



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102850457 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 02

(21) 申请号 201110178343. 3

A61P 3/10 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 06. 28

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 陈思锋 栾丽娟 孟丹 陆超
侯彦强

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所 (普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 16/42 (2006. 01)

C07K 16/06 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 6 页

(54) 发明名称

自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法
和用途

(57) 摘要

本发明属于生物医学技术领域, 涉及自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法和应用。包括以自身抗体做为抗原的抗原制备、以自身抗体做为抗原免疫试验对象、获取抗自身抗体的抗体, 制得抗总 IgG 的抗血清命名为 NIgG 抗血清。通过实验证实所制备的抗自身抗体的抗体可治疗 1 型糖尿病, 可降低血糖, 降低 1 型糖尿病的发病率和死亡率, 保护胰岛细胞, 有效防治胰岛炎症的发生。本发明为寻找治疗自身免疫性疾病的药物、治疗临床上由于自身免疫性疾病引起的一系列代谢紊乱引起的疾病提供了依据; 为临床研究与实践提供了一种针对自身免疫性糖尿病的治疗策略。

1. 自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体,其特征在于,通过下述方法制备:包括以自身抗体做为抗原的抗原制备、以自身抗体做为抗原免疫试验对象、获取抗自身抗体的抗体,

首先用亲和层析方法提取试验对象 I 血清总抗体 IgG,以该总 IgG 为抗原与免疫佐剂混合,免疫试验对象 II,制得抗总 IgG 的抗血清,命名为 NIgG 抗血清;

所述的总 IgG 包括试验对象 I 的正常健康的 IgG 和自身抗体 IgG。

2. 按权利要求 1 所述的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体,其特征在于,所述的试验对象 I 和试验对象 II 同源。

3. 按权利要求 1 或 2 所述的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体,其特征在于,所述的所述的试验对象 I 为 6 周龄 NOD 小鼠,所述的试验对象 II 为正常 Balb/c 小鼠。

4. 按权利要求 1 所述的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体,其特征在于,所述的抗自身抗体的抗体还包括抗自身抗体的单克隆和多克隆抗体

5. 制备权利要求 1 的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体的方法,其特征在于,其包括步骤:

1) 获取试验对象 I 的血清及血清总 IgG

总 IgG 采用亲和层析的方法提取;

2) 制备和提取被免疫的试验对象 II 的抗血清

将上述获取的总 IgG 蛋白作为抗原与佐剂等体积混合后非消化道给药免疫试验对象 II;

免疫方案为两次基础免疫加一次加强免疫共三次;

获得免疫的试验对象 II 的血清,命名为 NIgG 抗血清。

6. 权利要求 1 的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体在制备治疗自身免疫性疾病药物中的用途。

7. 权利要求 1 的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体在制备治疗 I 型糖尿病药物中的用途。

8. 按权利要求 6 或 7 所述的用途,其特征在于,所述的治疗给药途径是非消化道给药。

9. 权利要求 1 的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体在检测分泌自身抗体的细胞及其检测方法中的用途。

10. 权利要求 1 的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体在检测组织和体液中的自身抗体中的用途。

11. 权利要求 5 的方法在制备抗自身抗体的单克隆和多克隆抗体中的用途。

12. 权利要求 5 的方法在制备抗自身抗体的抗体的基因和相关核酸物质中的用途。

13. 权利要求 5 的方法在制备抗自身抗体的抗体的基因和相关核酸物质相关的多肽和蛋白质中的用途。

自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,涉及自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体,具体涉及自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法和该抗体对 1 型糖尿病治疗的应用。

背景技术

[0002] 现有技术公开了自身免疫性疾病 (autoimmune diseases) 是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病,其以特定 B 淋巴细胞克隆的过度激活和产生大量自身抗体为特征 (C. Hu, F. S. Wong, L. Wen, 2009, *Clinical and Experimental Immunology*. 157 :181-190)。目前针对自身抗体来治疗自身免疫性疾病的方法尚未见报道。

[0003] 当前对自身免疫性疾病的治疗主要包括糖皮质激素、免疫抑制剂、细胞毒类药物如环孢霉素 A 等,主要是非选择性地抑制全部或者一大类 T、B 淋巴细胞的功能和增殖,在一定程度上控制病情的发展。研究表明,如果长期或者大量使用这些药物,毒副作用大,对机体免疫功能造成严重的损伤。因此寻找新的更有效及更彻底的干预自身免疫性疾病的药物有着重要的理论意义和应用价值。

[0004] 据报道,在机体发育过程中,由于遗传等因素,某些针对机体自身抗原的 B 淋巴细胞克隆规避了免疫耐受的杀灭作用。每一 B 细胞克隆只能产生一种特定的抗体。当针对自身抗原的特定 B 淋巴细胞克隆在成体时与相应的自身抗原相遇,即被激活,分化增殖,产生大量自身抗体,引起自身免疫反应,破坏带有相应自身抗体的组织细胞。产生自身抗体的 B 细胞不论是激活还是非激活状态,表面均带有自身抗体。因此,有研究者假设,通过制备抗自身抗体的抗体,将过量的这种抗自身抗体的抗体一次性注入患自身免疫疾病的个体体内,不但可中和体液中的自身抗体,还可以与产生自身抗体的 B 细胞表面的自身抗体结合,诱发抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 或补体依赖的细胞毒作用 (CDC),选择性地杀灭分泌自身抗体的 B 淋巴细胞的克隆,从而起到治疗自身免疫性疾病的目的。由于选择性地只杀灭产生自身抗体的 B 淋巴细胞,而且只注射一次,所以能避免非特异免疫治疗的副作用。

[0005] 1 型糖尿病是一种器官特异性的自身免疫性疾病,是以胰岛 β 细胞破坏导致胰岛素绝对缺乏所引起的一系列糖代谢紊乱为主要表现的临床综合症。其主要发病机制是自身免疫反应,机体在遗传因素和环境因素的影响下,体内的体液免疫反应和细胞免疫反应启动后使循环血液出现了针对体内某些抗原组分的自身抗体,自身抗体还可以与胰岛素抗原结合,使其不能发挥正常的功能。约 90% 新发病的糖尿病病人循环血液中检测到有胰岛 β 细胞抗体的存在 (Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA, 1997, *Diabetes*. 46 (11) :1701-1710)。自身抗体主要是通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 和补体依赖性的细胞毒作用 (CDC),破坏胰腺细胞,使胰岛 β 细胞分泌胰岛素的绝对量显著下降。因此,自身抗体将在 1 型糖尿病的发生发展中具有重要作用。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法。

[0007] 本发明的进一步目的是提供所述自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体在制备治疗 1 型糖尿病的药物中的应用。

[0008] 本发明的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体,其特征在于,通过下述方法制备,包括以自身抗体做为抗原的抗原制备、以自身抗体做为抗原免疫试验对象、获取抗自身抗体的抗体,

[0009] 首先用亲和层析方法提取试验对象 I 血清总抗体 IgG,以该总 IgG 为抗原与免疫佐剂混合,免疫试验对象 II,制得抗总 IgG 的抗血清,命名为 NIgG 抗血清;

[0010] 所述的总 IgG 包括试验对象 I 的正常健康的 IgG 和自身抗体 IgG。

[0011] 本发明中,所述的试验对象 I 和试验对象 II 同源。

[0012] 本发明中,所述的所述的试验对象 I 为 6 周龄 NOD 小鼠,所述的试验对象 II 为正常 Balb/c 小鼠。

[0013] 本发明中,还包括所述的抗自身抗体的单克隆和多克隆抗体及其制备方法。

[0014] 本发明所述的抗自身抗体的抗体的制备方法的部分技术可用于制备抗自身抗体的抗体的基因和相关核酸物质,进一步的制备相关的多肽和蛋白质及其生产的衍生物;更进一步的对所制备抗自身抗体的单克隆和多克隆抗体进行结构和剂型改造制成产品。

[0015] 本发明制备抗自身抗体的抗体的方法和原理是:每种抗体与其特定抗原结合的结合片断都是不同的,自身抗体结合片断上的特殊结合序列对于不产生自身抗体的动物或者人类个体来说是外来抗原,不产生自身抗体的动物或者人类个体在接触这些特殊结合序列抗原后可产生针对这些特殊结合序列的抗体,即抗自身抗体的抗体。

[0016] 本发明的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体可用于制备治疗 I 型糖尿病的药物。所述的抗自身抗体的抗体药物治疗自身免疫疾病的给药途径是非消化道给药。

[0017] 本发明中,提供了所述的抗自身抗体的抗体对自身免疫疾病的治疗试验方案,所用的剂量、途径、周期、及具体的实施方法。

[0018] 本发明的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体还可用于检测分泌自身抗体的细胞及其检测方法。

[0019] 本发明的自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体还可用于检测组织和体液中的自身抗体。

[0020] 本发明所制备的抗自身抗体的抗体用于治疗自身免疫疾病的原理是:每一 B 细胞克隆只能产生一种特定的抗体。产生自身抗体的 B 细胞不论是激活还是非激活状态,表面均带有自身抗体。过量抗自身抗体的抗体不但可中和体液中的自身抗体,还可以与产生自身抗体的 B 细胞表面的自身抗体结合,诱发抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用或补体依赖的细胞毒作用,选择性地杀灭分泌自身抗体的 B 淋巴细胞的克隆,从而起到治疗自身免疫性疾病的目的。

[0021] 为了便于理解,下面以抗非肥胖型 1 型糖尿病小鼠 (NOD) 自身抗体的多克隆抗体制备和应用为例,进一步阐述本发明。

[0022] 本发明采用 NOD 小鼠作为 1 型糖尿病的动物模型, NOD 小鼠能够自然发生 1 型糖尿病,其发病是遗传学和免疫学相结合的自身免疫反应过程,具有很多类似人类自身免疫性糖尿病的特征。

[0023] 本发明通过动物实验证实本发明制备的抗自身抗体的抗体治疗 1 型糖尿病 (NOD) 小鼠,可降低小鼠血糖,降低其发病率和死亡率,保护胰岛细胞不被破坏,能有效防治 1 型糖尿病的发生。其机制与该血清降低 1 型糖尿病小鼠血清中的自身抗体,并选择性的杀灭分泌自身抗体的 B 细胞有关。

[0024] 本发明中,首先用亲和层析方法提取纯化 6 周龄 NOD 小鼠血清中的总抗体 IgG,总 IgG 既包括正常健康的 IgG,也包括自身抗体 IgG;以此总 IgG 做为抗原与免疫佐剂混合,免疫与 NOD 小鼠同源的正常 Balb/c 小鼠,制备出抗总 IgG 的抗血清,本发明中将它命名为 NIgG 抗血清;

[0025] 将所述的 NIgG 抗血清应用于发病前的 6 周龄的 NOD 小鼠,本发明的一个实施例中,采用一次性尾静脉注入方式,以注入 PBS(磷酸盐缓冲液)的 NOD 小鼠为对照,观察至 32 周,结果显示,该抗血清能有效降低 NOD 小鼠血糖,降低其发病率和死亡率,并保护胰岛细胞不被破坏,有效的防治 1 型糖尿病的发生。

[0026] 免疫组织化学染色证实,本发明制得的抗血清治疗 NOD 小鼠 26 周后,与 PBS 对照组相比,小鼠体内血清中的自身抗体含量明显降低,脾脏中分泌自身抗体的 B 细胞数量降低,表明所制得的抗血清能选择性的杀灭分泌自身抗体的 B 细胞。

[0027] 本发明的目的通过下述方法和步骤实现:

[0028] 1:获取 6 周龄 NOD 小鼠的血清及血清总 IgG

[0029] 总 IgG 采用亲和层析的方法提取;

[0030] 2:被免疫的 Balb/c 小鼠中抗血清的制备和提取

[0031] 将上述获取的小鼠血清总 IgG 蛋白作为抗原与佐剂等体积混合后非消化道给药免疫 Balb/c 小鼠;

[0032] 免疫方案为两次基础免疫加一次加强免疫共三次;

[0033] 获得 NOD 小鼠血清 IgG 免疫的 Balb/c 小鼠的血清,命名为 NIgG 抗血清;

[0034] 3:用于 NOD 小鼠的

[0035] 将所述的 NIgG 抗血清单次大剂量以非消化道给药用于 6 周龄 NOD 小鼠及同龄的对照 Balb/c 小鼠;

[0036] 4:效果观察

[0037] 观察血糖趋势,根据血糖变化记录每组小鼠每周糖尿病发病数量,死亡数量;

[0038] 5:观察治疗后 NOD 小鼠的胰岛体积及炎症浸润面积的变化

[0039] 小鼠胰岛组织石蜡切片制备;

[0040] 胰岛组织的 HE 染色;

[0041] 胰岛胰腺体积比及胰岛中炎症浸润面积的计算;

[0042] 6:观察治疗后 NOD 小鼠血清中自身抗体的相对数量变化(免疫组织化学染色方法)

[0043] Balb/c 正常小鼠胰腺组织石蜡切片制备;

[0044] 治疗前 6 周龄和治疗 26 周后的 NOD 小鼠的血清作为一抗染色 Balb/c 小鼠胰岛组织的免疫组织化学染色;

[0045] 7:观察脾脏中分泌自身抗体的 B 淋巴细胞的相对数量变化(免疫组织化学染色方法)

[0046] 治疗前 6 周龄 NOD 小鼠和抗血清 NIgG 治疗 26 周后的 NOD 小鼠脾脏组织石蜡切片制备 ;1% 的 NIgG 抗血清作为一抗染色 Balb/c 小鼠脾脏组织的免疫组织化学染色。

[0047] 结果显示,

[0048] 获得的抗血清能有效降低 NOD 小鼠血糖,降低其发病率和死亡率,并保护胰岛细胞不被破坏,有效的防治 1 型糖尿病的发生。免疫组织化学染色证实,制得的抗血清使小鼠体内血清中的自身抗体含量明显降低,脾脏中分泌自身抗体的 B 细胞数量降低。

[0049] 本发明中,所采用的实验动物和材料,其中:

[0050] NOD 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心,经过血清中自身抗体检测实验证实 6-8 周 NOD 小鼠血清中有自身抗体的存在 ;Balb/c 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心 ;啮齿类动物普通饲料 (复旦大学实验动物部) ;NIgG antiserum 是用 NOD 小鼠的 IgG 免疫 Balb/c 小鼠制备 ;抗体纯化试剂盒 (Antibody purification kit)、免疫佐剂 (Sigma ajuvant system) 购自美国 sigma 公司 ;血糖测量仪及试纸 (Optium exceed) 购自美国雅培公司 ;Rat-anti-mouse CD45R 抗体 (cambridge science park,UK) ;nomal donkey serum、donkey-anti-rat conjugated with HRP、affinity-purified Fab fragment Donkey Anti-Mouse IgG(H+L)、donkey-anti-mouse IgG(H+L)-HRP、donkey-anti-mouse antibody conjugated with CY³、donkey-anti-rat secondary antibody conjugated with FITC 均购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司 ;Rabbit anti-mouse insulin antibody、Goat anti-rabbit conjugated with HRP 购自上海优宁维生物公司 ;DAB 显色试剂盒购自上海长岛肾病理研究所。

[0051] 本发明为寻找治疗自身免疫性疾病的药物、治疗临床上由于自身免疫性疾病引起的一系列代谢紊乱引起的疾病提供了依据 ;为临床研究与实践提供了一种针对自身免疫性糖尿病的治疗策略,该策略也可用于其它自身免疫性疾病的治疗 ;也为进一步分析抗自身抗体血清在治疗和调节 1 型糖尿病的作用机制奠定了基础。

[0052] 为了便于理解,以下将通过具体的附图和实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,具体实例和附图仅是为了说明,显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明,在本发明的范围内对本发明做出各种各样的修正和改变,这些修正和改变也纳入本发明的范围内。

附图说明

[0053] 图 1A 抗血清 NIgG 治疗对 NOD 小鼠发病率的影响。

[0054] Control :NOD 小鼠 PBS 对照组 ;NIgG-treated :NOD 小鼠抗血清 NIgG 治疗组。

[0055] 图 1B 抗血清 NIgG 治疗对 NOD 小鼠空腹血糖的影响。

[0056] *P < 0.05, **P < 0.01 for NIgG-treated vs. Control。

[0057] 图 1C 抗血清 NIgG 治疗对 NOD 小鼠死亡率的影响。

[0058] 26w Ctrl :NOD 小鼠 PBS 26 周对照组 ;26w Treated :NOD 小鼠抗血清治疗 26 周组。

[0059] 图 2A 抗血清 NIgG 治疗对 NOD 小鼠胰岛炎症浸润的影响,图为 HE 染色。

[0060] 0d Ctrl :6 周龄 NOD 小鼠治疗前组 ;26w Ctrl :NOD 小鼠 PBS 26 周对照组 ;26w Treated :NOD 小鼠抗血清治疗 26 周组。

[0061] 图 2B 抗血清 NIgG 治疗对 NOD 小鼠胰岛炎评分的影响。

- [0062] 0分:无淋巴细胞的浸润;1分:胰岛周边淋巴细胞浸润面积 $< 25\%$;
- [0063] 2分:胰岛被淋巴细胞浸润面积在 $25\% - 50\%$ 之间;3分:胰岛被淋巴细胞浸润面积 $> 50\%$ 。
- [0064] 图2C各组小鼠的胰岛胰腺体积比值的统计计算。
- [0065] 图3抗血清NIgG治疗对NOD小鼠血清中的自身抗体数量的影响。
- [0066] 正常Ba1b/c小鼠胰腺组织的免疫组织化学染色,以治疗前后NOD小鼠血清作为一抗检测血清中自身抗体的数量。Negative Control:阴性对照;0d Ctrl:6周龄NOD小鼠组;26w Ctrl:NOD小鼠PBS 26周对照组;26w Treated:NOD小鼠抗血清治疗26周组。
- [0067] 图4A抗血清NIgG治疗后对NOD小鼠脾脏中分泌自身抗体的B细胞数量的影响。
- [0068] 治疗前后NOD小鼠脾脏组织的免疫组织化学染色,以NIgG抗血清作为一抗检测脾脏中分泌自身抗体的B细胞。
- [0069] 图4B抗血清NIgG治疗后对NOD小鼠脾脏中B细胞的数量影响。
- [0070] 治疗前后NOD小鼠脾脏组织的免疫组织化学染色,以抗CD45R单克隆抗体作为一抗检测脾脏中的B细胞。

具体实施方式

- [0071] 实施例1
- [0072] 1,提取6周龄NOD小鼠的血清及血清总IgG
- [0073] 按常规方法获得NOD小鼠的血清约1ml,于eppendorf管中 4°C 放置1h,3000rpm离心15min获得血清约400ul/每只;
- [0074] 血清中总IgG的提取:将蛋白A(一种分离自G型链球菌的细胞壁蛋白)共价偶联至琼脂糖支持物上,通过与血清中IgG的Fc片段结合以提取NOD小鼠血清中的IgG。
- [0075] 亲和层析提取血清IgG:
- [0076] (1)取1ml的亲和层析柱子于架子上固定,用缓冲液A约10ml平衡柱子,即10个柱床体积,流速为1ml/min,
- [0077] (2)将NOD小鼠血清用缓冲液A稀释到原体积的2倍,将血清加入柱中,使血清慢慢渗入胶中,关闭柱子下口约2h,使血清中IgG与胶中的Protein A充分结合,
- [0078] (3)打开柱子下口,用缓冲液A约10ml冲洗柱床,流速为1ml/min,
- [0079] (4)换用缓冲液B洗脱,流速约1ml/min,收集洗脱峰,
- [0080] (5)用纯水清洗柱床约10个柱床体积,再用20%乙醇清洗柱床约10个柱床体积,流速约2ml/min,柱子置于 4°C 环境保存,
- [0081] (6)将收集到的峰值IgG蛋白的进行定量和鉴定,BCA法测定蛋白质浓度。
- [0082] 2,制备和提取被免疫的Ba1b/c小鼠中抗血清
- [0083] 将提步骤1制得的NOD小鼠血清中总的IgG蛋白作为抗原与佐剂等体积混合后免疫Ba1b/c小鼠。其包括步骤:
- [0084] 预热免疫佐剂adjuvant到 $40-50^{\circ}\text{C}$,将无菌生理盐水1ml用注射器注入佐剂瓶中,剧烈震荡佐剂瓶2-3分钟以形成乳浊液,倒转瓶震荡1min,使瓶内容物充分利用,免疫前使佐剂预热到 37°C ,并做短暂震荡,使佐剂溶液与抗原溶液以体积比1:1比例混合;
- [0085] 免疫方案为两次基础免疫加一次加强免疫共三次。

[0086] (1) 初次免疫:提取到的 IgG 以 200ug/100ul/ 每只的量腹腔注射雄性 Balb/c mice,共注射 10 只。

[0087] (2) 二次免疫:同初次。

[0088] (3) 加强免疫:提取到的 IgG 以 100ug/100ul/ 每只的量腹腔注射雄性 Balb/c mice,共注射 10 只。

[0089] 提取被 NOD 小鼠血清 IgG 免疫的 Balb/c 小鼠的血清,命名为 NIgG 抗血清。

[0090] 3, NOD 小鼠的治疗试验

[0091] 将 NIgG 抗血清单次大剂量 0.2ml 以尾静脉注射方式给予 6 周龄 NOD 小鼠及同龄的 Balb/c 小鼠,对照组采用 PBS 0.2ml 以同样方式注入 6 周龄 NOD 小鼠及同龄的 Balb/c 小鼠体内,随后连续观察各项指标至小鼠 32 周龄,32 周时将所有小鼠常规处理。

[0092] 4, 效果观察

[0093] NIgG 抗血清注射后,每周监测空腹血糖,血糖监测前一天晚上所有小鼠禁食 12h,当天采用尾部采血方式测定空腹血糖值,观察血糖趋势,根据血糖变化记录每组小鼠每周发病数量,死亡数量,观测至 32 周龄,32 周时常规处理小鼠。

[0094] 5, 观察治疗后 NOD 小鼠的胰岛的变化

[0095] 胰岛组织做石蜡切片,隔 50 μ m 取一张,共 25 张,做 HE 染色,用 Image Measurement 统计软件测量每张切片中的胰岛总面积及胰腺总面积,计算两者比值,乘以间隔距离,即胰岛胰腺的相对体积比。胰岛的炎症浸润面积与胰岛面积的比值计算同上。

[0096] 6, 观察治疗后 NOD 小鼠血清中自身抗体的相对数量变化(免疫组织化学方法)

[0097] (1) Balb/c 小鼠正常的胰腺组织切片热修复后 PBST 洗 3 次各 5min;

[0098] (2) 将切片浸入 3% H_2O_2 中浸泡 15min,以去除内源性过氧化物酶, PBST 洗 3 次各 5min;

[0099] (3) 滴加正常驴血清(5%) 封闭液,室温 40min,甩去多余液体;

[0100] (4) 滴加一抗 50ul:1% 的 NOD 小鼠(32 周龄)血清及对照血清,室温 2h;

[0101] (5) 滴加亲和纯化的驴抗小鼠 IgG(H+L) Fab 片段,室温 2h, PBST 洗 3 次各 5min;

[0102] (6) 1% NIgG 抗血清封闭,室温 2h; PBST 洗 3 次各 5min;

[0103] (7) 滴加二抗 50ul:HRP-donkey anti-mouse IgG(H+L), 37°C 30min;

[0104] (8) PBST 洗 3 次各 5min;

[0105] (9) DAB 显色 5-10min,在显微镜下掌握染色程度, PBST 或自来水冲洗 10min;

[0106] (10) 苏木精复染 2min,盐酸酒精分化,自来水冲洗 10-15min;

[0107] (11) 脱水、透明、封片、镜检。Leica 倒置相差显微镜下对典型视野放大后进行显微摄影;

[0108] (12) 各组胰岛的灰度值用 Image Measurement 统计软件进行统计计算;

[0109] 7, 免疫组织化学染色测定脾脏中分泌自身抗体的 B 细胞的相对数量

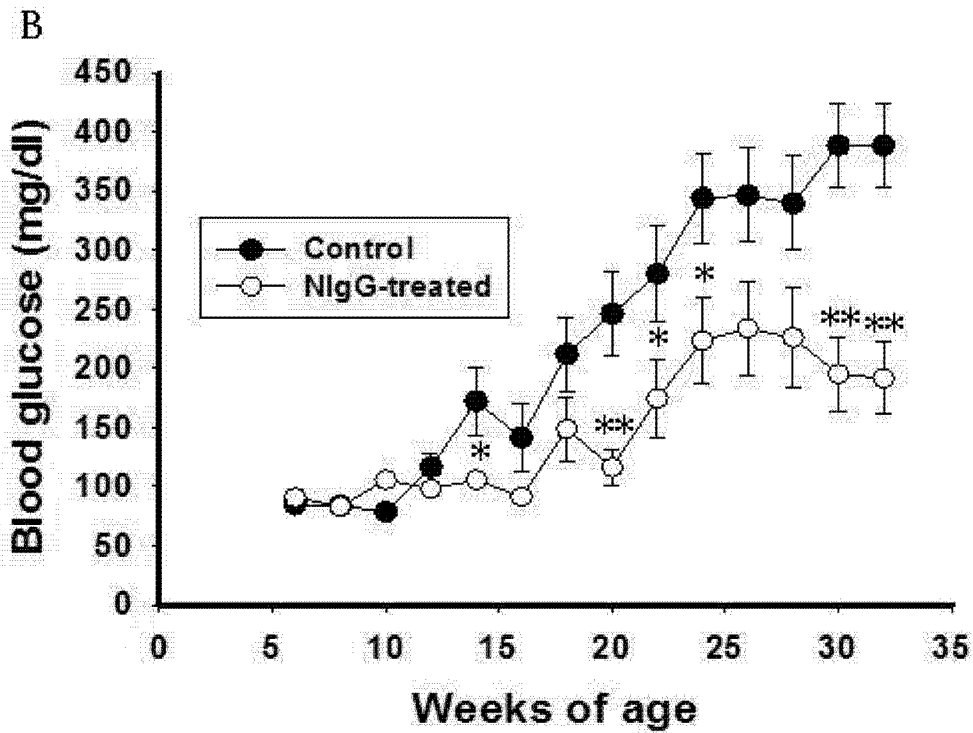
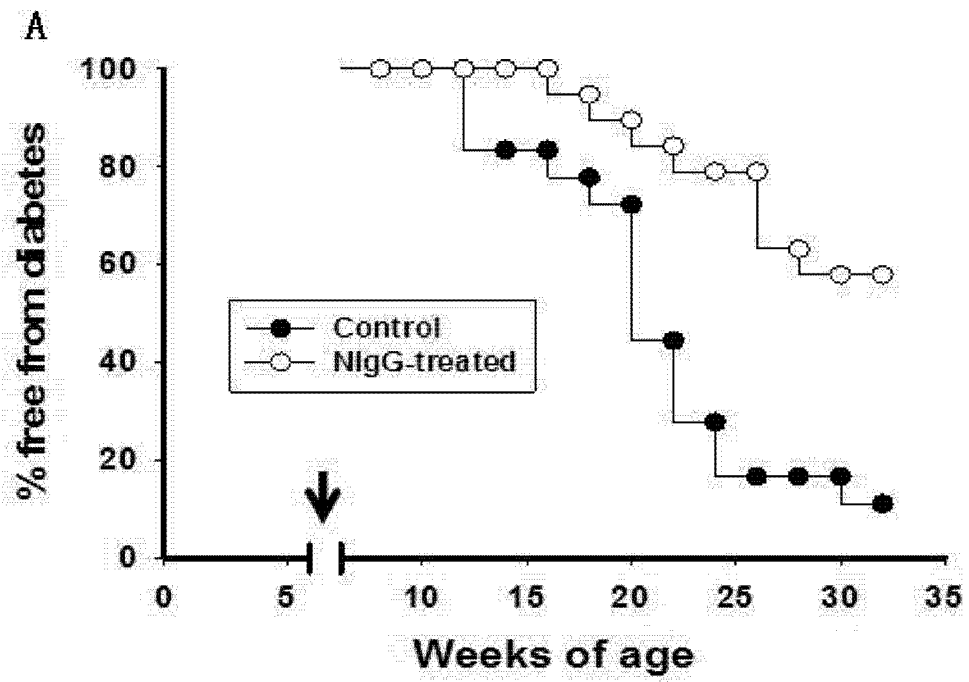
[0110] (检测 NIgG 抗血清治疗 26 周后 NOD 小鼠脾脏中分泌自身抗体的 B 细胞)

[0111] (1) 治疗后 NOD 小鼠脾脏组织切片热修复后 PBST 洗 3 次各 5min;

[0112] (2) 将切片浸入 3% H_2O_2 中浸泡 15min,以去除内源性过氧化物酶, PBST 洗 3 次各 5min;

[0113] (3) 滴加正常驴血清(5%) 封闭液,室温 40min,甩去多余液体;

- [0114] (4) 滴加一抗 50ul :1%的 NIgG 抗血清,室温 2h ;
- [0115] (5) 滴加亲和纯化的驴抗小鼠 IgG(H+L)Fab 片段 (1 : 100),室温 2h,PBST 洗 3 次各 5min ;
- [0116] (6) 滴加二抗 50ul :HRP-donkey anti-mouse IgG(H+L),37°C 30min ;
- [0117] (7)PBST 洗 3 次各 5min ;
- [0118] (8)DAB 显色 5-10min,在显微镜下掌握染色程度,PBST 或自来水冲洗 10min ;
- [0119] (9) 苏木精复染 2min,盐酸酒精分化,自来水冲洗 10-15min ;
- [0120] (10) 脱水、透明、封片、镜检。Leica 倒置相差显微镜下对典型视野放大后进行显微摄影 ;
- [0121] (11) 每张切片随机取 10 个不同的视野,计数分泌自身抗体的 B 细胞数与视野下的总细胞数,计算平均比值
- [0122] 统计学分析:数据以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示,组间差异用单因素方差分析统计。结果显示:
- [0123] (1) 抗血清 NIgG 治疗可明显降低 1 型糖尿病小鼠的血糖,降低其发病率和死亡率。
- [0124] 本发明用 NOD 小鼠提取的血清总 IgG 来免疫 balb/c 小鼠后,再从 Balb/c 小鼠中提取的血清(即为抗血清 NIgG)注射 NOD 小鼠(n = 19),对照组仅用 PBS 注射 NOD 小鼠(n = 18),观察治疗后 26 周内小鼠糖尿病发病情况。结果显示抗血清治疗组小鼠共 19 只,其中糖尿病发病 8 只,死亡 4 只,其发病率为 42.1%,死亡率为 21.1%;对照组小鼠共 18 只,其中发病 16 只,死亡 11 只,其发病率为 88.9%,死亡率为 61.1%。NIgG 抗血清治疗后的小鼠发病率与 PBS 对照组相比明显降低 46.8% ($P < 0.001$),死亡率降低 40% ($P < 0.001$),如图 1A 和 1C 所示;同时,NIgG 抗血清治疗组血糖在 14 周以后明显低于 PBS 对照组,且血糖波动幅度相对平稳,对照组最高血糖平均值达到 388.3mg/dl,比同周龄治疗组的血糖值 191.3mg/dl 高 2.23 倍 ($P < 0.01$),表明抗血清 NIgG 治疗可以明显降低 NOD 小鼠的血糖,如图 1B 所示。
- [0125] (2) 抗血清 NIgG 治疗保护 1 型糖尿病小鼠的胰岛。
- [0126] 与 PBS 对照组相比,抗血清 NIgG 治疗后胰岛的炎症浸润明显减轻,胰岛炎评分也明显好于对照组(如图 2A 和 2B 所示),胰岛胰腺体积比明显增加 ($P = 0.0142$,图 2C),抗血清治疗后与治疗前比较无统计学差异 ($P = 0.6675$)。
- [0127] (3) 抗血清 NIgG 治疗降低 1 型糖尿病小鼠血清中的自身抗体。
- [0128] 血清中自身抗体的检测结果显示,抗血清 NIgG 治疗后与对照组相比,血清中的自身抗体明显降低 (53.65 ± 3.41 vs 69.50 ± 5.33 , $P = 0.0028$),抗血清治疗后与治疗前比较无统计学差异 ($P = 0.3359$),如图 3 所示。
- [0129] (4) 抗血清 NIgG 选择性的杀灭 1 型糖尿病小鼠分泌自身抗体的 B 细胞,而对总 B 细胞无影响。
- [0130] 抗血清 NIgG 治疗后与对照组相比,脾脏中分泌自身抗体的 B 淋巴细胞明显减少 ($8.59 \pm 1.5\%$ vs $18.99 \pm 4.5\%$, $P = 0.0101$),治疗后与治疗前相比,分泌自身抗体的 B 淋巴细胞也降低 ($8.59 \pm 1.5\%$ vs $12.74 \pm 1.39\%$, $P = 0.0302$),如图 4A 所示,脾脏中总 B 细胞占总的脾脏细胞的百分比各组之间没有统计学差异,如图 4B 所示。



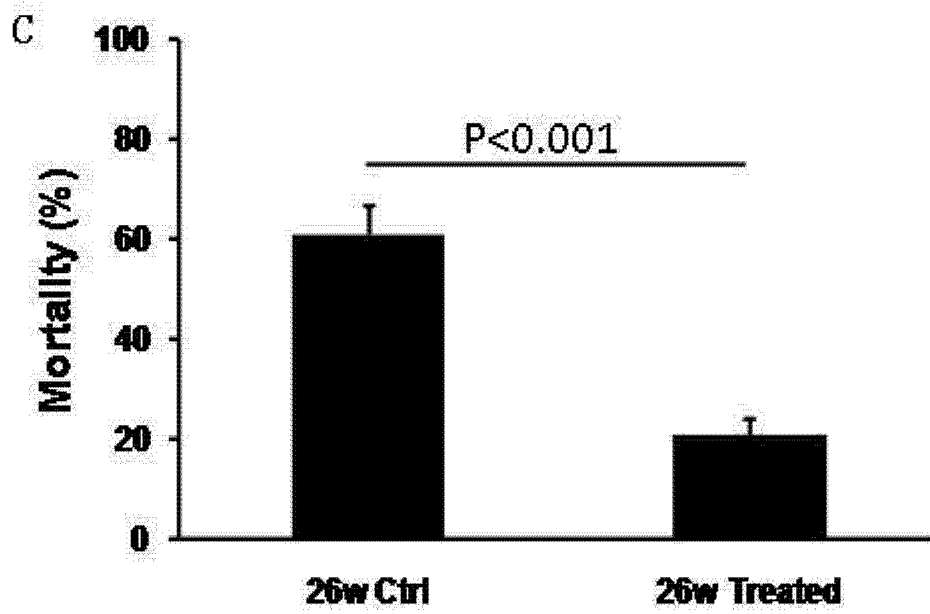
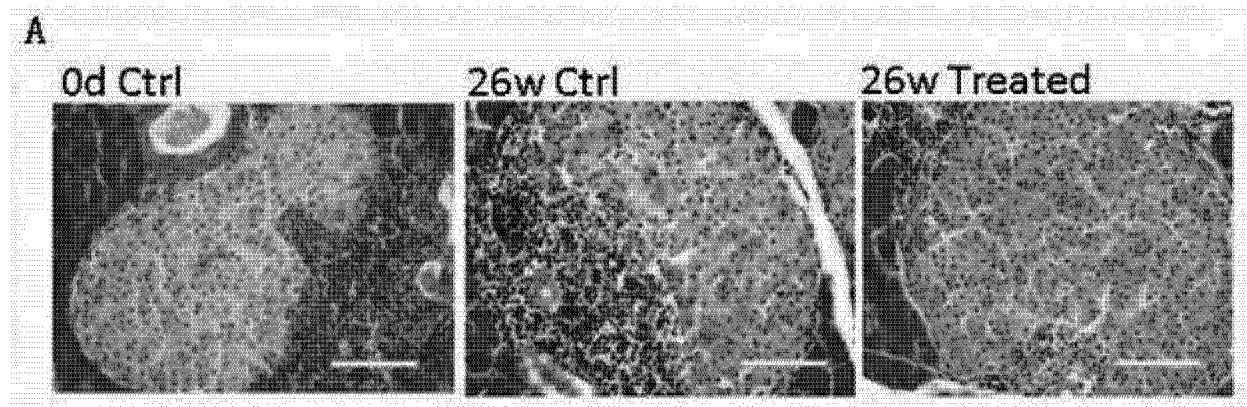


图 1



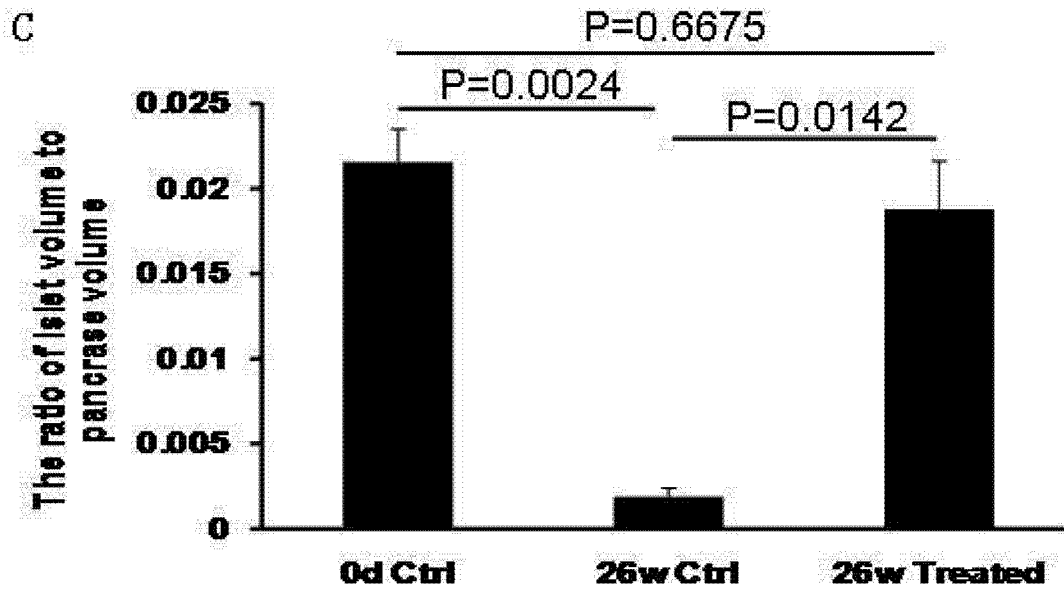
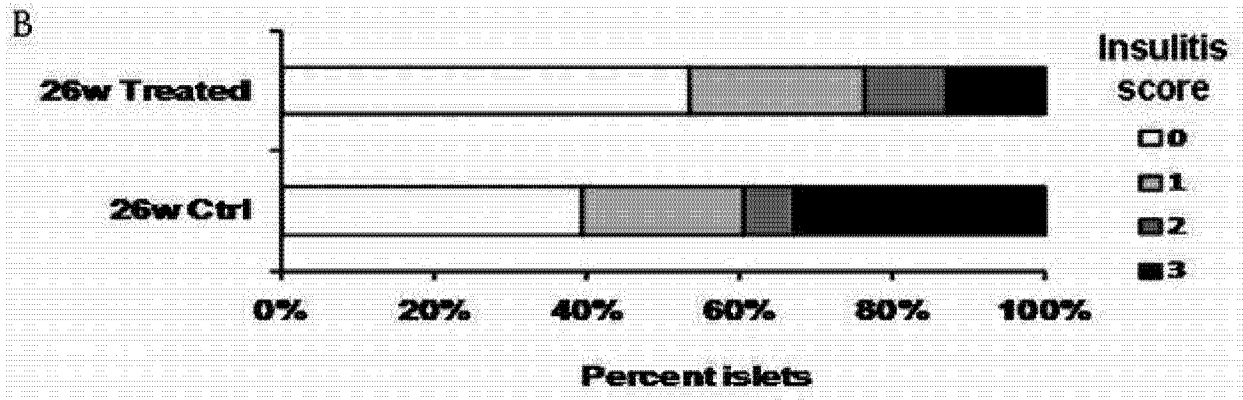


图 2

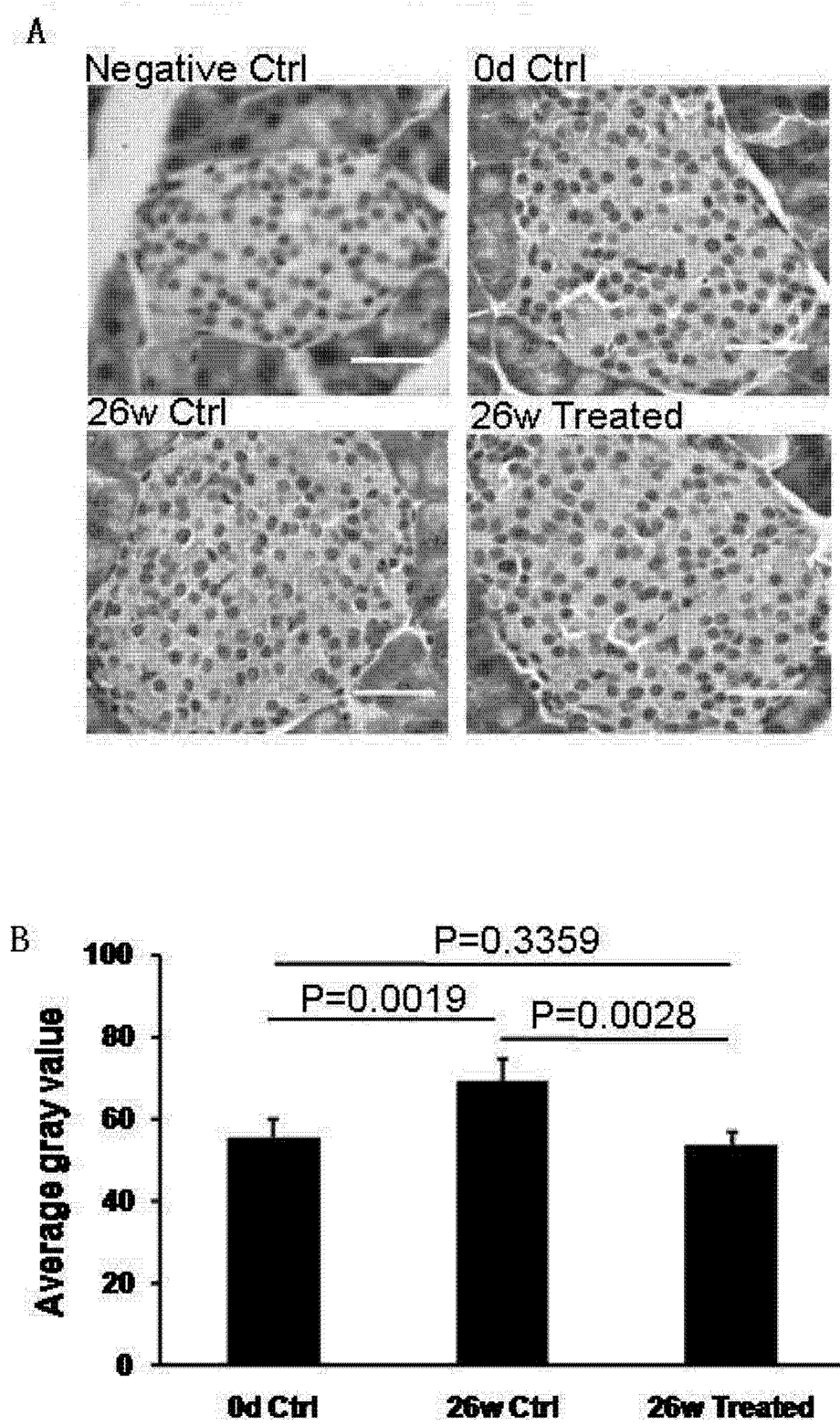
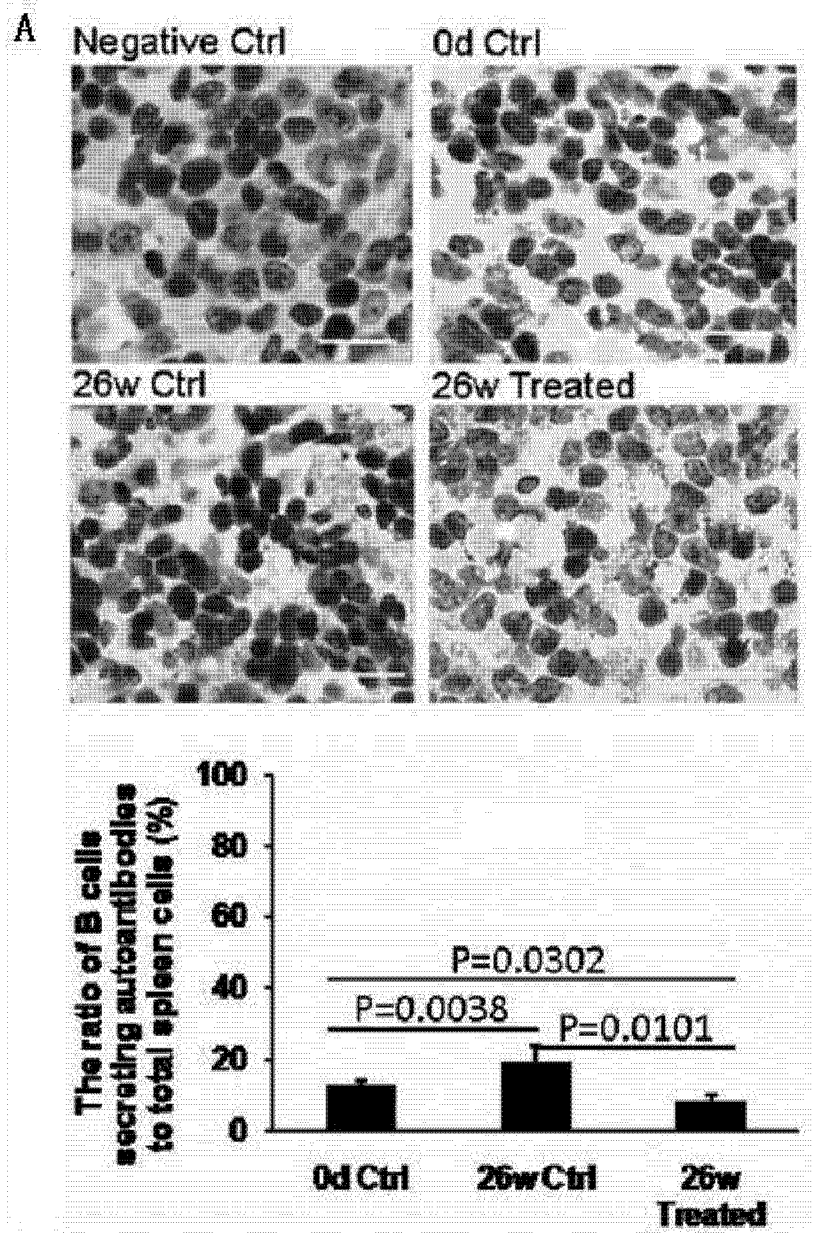


图 3



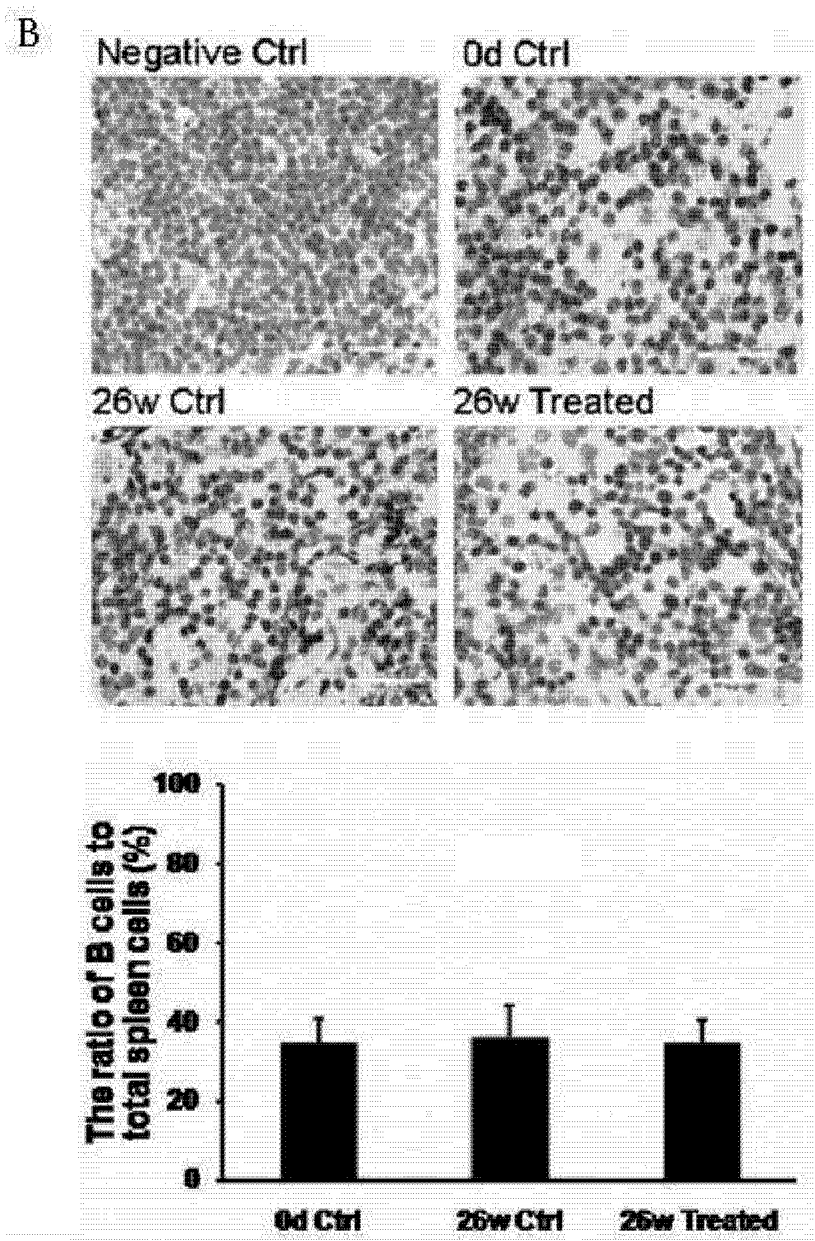


图 4

专利名称(译)	自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN102850457A	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN201110178343.3	申请日	2011-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	陈思锋 栾丽娟 孟丹 陆超 侯彦强		
发明人	陈思锋 栾丽娟 孟丹 陆超 侯彦强		
IPC分类号	C07K16/42 C07K16/06 C12N15/13 A61K39/395 A61P37/02 A61P3/10 G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医学技术领域，涉及自身免疫性疾病抗自身抗体的抗体及其制备方法和应用。包括以自身抗体做为抗原的抗原制备、以自身抗体做为抗原免疫试验对象、获取抗自身抗体的抗体，制得抗总IgG的抗血清命名为NlgG抗血清。通过实验证实所制备的抗自身抗体的抗体可治疗1型糖尿病，可降低血糖，降低1型糖尿病的发病率和死亡率，保护胰岛细胞，有效防治胰岛炎症的发生。本发明为寻找治疗自身免疫性疾病的药物、治疗临床上由于自身免疫性疾病引起的一系列代谢紊乱引起的疾病提供了依据；为临床研究与实践提供了一种针对自身免疫性糖尿病的治疗策略。

