

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102115499 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 06

(21) 申请号 201010576166. X

(22) 申请日 2010. 12. 03

(71) 申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市新城区长乐西路
17 号

(72) 发明人 李柱一 宋琛 徐志凯 徐江
林宏 宿长军 苗建亭 李宏增

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

C12N 15/62 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于治疗重症肌无力的抗体靶向补体调节因子融合蛋白

(57) 摘要

本发明公开了一种抗乙酰胆碱受体单链抗体靶向补体调节因子 CD55 的融合蛋白 scFv-CD55。其目的是通过单链抗体将 CD55 靶向到神经肌接头处抑制致病性乙酰胆碱受体自身抗体与乙酰胆碱受体结合及阻断补体的级联反应,保护乙酰胆碱受体和消除补体系统激活引起的免疫损伤,从而靶向治疗重症肌无力。ScFv-CD55 是通过 (G4S1)₃ 连接肽在补体调节因子 CD55 (SCR1-4) 的氨基端偶联抗乙酰胆碱受体单链抗体得到的融合蛋白。利用基因工程手段通过原核表达及纯化后获得可溶性 scFv-CD55。实验表明,融合蛋白 scFv-CD55 不仅保留了 scFv 的乙酰胆碱受体亲和力以及 CD55 的补体抑制功能,而且在细胞水平的试验中显著提高其补体抑制功能,减少免疫损害部位的补体沉积。此发明开发一种新的治疗重症肌无力的生物制剂,具有广阔的应用前景。

1. 一种乙酰胆碱特异性结合的单链抗体与补体抑制因子 (DAF) 的融合蛋白,其特征在于,应用分子克隆技术通过连接链 (G4S1)₃ 将乙酰胆碱特异性结合的单链抗体与补体抑制因子 (DAF SCR1-4) 在基因水平偶联,构建所得的融合蛋白在原核表达系统中高效表达。

2. 制备权利要求 1 所述的乙酰胆碱受体特异性结合单链抗体与促衰变因子 (DAF SCR1-4) 融合蛋白的方法,按以下步骤制备:

1) scFv-DAF 融合蛋白基因的克隆

以含有抗人 AChR scFv1956# 的质粒 pHEN1 为模板,用引物 1 和 2 在 5' 端加上酶切位点 NdeI,并且在 3' 端引入连接序列:

引物 1(5' 引物,27nt): 5' TTT CATATG CAG GTC CAA TTT GTA GAG 3' ;

引物 2(3' 引物,90nt): 5' ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGCGGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC TGC GGC CCA CCT CCA GAC 3'

对抗人 AChR scFv1956# 进行 PCR 扩增的反应管的配置在冰浴中进行,加入模板、引物、dNTP、水和反应缓冲液后,温和混匀,94℃ 反应 3min 后加入 Primer STAR 酶,轻柔混匀后按照如下 PCR 扩增参数进行反应:94℃,变性反应 1min;56℃ 退火反应 1min;69℃ 延伸反应 1min;上述三步反应进行 28 个循环后于 72℃ 延伸 5min,得到 scFv-linker。

含有 DAF cDNA 的质粒 RD37 (NCBI Accession No. AB026902) 为模版,用引物 3 和 4 在 3' 端加入 BamHI 酶切位点,并在其 5' 端引入连接序列:

引物 3(5' 引物,90nt): 5' GTC TGG AGG TGG GCC GCA GTC CGA TCC GCC ACC GCC AGA GCCACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TGA ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT 3'

引物 4(3' 引物,28nt): 5' TTTT GGA TCC TCT ATG CAC TTG GGT GGT 3'

PCR 反应条件如下:94℃ 反应 3min 后加入 Primer STAR 酶,轻柔混匀后 98℃,变性反应 10sec;68℃ 退火、延伸反应 1min;上述两步反应进行 30 个循环后于 72℃ 延伸 5min,得到 DAF-linker。

上述 PCR 产物 scFv-linker 和 DAF-linker 经过胶回收纯化后,以 1 : 1 的摩尔比混合作为模板用引物 1、4 进行 PCR 扩增,将 scFv1956# 与 DAF 用连接链在基因水平连接。具体反应条件为 94℃ 反应 3min 后加入 Primer STAR 酶,轻柔混匀后 98℃,变性反应 10sec;68℃ 退火、延伸反应 2min;上述两步反应进行 15 个循环后于 72℃ 延伸 5min。所得 PCR 产物用 NdeI 和 BamHI 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳分离,胶回收的目的片段命名为 scFv-DAF。纯化后的融合蛋白片段 scFv-DAF 与 NdeI-BamHI 酶切处理过的质粒载体 pMD18-T simple 连接过夜,连接产物转化 JM109,次日挑取阳性克隆,2×YT 培养过夜,提取质粒 DNA。对酶切鉴定插入大小正确的 scFv-DAF 原核基因克隆载体进行 DNA 测序分析,测序正确者命名 pMD18T-scFv-DAF,其中含有编码特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体与补体调节因子 (DAF) 融合蛋白的基因。

2) 表达载体的构建及融合蛋白的诱导表达

测序正确的 pMD18T-scFv-DAF 经过 NdeI 和 BamHI 消化后,胶回收约 1600bp 的 DNA 片段,与经上述限制性内切酶酶切后的质粒 pET16b 连接,转化感受态 BL21 (DE3) pLyss 细胞。随机挑取的克隆经过 NdeI 和 BamHI 双酶切鉴定,正确克隆接种于 5ml 的 2×YT 中 37℃ 活化 8 小时,随后以 1 : 200 比例接种 2×YT 培养基中 (含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 50 μg/ml 氯霉素),37℃ 继续培养到中对数生长期 OD600 = 0.6 时加入 1mM 的 IPTG,持续诱导 4 小时

后离心 10,000rpm 4℃ 20min 集菌,弃去上清,-40℃冻存菌体备用。

3) 融合蛋白的纯化

用裂菌液 (50mM PBS, 0.5M NaCl, 1mM EDTA, pH 7.5) 重悬菌体,并在冰浴中超声裂菌,离心 13,000rpm 4℃ 20min 后弃上清。用洗涤缓冲液 (20mM PBS, 1% Triton X-100) 重悬、超声、离心处理所得包涵体,用变性缓冲液溶解 (50mM PBS, 6M 盐酸胍, 5mM 咪唑 pH 7.5) 沉淀,并在 37℃ 震摇 2 小时。变性缓冲液平衡螯合了镍离子的 Hitrap chelating HP columns (1ml 柱体积, GE Healthcare), 以 1~2ml/min 流速上样。用 10 倍柱体积的缓冲液 A (100mM 咪唑, 8M 尿素, 20mM PBS, pH 7.5) 去处非特异性结合的杂蛋白。用缓冲液 B (1M 咪唑, 8M 尿素, 20mM PBS, pH 7.5) 洗脱结合的目的蛋白 scFv-DAF。上述实验所用缓冲液过柱前,都用 0.45 μm 滤膜过滤后加入 2mM 的 β-巯基乙醇。按 1ml 每管的量收集洗脱液,以 Bradford 法测定蛋白浓度 (0.1% BSA 为标准品), 合并蛋白峰。

4) 融合蛋白包涵体复性

纯化后的包涵体用优化的阶段透析法重折叠:透析比 1:100 对折叠缓冲液 A (8M 尿素, 20mM Tris 碱) 透析八小时。用折叠缓冲液 A 稀释纯化后包涵体到 1mg/ml 的浓度,并加入 100mM 的 β-巯基乙醇。继续用 1:100 的缓冲液 B (4M 尿素, 20mM 乙醇胺) 透析八小时,换用缓冲液 C (2M 尿素, 20mM 乙醇胺, 250mg 胱氨酸) 继续透析八小时,最后对缓冲液 D (2mM 半胱氨酸, 0.2mM 胱氨酸, 20mM Tris 碱) 透析八小时,其间更换一次缓冲液,上述透析过程均在 4℃ 条件下温和搅拌中进行,最终得到的溶液通过超滤的方法浓缩。以 Bradford 法测定蛋白浓度。

5) 融合蛋白体外的生物学活性检测

检测融合蛋白 scFv-DAF 的乙酰胆碱受体 (AChR) 结合能力及其抑制补体激活的能力分别通过 ELISA 和经典的溶血法来测定。

6) 融合蛋白在细胞水平的补体攻击保护试验

选择人横纹肌肉瘤细胞 TE671 细胞作为靶细胞,其表面提供 AChR 作为融合蛋白 scFv-DAF 的靶向位点。用针对 AChR 的单抗 mAb35 来致敏 TE671 细胞,随后用 200ng/ml 的 DAF 和融合蛋白 scFv195-DAF 与致敏的 TE671 细胞 37℃ 孵育 40 分钟,随后用 PBS 润洗三遍去除未结合的蛋白。用豚鼠血清作为补体来源攻击致敏及重组蛋白孵育后的 TE671 细胞,随后用 4% 多聚甲醛固定,伊文氏蓝 (衬染细胞) 稀释的 FITC-C3 抗体染色 4℃ 过夜,次日用荧光显微镜观察细胞表面的 C3 沉积形态和数量的变化来比较 DAF 和 scFv-DAF 的保护力。

3. 权利要求 2 所述的乙酰胆碱受体特异性结合单链抗体与促衰变因子 (DAF SCR1-4) 融合蛋白的制备方法,其特征在于,所述含有编码特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体通过连接序列与补体调节因子 (DAF) 融合基因的克隆载体 pMD18T-scFv-DAF,表达载体 pET16b-scFv-DAF 及其表达宿主大肠杆菌细胞 BL21 (DE3) pLyss。

4. 权利要求 2 所述的乙酰胆碱受体特异性结合单链抗体与促衰变因子 (DAF SCR1-4) 融合蛋白的制备方法,其特征在于所述 PCR 的引物序列、反应条件及其步骤。

5. 权利要求 2 所述的乙酰胆碱受体特异性结合单链抗体与促衰变因子 (DAF SCR1-4) 融合蛋白的制备方法,其特征在于优化的阶段透析法重折叠融合蛋白。

6. 权利要求 2 所述的乙酰胆碱受体特异性结合单链抗体与促衰变因子 (DAF SCR1-4) 融合蛋白的制备方法,其特征在于所述 TE671 细胞作为补体攻击保护试验的靶细胞的补体

攻击保护试验步骤。

用于治疗重症肌无力的抗体靶向补体调节因子融合蛋白

1. 技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体涉及基因克隆、外源基因在原核系统的中的表达、蛋白纯化、包涵体复性、乙酰胆碱受体特异性单链抗体与补体调节因子(DAF)融合蛋白(scFv-DAF)的体外活性测定及其细胞水平的补体攻击保护试验。目的在于研制开发一种新的治疗重症肌无力的生物制剂 scFv-DAF,可以通过抑制重症肌无力患者体内的病理性致病因子-乙酰胆碱受体自身抗体与乙酰胆碱受体结合及补体系统的激活,保护乙酰胆碱受体和消除补体系统激活引起的免疫损伤从而治疗重症肌无力。具有重要应用前景和意义。

2. 背景技术

[0002] 重症肌无力(MG)是一种严重危害患者身心健康的最典型的自身免疫性疾病之一,它有明确的抗原、抗体及病理作用靶点-神经肌肉接头(NMJ),是研究其它自身免疫性疾病发病机制和治疗的最理想的模型之一。虽然,目前重症肌无力患者的治疗采用胆碱酯酶抑制剂、免疫调节或抑制剂及胸腺摘除等,但疗效均不理想。以往重症肌无力的治疗研究多集中于患者体内的病理性致病因子-乙酰胆碱受体抗体,T细胞、免疫疫苗、炎性细胞因子、B细胞等,而在重症肌无力发病过程中起重要作用的补体/补体调节因子的作用则没有引起足够重视。重症肌无力患者和重症肌无力动物模型体内的病理性致病因子-乙酰胆碱受体抗体和神经肌肉接头处的乙酰胆碱受体结合,激活大量的补体并沉积于神经肌肉接头处溶解、破坏突触后膜和乙酰胆碱受体,致神经肌肉接头处传递障碍,出现肌肉收缩无力。目前,大量资料表明补体系统激活引起的神经肌肉接头免疫损伤,在重症肌无力发病过程中起非常重要的作用。

[0003] 单链抗体(scFv)是由抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)经连接链连接而成。单链抗体是具有亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能结构单位,因其相对分子质量小、穿透力强、免疫原性低而备受关注。乙酰胆碱受体单链抗体具有以下特点:(1)结构上是由抗体重链可变区(VH)-连接链(G_4S_1)₃-轻链可变区(VL)构成,是没有Fc段的单价抗体,其大小是抗体全长的六分之一;(2)乙酰胆碱受体单链抗体只有1个抗原结合位价,只能与乙酰胆碱受体上两个 α -亚单位中的一个主要免疫原区结合,不会引起乙酰胆碱受体分子之间的交联导致的抗原调变;(3)此外,乙酰胆碱受体单链抗体没有Fc段,所以不能激活补体,从而避免了补体系统激活而引起的免疫损伤;(4)乙酰胆碱受体单链抗体能够特异性的与乙酰胆碱受体结合,封闭、阻断重症肌无力患者体内致病因子-乙酰胆碱受体抗体与乙酰胆碱受体结合,一方面保护乙酰胆碱受体免受重症肌无力患者体内致病性乙酰胆碱受体抗体的攻击,另一方面,这一特性使得单链抗体成为理想的靶向工具;

[0004] 补体系统的激活为一种级联反应,但受到多种调节分子的严格控制,其反应的程度和单一成分的反应都是在生物反馈控制下而进行的,从而限制了活化的扩大化,以维持补体水平的平衡。由于补体调节系统的失衡与炎症、肿瘤、自身免疫疾病、异种器官移植、缺血再灌注损伤及年龄相关性的关节炎,早发性痴呆、骨质疏松症等诸多的病理生理过程相

关,因此补体调节因子被广泛的用于上述领域。补体调节蛋白可以分为可溶性和膜表面补体调节蛋白两大类,其中膜补体调节蛋白是一类能够抑制补体激活的膜分子。人类的膜补体调节蛋白包括 CD55 (DAF 促衰变因子)、CD59、CD46 (MCP 膜表面协同因子蛋白)、CD35 (CR1 补体受体 1)。补体调节因子的功能是调节 / 抑制补体系统的激活,广泛分布于哺乳动物组织细胞膜表面保护宿主组织细胞免受补体系统激活引起的免疫损伤。DAF 为通过磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定于细胞膜表面的糖蛋白,分子量约为 70kD。DAF 由补体调节区和锚定区组成,根据功能区的氨基酸序列可以把功能区分为四个短的重序列 (SCR1-4),锚定区含有较多的丝氨酸 / 苏氨酸 (S/T) 并且高度糖基化,羧基末端的 GPI 将 DAF 锚定在细胞膜脂质双层结构的外层。补体调节因子 DAF 可以抑制补体激活的经典和旁路通路。DAF 作用于补体 C3 和 C5 转化酶,可同 C2 竞争与 C4b 结合,从而抑制 C3 转化酶合成,并促进其分解;加速旁补体激活通路中的 C3 转化酶 (C3bBb) 中 Bb 的解离。补体系统的激活起始于抗体与膜表面抗原结合,形成膜攻击复合物 (MAC),引起组织细胞损伤。正常机体组织内补体 / 补体调节因子处于平衡状态,补体并不能引起组织细胞损伤。当机体长期处于异常免疫应答或严重免疫反应或在某些疾病状态下,两者之间失去了动态平衡,补体系统被激活并沉积于相应组织细胞表面引起免疫损伤。补体调节因子与抗体介导并有补体参与的许多自身免疫性疾病的发病过程密切相关,最有代表性的是阵发性夜间血红蛋白尿 (PNH),患者的造血细胞补体调节分子的膜锚定分子编码基因 PIG-A 异常,导致细胞表面的补体调节分子锚定异常,导致全血细胞降低,较易观察到的是红细胞溶血导致的血红蛋白尿。在重症肌无力发病过程中大量的补体被激活并沉积于神经肌接头处,引起神经肌接头病理损害,出现肌无力症状。疾病模型进一步证明敲除 DAF 基因的大鼠更易于受到抗乙酰胆碱受体抗体攻击而发生肌无力症状。我们以往的研究表明,补体调节因子 DAF 集中分布于小鼠神经肌接头突触后膜。激光共聚焦显微镜进一步证实 DAF 和乙酰胆碱受体共存于小鼠神经肌接头突触后膜。另外,我们用实时定量 RT-PCR 检测 DAF,发现在重症肌无力动物模型眼外肌 DAF 基因表达明显减少。综上所述,神经肌接头处的补体调节因子 DAF 是定点靶向治疗重症肌无力的重要环节之一。因此,若将乙酰胆碱受体单链抗体与补体调节因子 DAF 偶联,形成复合体,将其靶向引导到重症肌无力患者或者动物模型神经肌接头处,则有可能保护乙酰胆碱受体,同时有效抑制补体系统的激活,阻断补体系统激活引起的免疫损伤。

3. 发明内容

[0005] 综上所述,本发明的目的在于,提供能够特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体与补体调节因子 (DAF) 融合蛋白及其制备方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体与补体调节因子 (DAF) 融合蛋白是通过在基因水平用 $(G_4S_1)_3$ 在补体调节因子 DAF 的氨基端连接抗乙酰胆碱受体单链抗体 scFv 得到的融合基因克隆到原核表达载体 pET16b 中用原核系统表达融合蛋白并对所得到的蛋白产物进一步纯化,通过包涵体复性得到可溶的具有生物学活性的蛋白并在体外检测其各组分功能。

[0007] 本发明提供了一种能够特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体靶向补体抑制因子 scFv-DAF。此融合蛋白是以重症肌无力自身抗体的攻击目标 AChR 作为靶点,用针对 AChR 的单链抗体作为“载体”而促衰变因子 DAF 作为效应分子的特异性针对重症肌无力补体激

活位点的靶向补体抑制因子。这种融合蛋白不仅具有特定疾病病理性补体激活部位的靶向作用,还可以对局部的补体攻击具有保护作用。一方面可以达到抑制补体激活的治疗补体相关疾病的作用;另一方面,由于 scFv “导向弹头”的作用,可以显著减少用药剂量,避免全身性补体抑制的副作用。试验结果表明,scFv-DAF 保留了其两个不同组分各自的功能,并且可以特异性与 TE671 细胞表面的靶点 AChR 相结合,减少细胞表面免疫沉淀的数量和程度。因此可以作为一种新型的用于重症肌无力的基因工程靶向蛋白药物。本发明将在医药学领域具有重要应用前景和意义。

4. 附图说明

[0008] 图 1 基因水平偶联 scFv 和 DAF 后的双酶切鉴定 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果

[0009] 图 2 乙酰胆碱受体靶向融合蛋白 scFv-DAF 表达纯化重折叠的 12% SDS-PAGE 电泳检测结果

[0010] 图 3 乙酰胆碱受体靶向补体调节因子融合蛋白 scFv-DAF 的 Western Blot 鉴定结果

[0011] 图 4ELISA 法比较 scFvs 和 scFv-DAF 对 AChR α -ECD₁₋₂₁₀ 亲和力结果

[0012] 图 5 补体介导的红细胞溶血试验结果

[0013] 图 6TE671 细胞的补体攻击保护实验结果

5. 具体实施方式

[0014] 具体来讲,制备上述特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体与补体调节因子 (DAF) 融合蛋白 (scFv-DAF) 可以按照如下步骤:

[0015] 1. scFv-DAF 基因的克隆

[0016] 分别以含有抗人 AChR scFv1956# 的质粒 pHEN1 和含有 DAF cDNA 的质粒 RD37 (NCBI AccessionNo. AB026902) 为模版,分别以引物 1、2 和引物 3、4 为上下游引物,采用 Primer STAR™ HS DNA 聚合酶扩增 scFv1956# 的结构基因和 DAF 的 SCR1-4 片段。引物 2、3 分别在 scFv1956# 的羧基端和 DAF SCR1-4 的氨基端添加了一段连接序列 (G₄S₁)₃,引物 1、4 分别添加了两个酶切位点 NdeI 和 BamHI。

[0017] 引物 1(scFv5' 引物):下划线部分是所加的 NdeI 酶切位点。

[0018] 5' TTTCATATGCAGGTCCA ATTTGTAGAG3';

[0019] 引物 2(连接链 3' 引物):单下划线是 scFv195 编码序列的一部分(保留的 c-myc 标签),双下划线是 DAF 结构基因一部分,中间未划线为按照大肠杆菌 (E coli.) 密码子偏好性优化后的连接序列

[0020] 5' ATCTCAGAAGAGGATCTGAATTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GACTGCGGCCACCTCCAGAC 3'

[0021] 引物 3(连接链 5' 引物):同引物 2

[0022] 5' GTCTGGAGGTGGGCCGAGTCCGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTGAATTCAGATCCTCTTCTGAGAT3'

[0023] 引物 4(DAF3' 引物):下划线部分是在 DAF 编码序列之后的 BamHI 酶切位点。

[0024] 5' TTTTGGATCCTCTATGCACTTGG GTGGT3'

[0025] PCR 产物 scFv-linker 和 DAF-linker 经过胶回收纯化后,以 1 : 1 的摩尔比混合作为模板用引物 1、4 进行 PCR 扩增。所得 PCR 产物用 NdeI 和 BamHI 双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳分离,胶回收的目的片段命名为 scFv-DAF。纯化后的融合蛋白片段 scFv-DAF 与 NdeI 和 BamHI 双酶切处理过的质粒载体 pMD18-Tsimple 连接过夜,连接产物转化 Inoue 法制备的感受态大肠杆菌 JM109,次日挑取阳性克隆,2×YT 培养 12 小时后提取质粒 DNA, NdeI 和 BamHI 双酶切可得到大小约为 1600bp 的 DNA 片段。对酶切鉴定插入大小正确的 scFv-DAF 原核基因克隆载体进行 DNA 测序分析,测序正确者命名 pMD18T-scFv-DAF,其中含有编码特异性结合乙酰胆碱受体的单链抗体与补体调节因子 (DAF) 融合蛋白的基因。

[0026] 2. 表达载体的构建及融合蛋白的诱导表达

[0027] 测序正确的 pMD18T-scFv-DAF 经过 NdeI 和 BamHI 双酶切后胶回收大小约为 1600bp 的 DNA 片段,与经上述限制性内切酶酶切后的表达载体 pET16b 连接,转化 Inoue 法制备的感受态 BL21 (DE3)pLyss 细胞。随机挑取的克隆经过 NdeI 和 BamHI 双酶切鉴定后,冻存鉴定正确克隆的大肠杆菌,并接种于 5ml 的 2×YT 中 37℃活化 8 小时,随后以 1 : 200 比例接种 2×YT 培养基中 (含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 50 μg/ml 氯霉素),37℃继续培养到中对数生长期 OD₆₀₀ = 0.6 时加入 1mM 的 IPTG,持续诱导 4 小时后用 BeckmarJA-14 离心 10,000rpm 4℃ 20min 集菌,弃去上清,-40℃冻存菌体备用。

[0028] 3. 融合蛋白的纯化及包涵体复性

[0029] 将冻存的菌体用裂菌液 (50mM PBS,0.5M NaCl,1mM EDTA, pH 7.5) 重悬,含有 plyss 的菌体冻融后破裂,释放出大量基因组 DNA 和没有裂解完全的菌体在冰浴中超声打碎,Beckman JA-20 离心 13,000rpm 4℃ 20min 后弃去上清,得到包涵体。用洗涤缓冲液 (20mM PBS,1% Triton X-100) 重悬、超声、离心处理所得包涵体,最后一次离心的沉淀用变性缓冲液溶解 (50mMPBS,6M 盐酸胍,5mM 咪唑 pH7.5),并在 37℃摇床中震荡 2 小时保证其充分溶解。将包涵体裂解液用 0.45 μm 滤膜过滤准备上柱。用变性缓冲液平衡螯合了镍离子的 Hitrap chelating HP columns (1ml 柱体积,GE Healthcare),以 1 ~ 2ml/min 流速上样。用 10 倍柱体积的缓冲液 A (100mM 咪唑,8M 尿素,20mM PBS,pH 7.5) 去处非特异性结合的杂蛋白。用缓冲液 B (1M 咪唑,8M 尿素,20mM PBS,pH7.5) 洗脱结合的目的蛋白 scFv-DAF。上述实验所用缓冲液过柱前,都用 0.45 μm 滤膜过滤后加入 2mM 的 β-巯基乙醇。按照 1ml 每管的量收集洗脱液,以 Bradford 法测定蛋白浓度 (0.1% BSA 为标准品),合并蛋白峰。

[0030] 纯化后的包涵体用优化的阶段透析法重折叠,具体步骤如下:纯化后的包涵体以透析比 1 : 100 对折叠缓冲液 A (8M 尿素,20mM Tris 碱) 透析八小时,每四小时换一次缓冲液。随后用折叠缓冲液 A 稀释纯化后包涵体到 1mg/ml 的浓度,并加入 100mM 的 β-巯基乙醇以保证复性前的融合蛋白都被还原成单体状态。继续用 1 : 100 的缓冲液 B (4M 尿素,20mM 乙醇胺) 透析八小时,换用缓冲液 C (2M 尿素,20mM 乙醇胺,250ng 胱氨酸) 继续透析八小时,最后对缓冲液 D (2mM 半胱氨酸,0.2mM 胱氨酸,20mM Tris 碱) 透析八小时,其间更换一次缓冲液,上述透析过程均在 4℃ 条件下温和搅拌中进行,最终得到的溶液通过超滤的方法浓缩。以 Bradford 法测定蛋白浓度,分装后 -20℃冻存。

[0031] 4. 融合蛋白在体外的生物学活性检测

[0032] 检测融合蛋白 scFv-DAF 的乙酰胆碱受体 (AChR) 结合能力及其抑制补体激活的能力通过如下试验证实:重组表达的 AChR α 亚单位胞外域 (α-ECD₁₋₂₁₀) 含有主要免疫

原区 (MIR), 是大多数自身抗体的攻击位点。我们用 ELISA 的方法比较融合蛋白 scFv-DAF 和 scFvs 对 AChR α -ECD₁₋₂₁₀ 的亲和力。用 ELISA 包被缓冲液将 AChR α -ECD₁₋₂₁₀ 稀释到 2 μ g/ml, 包被 ELISA 板 (100 μ l/孔) 4℃ 过夜; 洗板后用 1% 的 BSA 分别稀释重组表达的 scFv1929#、scFv1956# 和融合蛋白 scFv-DAF (100 μ l/孔) 37℃ 孵育一小时; 洗板后加入用 1% 的 BSA 稀释的抗 c-myc 标签的单克隆抗体 mAb9E10 (1 : 5000) 37℃ 孵育一小时; 洗板后加入 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (1 : 8000 稀释) 37℃ 孵育一小时; 最后洗板后加入底物液 OPD 显色, 20 分钟后加入 2M 硫酸终止显色并用多功能酶标仪测定 A₄₉₅。

[0033] 用溶血法测定融合蛋白 scFv-DAF 对补体抑制的活性, 用明胶巴比妥缓冲液 (GVB) 将绵羊红细胞洗两遍后重悬, 并加入兔抗绵羊红细胞的多抗, 轻柔混匀后 37℃ 孵育 1 小时, 2000rpm 离心 5 分钟吸弃上清, 而后用 GVB 洗两遍重悬, 得到致敏的绵羊红细胞作为靶细胞。用 GVB 将抗体致敏的绵羊红细胞和豚鼠血清分别稀释到 3.75% 和 3%, 分别取 25 μ l 加入 96 孔板中, 随后加入 GVB 稀释的 DAF 和重组融合蛋白 scFv-DAF, 分别加入 EDTA 和 GVB 作为阳性对照和阴性对照 (100 μ l/孔) 轻柔混匀后 37℃ 孵育 1 小时。反应结束后, 500rpm 4℃ 离心 15 分钟, 取上清到一新 96 孔板中, 其中的血红素可以用多功能酶标仪检测 A₄₁₀ 数值定量。溶血抑制按照公式 $I = (A_s - A_n) / (A_p - A_n)$ 计算 (A_s 为加 scFv-DAF 孔的 A₄₁₀、 A_n 、 A_p 分别为阳性对照和阴性对照的 A₄₁₀)

[0034] 5. 融合蛋白在细胞水平的补体攻击保护试验

[0035] 为了证实融合蛋白 scFv-DAF 能够在结合 AChR 时不影响其补体抑制功能的发挥, 我们选择人横纹肌肉瘤细胞 TE671 细胞作为靶细胞, 其表面提供 AChR 作为融合蛋白 scFv-DAF 的靶向位点。用针对 AChR 的单抗 mAb35 来致敏 TE671 细胞 (mAb35 提前用 56℃ 孵育 30 分钟灭活补体), 随后用 200ng/ml 的 DAF 和融合蛋白 scFv195-DAF 与致敏的 TE671 细胞 37℃ 孵育 40 分钟, 随后用 PBS 润洗三遍去除未结合的蛋白。用豚鼠血清作为补体来源攻击致敏及重组蛋白孵育后的 TE671 细胞 (豚鼠血清先与 TE671 在冰上共孵育 30 分钟去除抗体防止非特异性补体激活), 随后用 4% 多聚甲醛固定, 伊文氏蓝 (用于衬染细胞) 稀释的 FITC-C3 抗体染色 4℃ 过夜, 次日用荧光显微镜观察细胞表面的 C3 沉积形态和数量的变化。比较 DAF 和 scFv-DAF 的保护力

[0036] 申请人选用了能特异性与 AChR 相结合的最小抗体结构 scFv, 应用基因重组的方法, 用连接序列 (G₄S₁)₃ 将 DAF (SCR1-4) 与 scFv 的羧基端融合, 并在大肠杆菌中获得表达。应用优化的阶段透析法重折叠正确构建和表达的包涵体融合蛋白, 建立了经济实用的表达、纯化及包涵体复性工艺。在体外功能检测中, 融合蛋白不仅保留了其两个组分的功能, 尽管还没有证据证实 scFv-DAF 能够浓聚到神经肌接头的 AChR 并发挥补体抑制因子的功能, 但我们是实验表明 scFv-DAF 能够特异性与 TE671 细胞表面的 AChR 相结合保护其免受补体攻击。具体实验方案及结果如前所述。

[0037] 经上述实验证明, 本发明的效果如下:

[0038] 1) 用 PCR 的方法成功的将 DAF (SCR1-4) 的编码核苷酸片段通过连接序列 (G₄S₁)₃ 与 scFv 的 3' 端连接, 并改造了 scFv5' 和 DAF3' 端的酶切位点, 构建了 scFv-DAF 融合基因的克隆载体 pMD18T-scFv-DAF, 双酶切鉴定及测序结果证实 DNA 序列完全正确。

[0039] 2) 构建了 scFv-DAF 融合基因的原核表达载体 pET16b-scFv-DAF, 诱导表达后在大肠杆菌的包涵体中获得表达, 纯化后的融合蛋白经 Western-Blot 证实, 该融合蛋白能特异

性结合 DAF 的单克隆抗体,并能与 scFv 上的 c-myc 标签的单抗结合。

[0040] 3) 用优化的阶段透析法重折叠纯化后的包涵体, SDS-PAGE 凝胶电泳检测其纯度和和折叠效率,最后融合蛋白的回收率为 1.24%。

[0041] 4) 体外活性试验显示 scFv-DAF 融合蛋白不仅能够保留 scFv 与 AChR 特异性结合能力,在溶血试验中具有抑制补体激活的功能。在 TE671 细胞的补体攻击保护试验中,进一步证实了 scFv-DAF 能与 TE671 表面的 AChR 特异性结合,与未靶向的 DAF 相比,补体沉积的范围和程度都得到了有效地控制。实验表明 scFv-DAF 中 scFv 能将 DAF 靶向到 AChR 表面,并保护 TE671 细胞免受补体攻击。

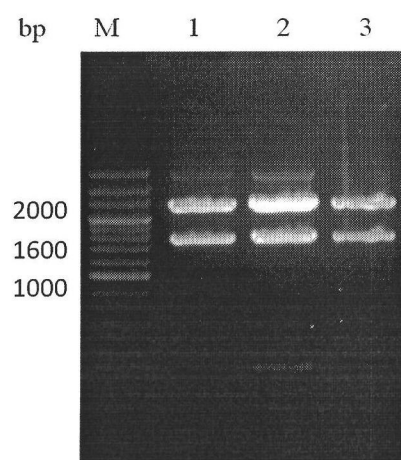


图 1

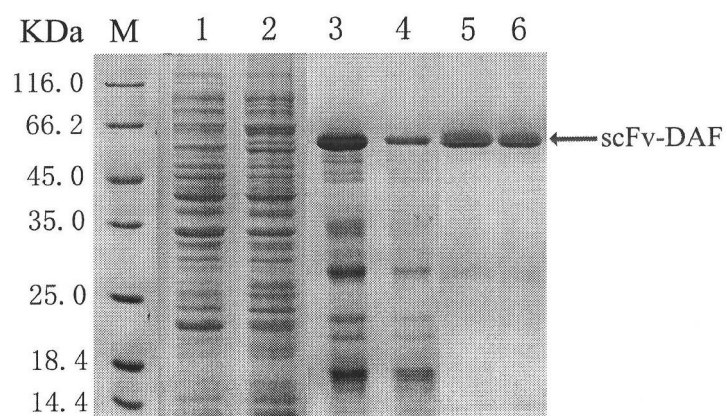


图 2

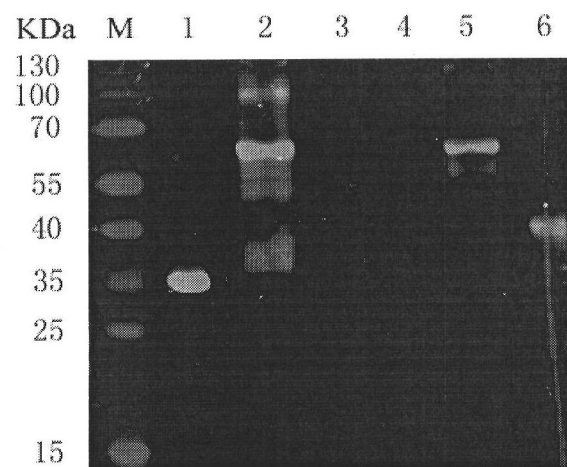


图 3

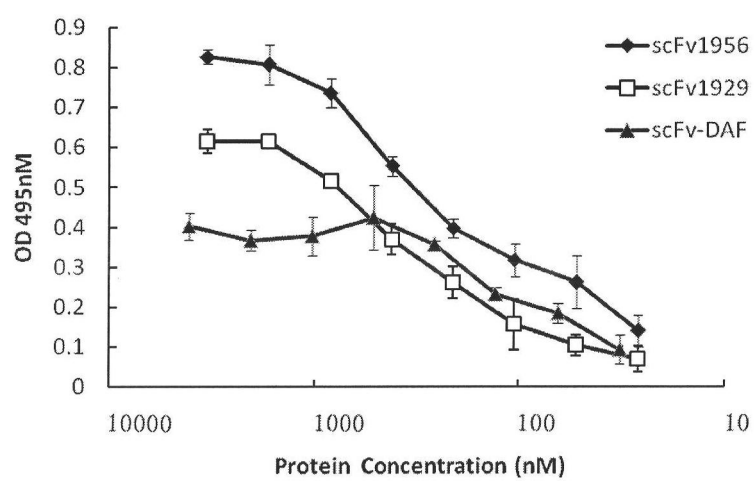


图 4

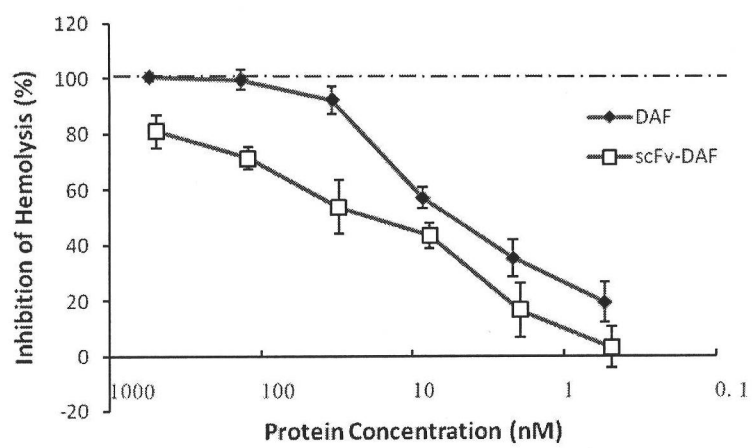


图 5

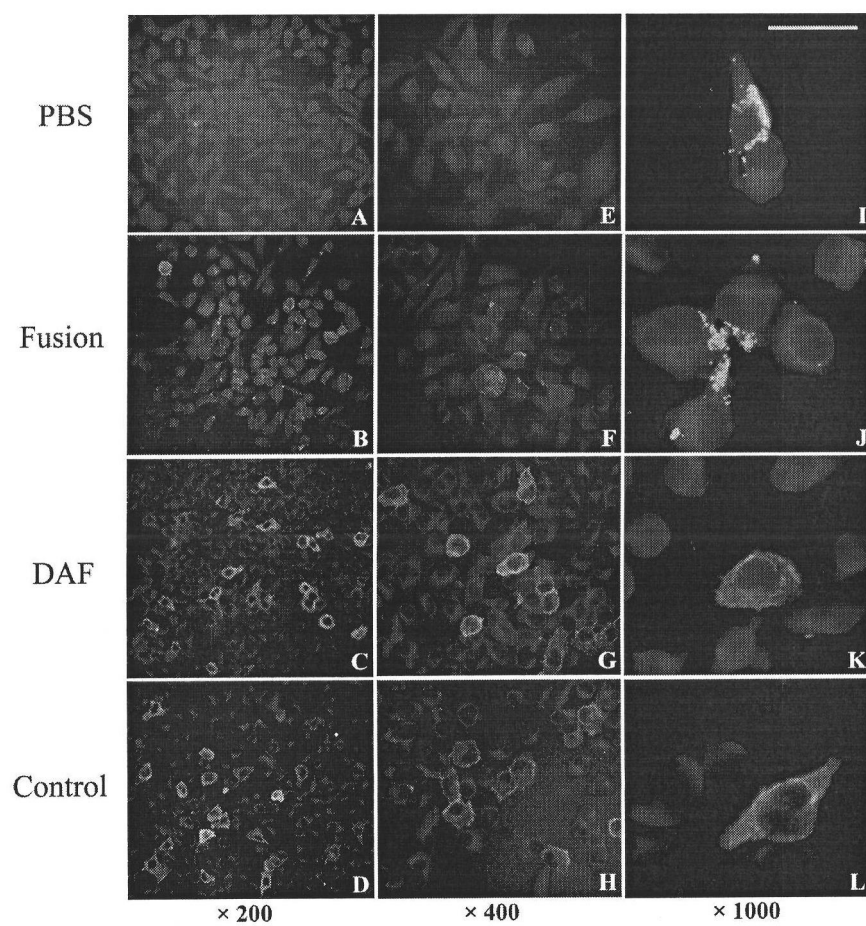


图 6