、观察神经肌接头超微结构变化。

4. H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在自身免疫性疾病的治疗上的应用。

5. 根据权利要求 4 所述的 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在自身免疫性疾病的治疗上的应用,其特征在于: H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在 MG 疾病的治疗上的应用, H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体可体内靶向 iDC,诱导 AchR 特异性 T 细胞耐受。

## 一种偶联抗体的合成、检测方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物化学技术领域,尤其是涉及一种偶联抗体的合成、检测方法和应用。

### 背景技术

[0002] 重症肌无力(myastheniagravis, MG)是由乙酰胆碱受体(acetylcholinereceptor, AchR)抗体介导、T细胞依赖、补体参与的神经-肌肉接头处的自身免疫性疾病,体液免疫和细胞免疫均参与其发病。引发MG症状的直接原因是B细胞产生的AchR特异性抗体,然而该抗体的产生离不开AchR特异性T细胞的辅助。实验性自身免疫性重症肌无力(EAMG)是研究MG发病机制及治疗手段的理想模型。

[0003] 树突状细胞(dendritic cells, DC)是迄今发现功能最强的专职抗原递呈细胞,近年来的研究表明DC在诱导和维持机体免疫耐受中发挥着重要作用,尤其是未成熟DC(imature dendritic cells, iDC)可通过多种机制诱导抗原特异性T细胞耐受,在移植免疫耐受诱导、自身免疫性疾病治疗方面,展现出其独特的应用价值。

[0004] 为了寻求一种特异性的治疗MG的方法,即在不降低机体免疫力的情况下,仅抑制针对AchR的异常免疫应答,本发明从iDC入手,将MG的自身抗原-AchR $\alpha$ 1亚单位胞外段(H $\alpha$ 1-210)蛋白与DC表面特异性受体-DEC205单克隆抗体偶联,合成H $\alpha$ 1-210-DEC205偶联抗体,体内靶向iDC,诱导AchR特异性T细胞耐受,为MG的治疗提供了新的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种偶联抗体的合成和应用,为MG及多种自身免疫性疾病的治疗提供新的思路和理论依据。

[0006] 本发明的技术方案是:一种偶联抗体的合成方法,包括以下步骤:

[0007] ① H $\alpha$ 1-210蛋白表达、纯化、鉴定:采用RT-PCR的方法从表达人AchR的细胞系TE671中扩增AchR $\alpha$ 1亚单位胞外段基因(H $\alpha$ 1-210),同原核表达载体pET16b连接,构建重组表达载体,转化BL21感受态菌, IPTG诱导表达。SDS-PAGE鉴定蛋白的表达;Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化表达的蛋白。

[0008] ② DEC-205单克隆抗体纯化:MiniPerm系统中连续旋转培养分泌DEC-205, GL-117单克隆抗体的大鼠杂交瘤细胞,培养上清超滤浓缩后经50%饱和硫酸铵沉淀,最后经蛋白A/G亲和层析柱纯化;

[0009] ③ H $\alpha$ 1-210-DEC205偶联抗体合成:纯化后的抗体经2-巯基乙胺·盐酸还原后,同异型双功能交联剂SMCC活化的H $\alpha$ 1-210蛋白混合,4℃过夜连接,SDS-PAGE鉴定偶联抗体的合成;ELISA分别检测偶联后H $\alpha$ 1-210蛋白以及DEC-205抗体的活性。

[0010] 本发明的另一方面,还包括H $\alpha$ 1-210-DEC205偶联抗体的体外细胞系实验方法,包括以下步骤:

[0011] ① 抗体标记及iDC培养:生物素标记表达纯化的H $\alpha$ 1-210-DEC205、

H $\alpha$  1-210-GL117 偶联抗体以及 H $\alpha$  1-210 ;无菌取 C57BL/6 小鼠 (B6 鼠) 骨髓细胞,体外诱导培养 iDC ;

[0012] ②亲和力检测 :将生物素标记的偶联抗体同 iDC 共孵育后以 PE-Avidin 染色、流式细胞仪 (FlowCytometry, FCM) 分析 H $\alpha$  1-210-DEC205 与 iDC 的亲和力 ;

[0013] ③体外 T 细胞增殖实验 :通过皮下注射 H $\alpha$  1-210 与完全弗氏佐剂 (complete Freund' s adjuvant, CFA) 的方案免疫 B6 鼠构建 EAMG 模型 ;无菌取 EAMG 鼠脾脏和淋巴结,制备单细胞悬液,抗小鼠 CD4 抗体免疫磁珠分离 T 细胞,作为反应细胞 ;分别加入不同偶联抗体与丝裂霉素 C 预处理的 iDC 共孵育体系, BrdU 掺入法分析 T 细胞的增殖 ;

[0014] ④凋亡检测 :FITC-AnnexinV/PI 染色分析 T 细胞的凋亡 ;

[0015] ⑤细胞因子的检测 :ELISA 检测培养上清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-10 等相关细胞因子的表达。

[0016] 本发明的另一方面,还包括 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在体分析方法,包括以下步骤 :

[0017] ①体内靶向 iDC :将生物素标记的不同偶联抗体皮下注射 EAMG 动物模型,注射后 24h,无菌取小鼠腹股沟淋巴结,制作冰冻切片, Avidin-PE (red) 染色,同时结合 FITC 标记抗 CD11c、抗 B220、以及抗 CD3 的抗体染色 (green),激光扫描共聚焦显微镜观察 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体对 iDC 的靶向性 ;

[0018] ②EAMG 病情影响 :偶联抗体同上治疗 4 周后评估 EAMG 症状的变化 ;ELISA 法检测血清抗 AchR 抗体水平 ;

[0019] ③免疫耐受检测 :取引流淋巴结体外培养,抗 CD11C 抗体免疫磁珠分离 DC 并鉴定其表型 ;抗 CD4 抗体分离 T 细胞并分别给予相关刺激后观察 AchR 特异性 T 细胞免疫耐受 ;培养细胞以 CD4、CD25 抗体标记后, FCM 分析 Treg 细胞的含量 ;

[0020] ④长期治疗作用观察 :偶联抗体同上作用后继续饲养 EAMG 小鼠 2 月,观察其长期治疗作用、测定 AchR 抗体水平、观察神经肌接头超微结构变化。

[0021] 本发明的另一方面,还包括 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在自身免疫性疾病的治疗上的应用。

[0022] 优选的,还包括 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体在 MG 治疗上的应用,可体内靶向 iDC,诱导 AchR 特异性免疫耐受的形成。

[0023] 本发明具有的优点和积极效果是 :本发明通过化学的方法将 H $\alpha$  1-210 与 DC 表面特异性受体 -DEC205 单克隆抗体偶联,合成 H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体,体内靶向 iDC,使其有效摄取、递呈抗原给 AchR 特异性 T 细胞,在与 T 细胞相互作用时通过使 T 细胞发生无能、凋亡或激活调节 T 细胞以及表型转移等机制诱导 AchR 特异性免疫耐受的形成。

## 附图说明

[0024] 图 1 是重组载体 pET16b-H $\alpha$  1-210 构建。

[0025] 图 2 是蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

[0026] 图 3 是 ELISA 检测 H $\alpha$  1-210 蛋白的活性

[0027] 图 4 是 C57BL/6 小鼠 EAMG 症状的评估

[0028] 图 5 是 EAMG 大鼠血清抗体水平测定

- [0029] 图 6 是 DC 扫描电镜图像
- [0030] 图 7 是 FCM 分析、DC 表型鉴定
- [0031] 图 8 是 EAMG 小鼠血清中 anti-R97-116IgG 水平。
- [0032] 图 9 是 EAMG 小鼠血清中 anti-AChR  $\alpha$  亚基 IgG 水平。

### 具体实施方式

[0033] 下面结合附图对本发明做详细说明。

[0034] 本发明的一种偶联抗体的合成,包括以下步骤:

[0035] (1) 基因克隆:培养表达人 AChR 的细胞系 TE671, Trizol 提取细胞总 mRNA, Invitrogen 反转录试剂盒合成 cDNA, PCR 扩增 AChR  $\alpha$  1 亚单位胞外段 (H $\alpha$  1-210) 基因片段上游引物:5' GCG CAT ATG TCC GAA CAT GAG ACC CGT CT3', 下游引物:5' AT CGG ATC CTC CAG GCG CTA CAT GAC GAA GT3' (下划线分别为 NdeI 和 BamHI 的酶切位点)。

[0036] (2) 载体构建:将上述基因片段和 pET16b 原核表达载体以 NdeI 和 BamHI 酶切后,按照载体:片段 $\approx$ 1:5 的比例,使用 T4DNA 连接酶于 16℃ 过夜连接目的片段与载体。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  菌株,挑取阳性菌落培养后,取菌液小提质粒,NdeI 和 BamHI 双酶切及测序鉴定片段正确。

[0037] (3) H $\alpha$  1-210 蛋白表达、鉴定和纯化:选取鉴定正确的如图 1 所示的重组载体 pET16b-H $\alpha$  1-210, 转化 BL21 (DE3) pLysS 感受态菌,转化产物涂布于含 100mg/L 氯霉素 (Cam)、100mg/L 氨苄青霉素 (Amp) 双抗的 2 $\times$ YT 琼脂平板上,倒置平皿 37℃ 孵育 10h;随机挑取 5 个阳性转化子接种于 5mL 含 100mg/L Cam 和 100mg/L Amp 的 2 $\times$ YT 培养液,于 37℃、240rpm (振荡直径 200mm) 培养至 OD 值为 0.6,加入 IPTG 37℃ 诱导 4h。诱导前后菌液分别离心后冰浴超声裂菌。如图 2 所示,裂菌后上清及沉淀分别制样进行 SDS-PAGE 电泳,观察目的蛋白是否诱导表达;Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化表达的蛋白,SDS-PAGE 进一步鉴定 H $\alpha$  1-210 蛋白的表达,并用 Bradford 蛋白定量法检测蛋白浓度;用对 H $\alpha$  1-210 蛋白空间构象高度依赖的抗体 mAb35,如图 3 所示,通过间接 ELISA 检测蛋白的活性,H $\alpha$  1-210 蛋白与 mAb 35 特异性结合,提示重组蛋白具有正确空间构象。

[0038] (4) NLDC-145、GL-117 抗体纯化:分泌 DEC-205 单克隆抗体 (NLDC-145) 的大鼠杂交瘤细胞系 HB290 以及 DEC-205 同型对照抗体 (GL-117) 的杂交瘤细胞系购自美国 ATCC 公司,复苏后用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 MiniPerm (Heraeus, Gemeny) 系统中连续旋转培养,至培养液变黄后,收获大量培养上清。使用 PM10 膜 (Amicon, Danvers, USA) 超滤浓缩培养上清 10 ~ 20 倍,浓缩上清经 50% 饱和硫酸铵沉淀,4℃、15000r/min 离心, PBS 溶解沉淀物,溶解液置 PBS 透析 24h,其间换液 6 次,最后将待纯化的样品经蛋白 A/G 亲和层析柱纯化,ELISA 检测抗体的活性。

[0039] (5) H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体的合成:将纯化后的抗体经 2-巯基乙胺盐酸盐 (2-mercaptoethylamineHCL, MEA) 还原,通过凝胶过滤柱清除多余的还原剂;用异型双功能交联剂 Succinimidyl4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC; Pierce) 活化表达的 H $\alpha$  1-210 蛋白,然后将二者混合,4℃ 过夜连接。连接产物经凝胶过滤柱清除未反应应的交联剂 SMCC,并用蛋白 A/G 亲和层析柱去除未偶联的蛋白。SDS-PAGE 分别检测偶联后 H $\alpha$  1-210 蛋白以及 DEC-205 抗体的活性。

[0040] 本发明的另一方面,体外细胞系实验观察、分析 H $\alpha$  1-210-DEC205 对 iDC 的亲合力及诱导免疫耐受的作用:

[0041] ①偶联抗体标记和 iDC 培养:生物素标记表达纯化的 H $\alpha$  1-210 蛋白和偶联抗体 H $\alpha$  1-210-DEC205、H $\alpha$  1-210-GL117;从 B6 鼠骨髓中诱导培养 iDC。颈椎脱臼处死 B6 鼠,无菌手术取出股骨和胫骨,PBS 冲洗骨髓腔直至变白,骨髓悬液经 400 目滤网过滤去除组织碎片,用红细胞裂解液 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 去红细胞,不完全 RPMI1640 培养基洗涤 2 次,以含 GM-CSF 和 IL-10 质量浓度各 10ng/L 的完全 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为  $2 \times 10^6$  个/ml,置于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。每 2d 换液 1 次以移去悬浮生长的细胞克隆,并补充同体积的新鲜培养基和相同浓度的细胞因子,培养 6d 用倒置显微镜观察 DC 的形态,如图 6 所示,可见细胞表面存在大量皱褶和不规则突起,如图 7 所示并通过 FCM 对细胞表型进行鉴定。检测结果显示 DC 特征性表型:高表达 MHCI, MHCII 类分子,共刺激分子等,低表达单核细胞标志 CD14。表型结果为:HLA-ABC 为 95.5%,HLA-DR 为 92.9%,CD86 为 86.7%,CD83 为 27.6%,CD14 为 14% (图 7);以 FITC 标记的抗小鼠 MHC-II、CD80、CD86 抗体 FCM 分析细胞表面分子的表达,对 DC 未成熟表型进行鉴定;抗小鼠 NLDC-145 抗体鉴定 DC 细胞表面 DEC-205 受体的表达。

[0042] ② H $\alpha$  1-210-DEC205 偶联抗体对 iDC 的亲合力:将生物素标记的偶联抗体 H $\alpha$  1-210-DEC205 同体外诱导培养的 iDC 共孵育,以 H $\alpha$  1-210、H $\alpha$  1-210-GL117 为对照,孵育结束后以 Avidin-PE 染色,FCM 分析偶联抗体同 iDC 的亲合力,提示融合单链抗体与 iDC 具有较高亲合力。

[0043] ③混合淋巴细胞反应分析 H $\alpha$  1-210-DEC205 对 T 细胞增殖的影响:体外诱导培养 B6 小鼠的 iDC,用浓度为 25  $\mu$ g/ml 的丝裂霉素 C 于 37℃ 灭活 30min 作为刺激细胞;将亲和纯化的 H $\alpha$  1-210 蛋白混合完全弗氏佐剂免疫 B6 鼠构建 EAMG 主动免疫模型;无菌取 EAMG 小鼠脾脏和淋巴结,制备单细胞悬液,抗小鼠 CD4 抗体免疫磁珠分离 T 细胞,经 BrdU 标记后作为反应细胞;将反应细胞分别加入偶联抗体 H $\alpha$  1-210-DEC205 与 iDC 共孵育体系,以 H $\alpha$  1-210、H $\alpha$  1-210-GL117 为对照,48 小时后抗 BrdU 抗体染色,FCM 分析 T 细胞的增殖。

[0044] ④ AnnexinV/PI 分析 H $\alpha$  1-210-DEC205 诱导 T 细胞凋亡:将免疫磁珠分离的 T 细胞加入偶联抗体 H $\alpha$  1-210-DEC205、H $\alpha$  1-210-GL117、H $\alpha$  1-210 与丝裂霉素 C 预处理的 iDC 共孵育体系,孵育结束后,FITC-AnnexinV/PI 染色,FCM 分析 T 细胞的凋亡。

[0045] ⑤细胞因子的检测:偶联抗体 H $\alpha$  1-210-DEC205、H $\alpha$  1-210-GL117、H $\alpha$  1-210 与丝裂霉素 C 预处理的 iDC 共孵育体系中加入 T 细胞共培养,48h 后 ELISA 检测培养上清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\alpha$  IL-2、IL-4、IL-10 等相关细胞因子的表达。

[0046] 本发明的另一方面:在体分析 H $\alpha$  1-210-DEC205 诱导免疫耐受及对 EAMG 的治疗作用:

[0047] ① EAMG 动物模型的构建、评估及分组:

[0048] (一) 小鼠 EAMG 模型的建立:

[0049] 将 50  $\mu$ g R97-116 肽段溶于 100  $\mu$ l 无菌 PBS,1mg H37RA/rat 溶于 100  $\mu$ l CFA,用匀浆机将两者混匀为油包水样,直至抗原乳剂在水中不分离。将 20 只 C57BL/6 野生雌性小鼠随机分为两组,实验组小鼠第 0 天,后肢足垫和肩胛部皮下注射抗原乳剂 200  $\mu$ l,对照组小鼠同样部位皮下注射无 R97-116 肽段的乳剂。皮下注射时应尽量避开脚底血管,缓慢注

射并在注射完毕后静置 1min,防止皮内的抗原乳液随着针头拔出而流出来。第 30 天,60 天实验组小鼠皮下注射抗原乳剂 (50  $\mu$ g R97-116,100  $\mu$ l 无菌 PBS,100  $\mu$ l IFA),对照组小鼠注射无抗原的乳剂 (100  $\mu$ l 无菌 PBS 和 100  $\mu$ l IFA)。第二次免疫之后,每周称小鼠体重,参照 Fulvio Baggi 的评分标准,两人以上同一时间评估 EAMG 的发病情况。小鼠在 R97-116 造模前,造模后取血清。

[0050] 肌无力分级如下:

[0051] 0 级:正常肌力和无异常状态。

[0052] 1 级:活动中等减少,无力抓握和嘶鸣,运动试验(在鼠笼上连续抓爬 30s)后症状明显:低头,弯腰弓背,肌肉震颤,肌力下降。

[0053] 2 级:没有进行运动试验,症状明显:低头,弯腰弓背,肌肉震颤,肌力下降。

[0054] 3 级:没有进行运动实验,症状很明显而且无力,濒死。

[0055] 4 级:死亡。

[0056] R97-116 抗体检测:

[0057] 1) 5  $\mu$ g R97-116 多肽溶于 100  $\mu$ l 包被缓冲液,然后包被在 96 孔 ELISA 板 4℃ 过夜。

[0058] 2) 移去各孔内的液体,拍干,用 200  $\mu$ l ELISA 封闭液室温封闭 1h。

[0059] 3) 小鼠血清用 PBS 稀释 200 倍,每孔加入 100  $\mu$ l 稀释的小鼠血清室温孵育 2h。

[0060] 4) PBS/Tween 20 洗 3 遍,拍干,加入 100  $\mu$ l Goat Anti-Mouse IgG(1:5000 倍稀释)室温孵育 1h。

[0061] 5) 移去各孔内的液体,拍干,ABTS 显色,1% SDS 终止,405nm 处测 OD 值。

[0062] 小鼠 AchR  $\alpha$ 1 亚基抗体检测

[0063] 按照说明书进行操作,样本处理,配置试剂,每个样本设置复孔。

[0064] 1) 按照说明书进行标准品稀释与加样。

[0065] 2) 加样:分别设空白孔、待测样品孔。加样时尽量不触及孔壁,将样品加于孔的底部,轻轻震动混匀。

[0066] 3) 温育:室温孵育 30min。

[0067] 4) 洗涤:弃去液体,拍干,洗涤液洗 5 遍,拍干。

[0068] 5) 加酶:除空白孔外,每孔加入酶标试剂 50  $\mu$ l,温育 30min。

[0069] 6) 显色:洗涤液洗 5 遍,拍干。加入显色剂 A 50  $\mu$ l,再加入显色剂 B 50  $\mu$ l,轻轻震动混匀,37℃ 避光显色 15min。

[0070] 7) 终止:每孔加入终止液 50  $\mu$ l,终止反应。

[0071] 8) 测定:450nm 处测 OD 值。

[0072] 本实验采用 R97-116 肽段混合弗氏佐剂,在小鼠后肢脚垫部和肩胛部皮下注射。从第二次免疫后,部分小鼠出现不同程度的肌力减低,弯腰弓背,体重减轻,有些小鼠不需运动试验就会出现抓握无力,活动明显减少。自第三次免疫后,小鼠症状逐渐加重,有些小鼠明显体重减轻,毛发粗糙,甚至出现瘫痪、濒死。EAMG 发病小鼠:活动明显减少,弓腰弯背,头低,毛色粗糙。EAMG 未发病小鼠:活动正常,毛发发亮。第三次免疫观察一个月后,EAMG 的成功率约为 50%。如表 1 所示:

[0073] 表 1 EAMG 小鼠临床症状评分

[0074]

| 免疫小鼠 | 第一次免疫<br>30 day | 第二次免疫<br>60 day | 第三次免疫<br>90 day |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1    | 0 级             | 0 级             | 0 级             |
| 2    | 0 级             | 0 级             | 0 级             |
| 3    | 0 级             | 0 级             | 死亡              |
| 4    | 0 级             | 1 级             | 1 级             |
| 5    | 0 级             | 2 级             | 3 级             |
| 6    | 0 级             | 0 级             | 0 级             |
| 7    | 0 级             | 1 级             | 2 级             |
| 8    | 0 级             | 死亡              | ----            |
| 9    | 0 级             | 1 级             | 2 级             |

[0075]

|    |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|
| 10 | 0 级 | 0 级 | 1 级 |
|----|-----|-----|-----|

[0076] Note :表 1 :第二次免疫之后,参照 Fulvio Baggi 的评分标准,每周两人以上同一时间评估 EAMG 的发病情况。

[0077] (二)EAMG 小鼠血清中抗 R97-116 抗体的变化

[0078] R97-116 肽段免疫注射前及第三次免疫注射后取小鼠血清,ELISA 板包裹 R97-116 肽段比较小鼠血清中 anti-R97-116IgG 浓度变化。如图 6 所示,与造模前相比,造模后血清中 anti-R97-116IgG 浓度明显升高,说明小鼠体内产生了较强的 anti-R97-116IgG。

[0079] 小鼠造模前后分别取血清,ELISA 检测 EAMG 小鼠造模前后血清中 anti-R97-116IgG 分泌水平。

[0080] (三)EAMG 小鼠血清中 anti-AChR $\alpha$ 1 亚基抗体的变化

[0081] 取 EAMG 造模前后的血清,按照 Mouse AChRab Elisa kit 说明书操作,如图 9 所示,与造模前相比,造模后小鼠体内 anti-AChR $\alpha$ 1 亚基抗体浓度明显升高,说明造模后小鼠自身主动产生了针对 AChR $\alpha$ 1 亚基的抗体。

[0082] 从 EAMG 小鼠体内抗体的变化及临床症状的改变等结果表明 EAMG 小鼠造模成功。

[0083] ② H $\alpha$ 1-210-DEC205 体内靶向 iDC :将生物素标记的偶联抗体 H $\alpha$ 1-210-DEC205 皮下注射 EAMG 动物模型,以 H $\alpha$ 1-210、H $\alpha$ 1-210-GL117 为对照,注射后 24h,无菌取小鼠腹股沟淋巴结,制作冰冻切片,丙酮常温固定 5min,自然干燥后湿盒内染色。PE-Avidin 染色,同时结合 FITC 标记抗 CD11c、抗 B220、以及抗 CD3 的抗体染色,采用叠加法,激光扫描共聚焦显微镜观察偶联抗体对 iDC 的靶向性,H $\alpha$ 1-210-DEC205 不能与 B 细胞结合,也不能结合到 CD3 阳性的 T 细胞。但是 AChR $\alpha$ 1-scFv205 结合到的细胞和 CD 11C 标记的 DC 重叠,说明 AChR $\alpha$ 1-scFv205 结合到 DC。

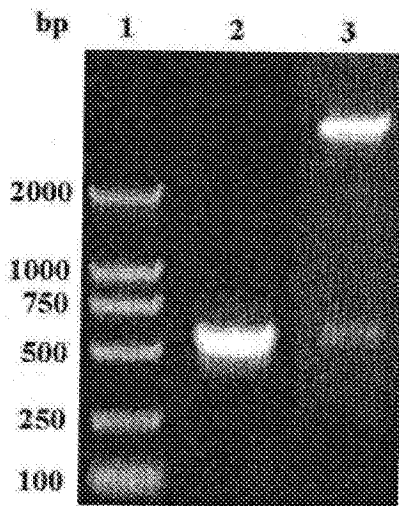
[0084] ③ H $\alpha$ 1-210-DEC205 对 EAMG 小鼠肌无力症状的影响 :将偶联抗体

H $\alpha$  1-210-DEC205 以 20  $\mu$ g/ 只皮下注射 EAMG 小鼠, 对照组给予同等剂量的 H $\alpha$  1-210、H $\alpha$  1-210-GL117, 每周 3 次, 共 4 周; 结合上述评估指标, 比较分析不同治疗组间在 EAMG 症状上的差别; 每周通过尾静脉取血, 留取血清标本, ELISA 法检测小鼠外周血抗 AchR 抗体水平。

[0085] ④ H $\alpha$  1-210-DEC205 对 EAMG 小鼠免疫耐受的诱导: 偶联抗体同上治疗 4 周后处死小鼠, 取引流淋巴结体外培养, 抗 CD11C 抗体免疫磁珠分离小鼠淋巴结 DC 细胞, 以 FITC 标记的抗小鼠 MHC-II、CD80、CD86 抗体 FCM 鉴定 DC 未成熟表型; 抗 CD4 抗体免疫磁珠分离小鼠淋巴结 T 细胞, 分别给予 H $\alpha$  1-210、PBS、ConA 刺激, BrdU 掺入法检测 T 淋巴细胞增殖反应; 同时检测细胞培养上清中 IFN- $\gamma$ 、TGF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-10 等相关细胞因子的表达; 培养细胞以 CD4、CD25 抗体标记后, FCM 分析 Treg 细胞的含量。

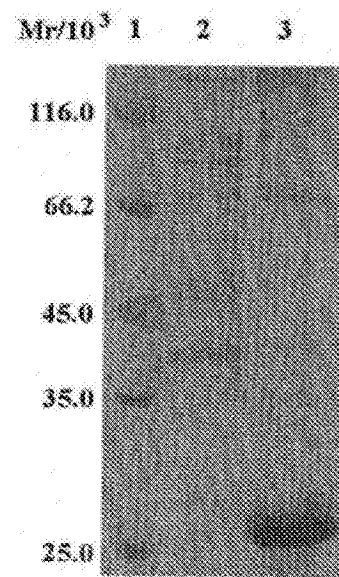
[0086] ⑤ H $\alpha$  1-210-DEC205 治疗作用的长期观察: 偶联抗体同上作用后继续饲养 EAMG 小鼠 2 月, 观察小鼠饮食、体重、活动性等一般指标; 每两周尾静脉取血检测抗 AchR 抗体水平, 继续观察 EAMG 症状指标; 同时, 透射电镜观察动物模型神经肌接头超微结构变化, 如突触后膜表面积、乙酰胆碱受体的数量等; 免疫电镜观察神经肌接头处补体 C3 以及免疫复合物的沉积情况。

[0087] 以上对本发明的一个实施例进行了详细说明, 但所述内容仅为本发明的较佳实施例, 不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等, 均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。



1. DL 2000 Marker
2. Ha1-210 PCR 片段
3. 重组质粒 pET16b-Ha1-210 酶切鉴定

图 1



1. Protein Marker
2. 穿过  $\text{Ni}^{2+}$  柱后的穿透液
3. 纯化后的蛋白样品

图 2

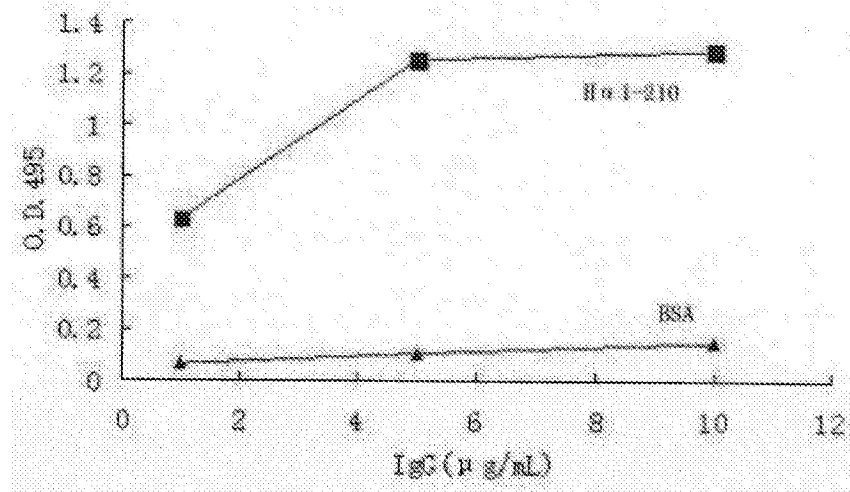


图 3

| 剂量组         | 第一次免疫                          |                                | 第二次免疫                          |
|-------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|             | 第6天                            | 第20天                           | 第6天                            |
| 对照组         | 0级 (4)                         | 0级 (4)                         | 0级 (4)                         |
| 50 $\mu$ g  | 0级 (4)                         | 0级 (3)<br>5级 (1)               | 0级 (3)                         |
| 100 $\mu$ g | 0 <sup>+</sup> 级 (4)           | 0 <sup>+</sup> 级 (3)<br>5级 (1) | 1级 (3)                         |
| 200 $\mu$ g | 1级 (3)<br>1 <sup>+</sup> 级 (1) | 1级 (3)<br>1 <sup>+</sup> 级 (1) | 2级 (2)<br>5级 (2)               |
| 400 $\mu$ g | 2级 (2)<br>3级 (2)               | 2级 (2)<br>3级 (2)               | 3 <sup>+</sup> 级 (1)<br>5级 (3) |

图 4

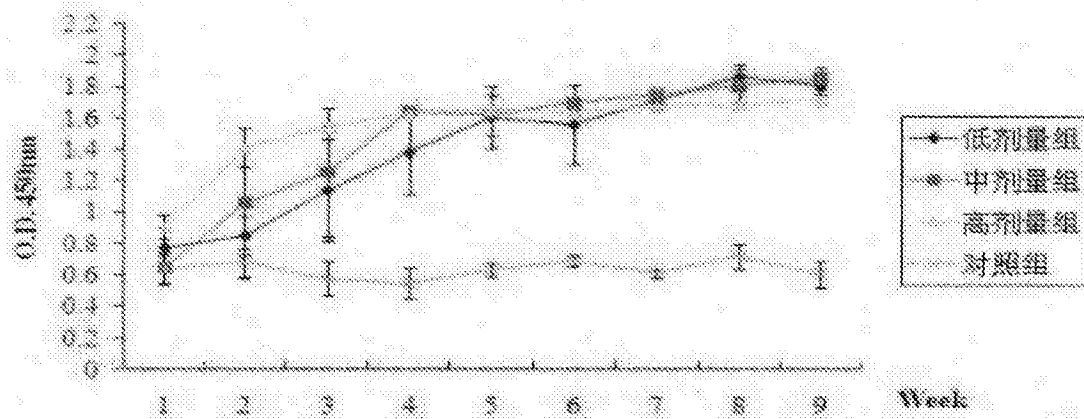


图 5

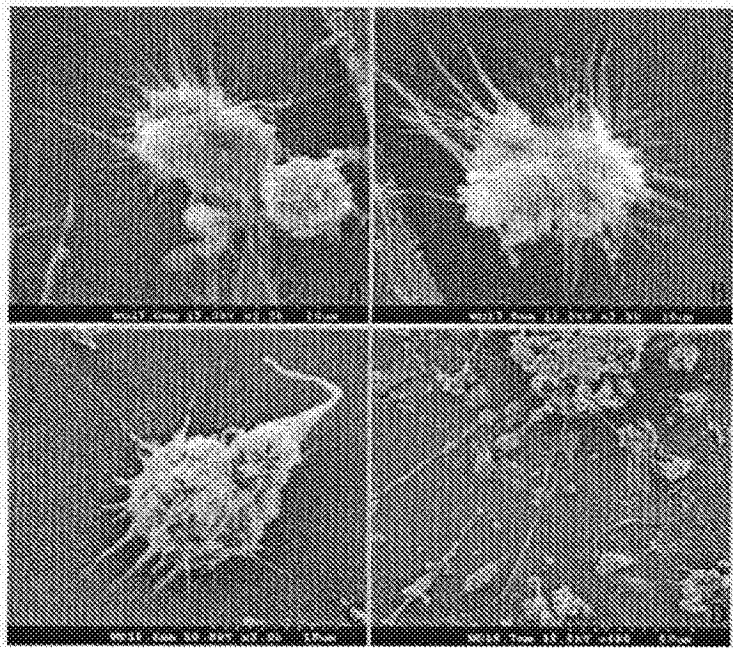


图 6

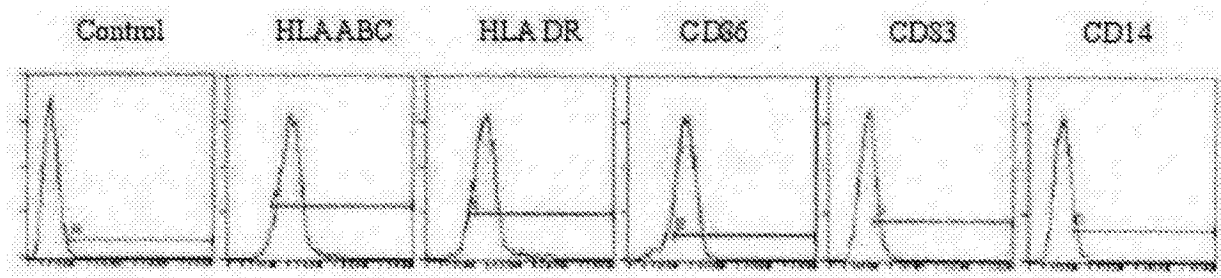


图 7

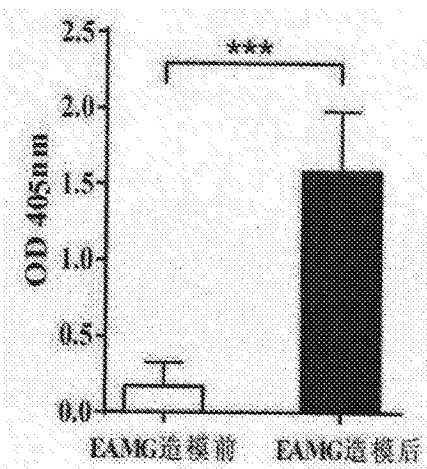


图 8

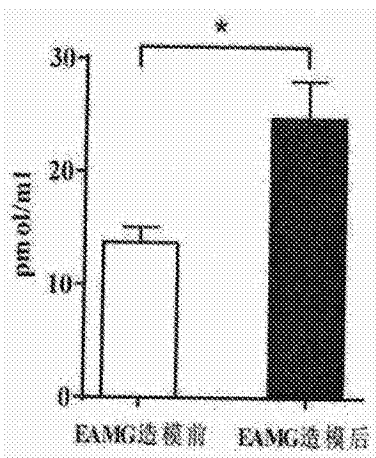


图 9

|                |                                                                                           |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种偶联抗体的合成、检测方法和应用                                                                         |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN105348393A</a>                                                              | 公开(公告)日 | 2016-02-24 |
| 申请号            | CN201510814932.4                                                                          | 申请日     | 2015-11-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中国人民解放军第四军医大学                                                                             |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 中国人民解放军第四军医大学                                                                             |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 中国人民解放军第四军医大学                                                                             |         |            |
| [标]发明人         | 常婷<br>林宏<br>李柱一                                                                           |         |            |
| 发明人            | 常婷<br>林宏<br>李柱一                                                                           |         |            |
| IPC分类号         | C07K19/00 G01N33/68 G01N33/53 A61K49/00 A61K38/17 A61K47/48 A61P37/02 A61P21/04 A61K47/68 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                            |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供一种偶联抗体的合成和应用，公开了Hα1-210-DEC205偶联抗体合成方法：包括以下步骤：①Hα1-210蛋白表达、纯化、鉴定，②DEC-205单克隆抗体，③Hα1-210-DEC205偶联抗体合成；同时公开了Hα1-210-DEC205偶联抗体的体外细胞系实验方法和在体分析方法。本发明的有益效果是不降低机体免疫力的情况下，仅抑制针对AChR的异常免疫应答，起到治疗MG的作用。

