

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

- 中国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊

- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 中国药学会系列期刊

本期导读：

罗沙司他的合成研究进展

张其伟，周嘉第，陈永健，李坚军

非甾体抗炎药上市外用剂型概况及新载体研究进展

林国领，罗华菲



微信号 : cjph-cjph



主 办
上海医药工业研究院
中国药学会
中国化学制药工业协会

11

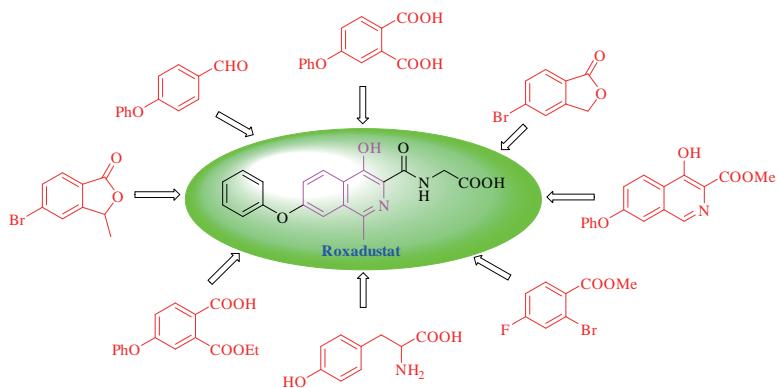
2019年11月

第50卷

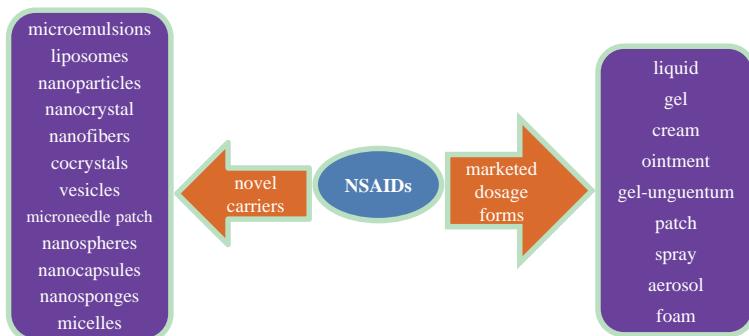
Vol. 50 No. 11

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

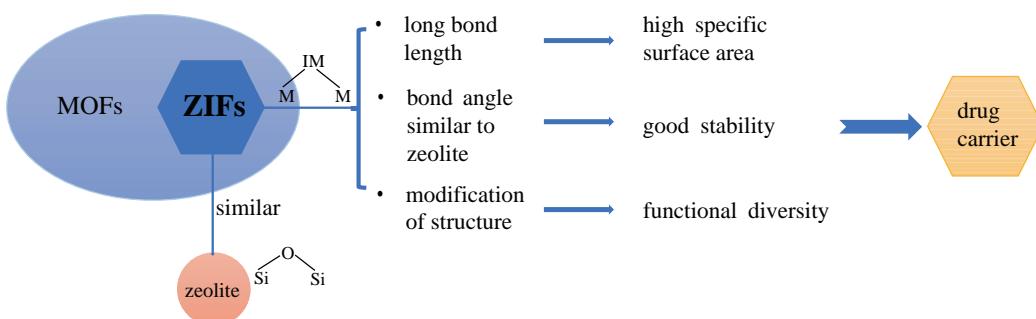
- 1237 罗沙司他的合成研究进展·····张其伟, 周嘉第, 陈永健, 李坚军*
Progress in the Synthesis of Roxadustat·····ZHANG Q W, ZHOU J D, CHEN Y J, LI J J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.001

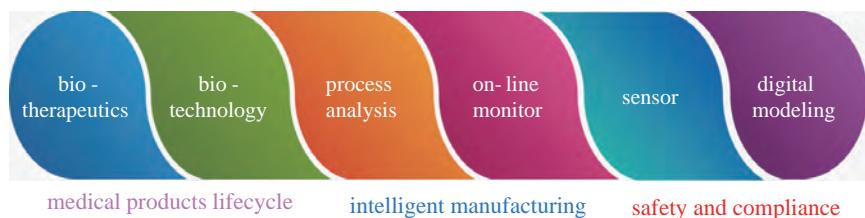


- 1246** 非甾体抗炎药上市外用剂型概况及新载体研究进展.....林国钡, 罗华菲*
Progress of Approval Topical Dosage Forms of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and
Their Novel Carriers.....*LIN G B, LUO H F**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.002



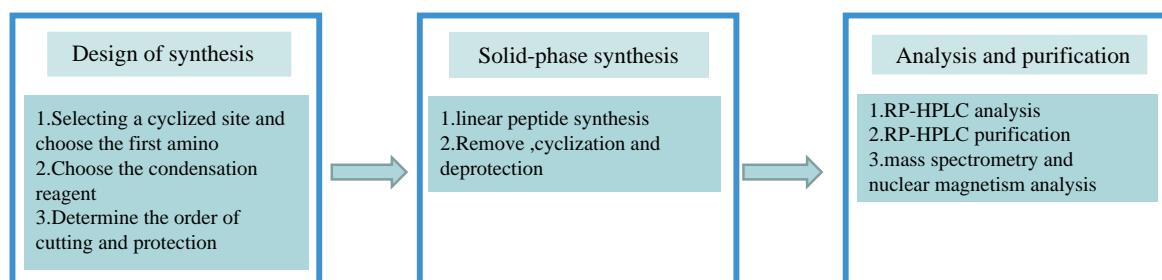
- 1256 类沸石咪唑酯骨架(ZIFs)及其复合物在药物递送系统中的应用.....赵悦竹, 张薇薇, 付庆辉, 杨亚妮, 何军*
Application of Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIFs) and Their Complexes in Drug Delivery Systems.....ZHAO Y Z, ZHANG W W, FU Q H, YANG Y N, HE J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.003





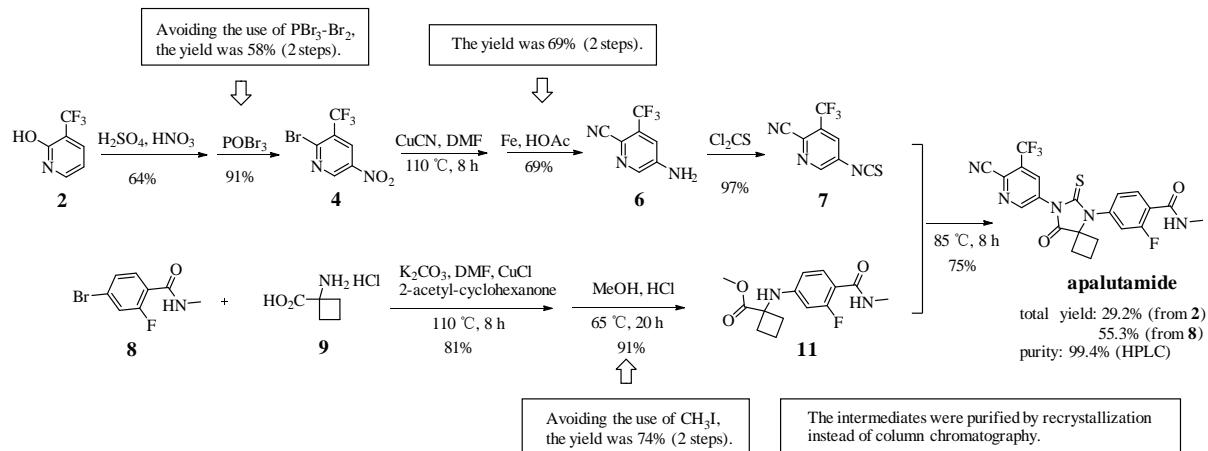
· 研究论文 (Paper) ·

- 1268 抗肿瘤环八肽 Reniochalistatin E 的固相合成....刘泰容, 莫金秋, 李长兵, 姜和, 廖洪利*
 Solid-phase Synthesis of Antitumor Cyclic Octapeptide Reniochalistatin E.....LIU T R, MO J Q, LI C B, JIANG H, LIAO H L*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.005

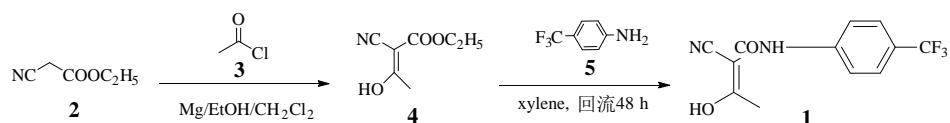


This process technology has several advantages such as cheap material and high yield in the industrial production.

- 1273 阿帕鲁胺的合成方法改进.....林楠, 马骥驰, 范松华
 Improved Synthesis of Apalutamide.....LIN N, MA J C, FAN S H
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.006



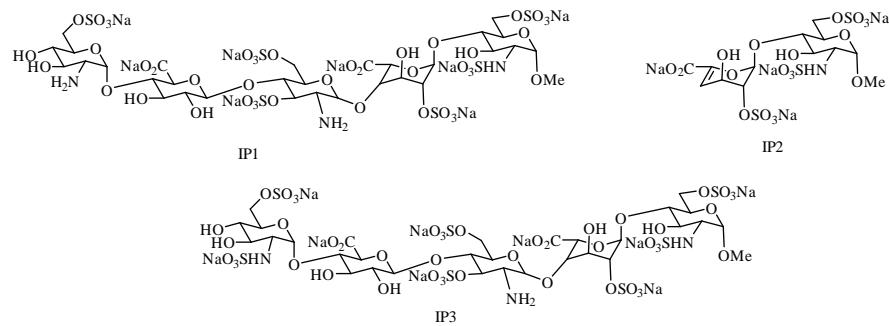
- 1278 特立氟胺的新合成方法.....邱月
 A New Method for the Synthesis of Teriflunomide.....QIU Y
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.007



A new synthetic route of trifluoromide was reported, and the total yield was 63.9%.

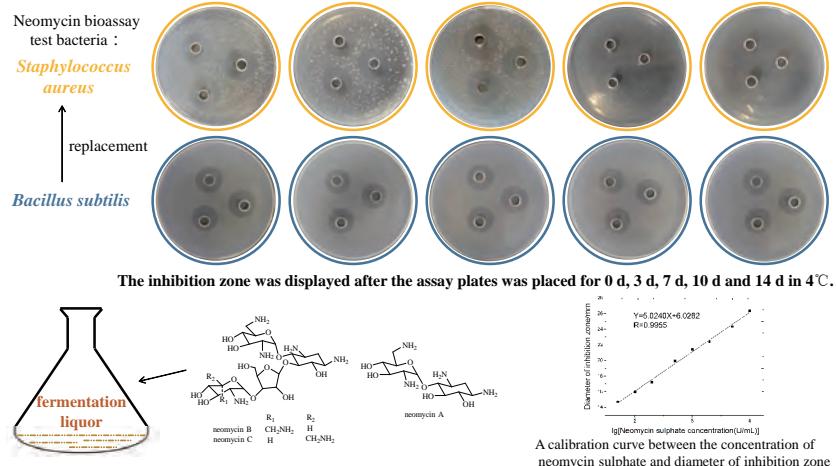
It provided a better choice for industrial production.

- 1280** 磺达肝癸钠注射液有关物质的合成·····干 浩, 徐珊珊, 周喜泽, 李振重
Synthesis of the Related Substances of Fondaparinux Sodium Injection·····
·····GAN H, XU S S, ZHOU X Z, LI Z Z
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.008

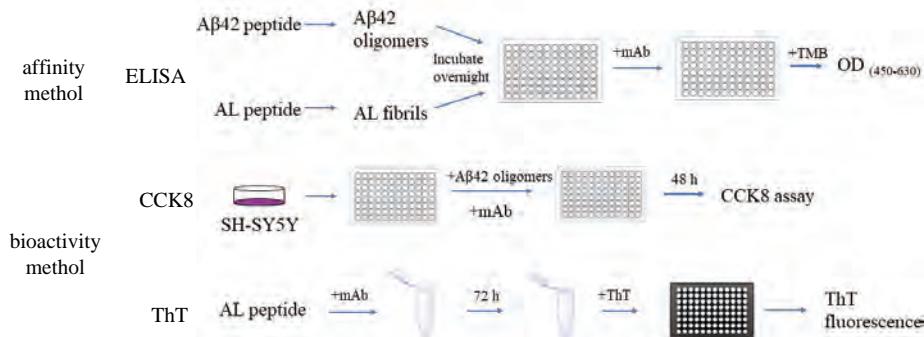


Chemical Structures of the Related Substances of Fondaparinux Sodium

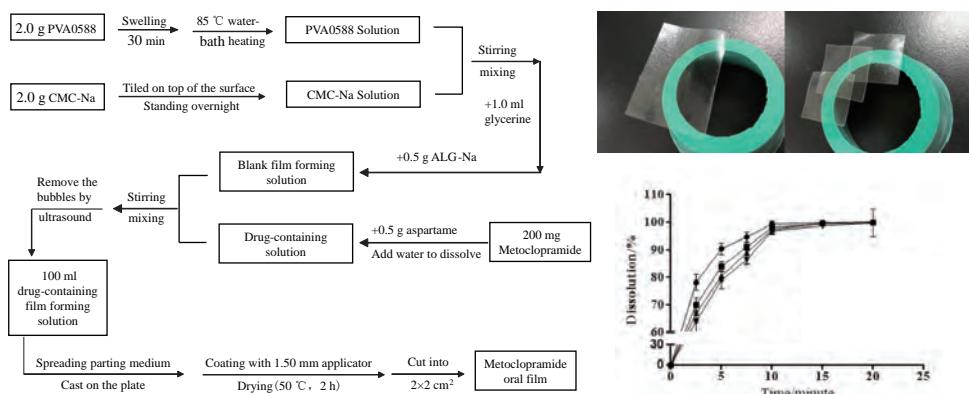
- 1285 新霉素微生物检定法的改进..... 张晶, 岳荣, 关莹, 程绍国, 张会图*
Improved Microbial Assay of Neomycin..... ZHANG J, YUE R, GUAN Y, CHENG S G, ZHANG H T*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.009



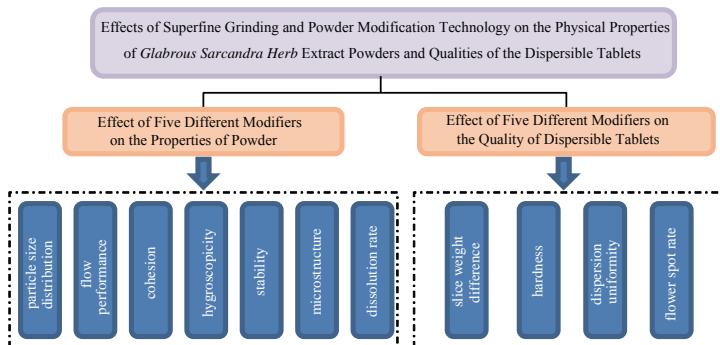
- 1290 抗 A β 和 AL 双抗原的单克隆抗体亲和力与活性检测方法的建立.....白婧怡, 边延林, 马步勇, 张宝红, 朱建伟*
Establishment of Affinity and Bioactivity Analysis Methods for Monoclonal Antibody Targeting
A β and AL.....BAI J Y, BIAN Y L, MA B Y, ZHANG B H, ZHU J W*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.010



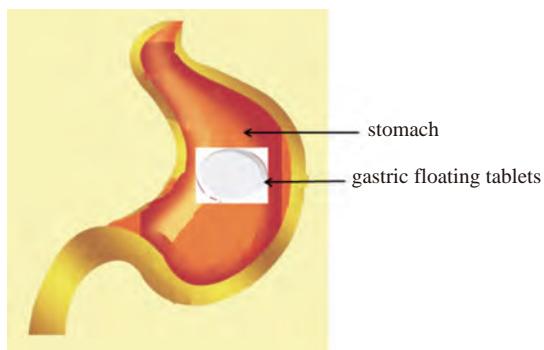
1296 甲氧氯普胺口腔速溶膜剂的制备与体外评价···尚 悅, 赵 焰, 李昊天, 周建平*, 丁 楠
 Preparation and *in vitro* Evaluation of Metoclopramide Oral Fast Dissolving Films···
 ······SHANG Y, ZHAO J, LI H T, ZHOU J P*, DING Y
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.011



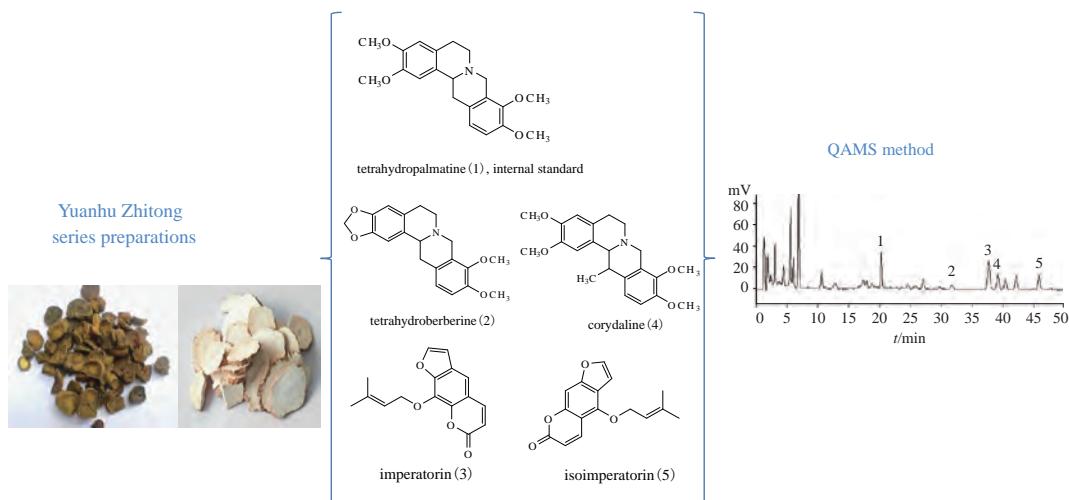
1304 超微粉碎粉体改性技术对肿节风浸膏粉物性及其分散片质量的影响···李 菁, 钟 钰, 胡鹏翼*, 戴德雄, 杨 明
 Effects of Ultrafine Grinding and Powder Modification Technology on the Physical Properties of Glabrous Sarcandra Herb Extract Powders and Qualities of the Dispersible Tablets···
 ······LI J, ZHONG Y, HU P Y*, DAID X, YANG M
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.012



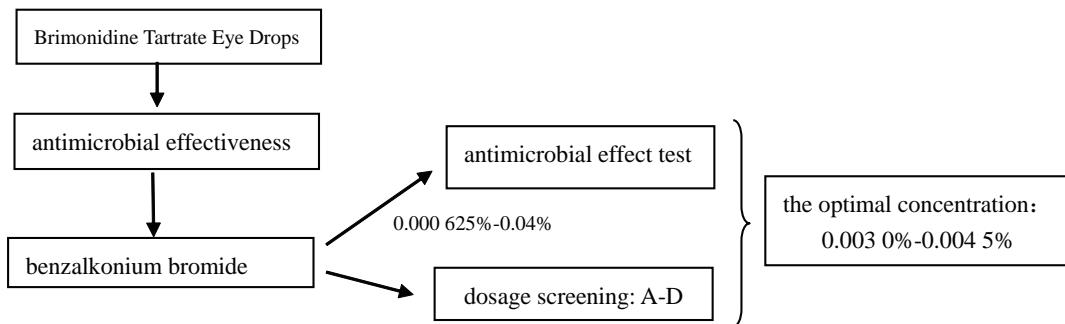
1312 桦褐孔菌三萜胃滞留片的研制···李 鑫, 陈 旭, 李钰璐, 汤茗瑞, 王柳婷
 Preparation of Gastric Floating Tablets Loaded with Triterpenoids from *Inonotus obliquus*···
 ······LI X, CHEN X, LI Y L, TANG M R, WANG L T
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.013



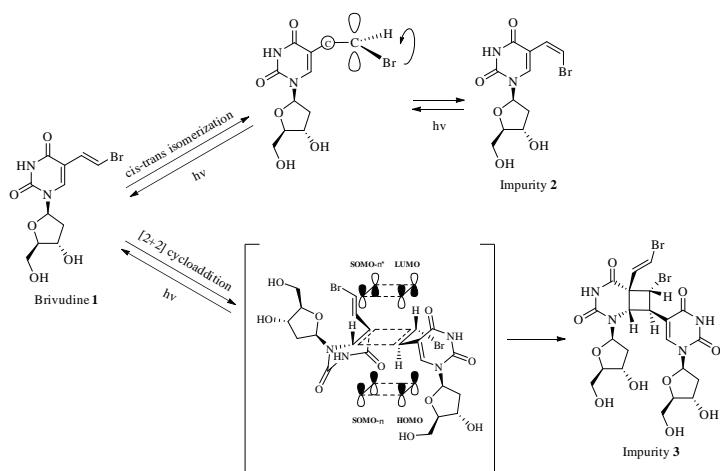
1318 一测多评法测定元胡止痛系列制剂中5种成分的含量……刘瑞洁，张 雪，叶晓霞，乐 健*
 Simultaneous Determination of Five Components in Yuanhu Zhitong Series Preparations by QAMS LIU R J, ZHANG X, YE X X, LE J*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.014



1324 酒石酸溴莫尼定滴眼液抑菌剂苯扎溴铵剂量筛选研究……李伟栋，苑艳飞，王维欣，王兰兰
 Dosage Screening of Benzalkonium Bromide in Brimonidine Tartrate Eye Drops..... LI W D, YUAN Y F, WANG W X, WANG L L
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.015



1329 溴夫定光降解杂质的结构鉴定与机理分析……吴旭锋，钱秀萍*，刘 涣
 Structure Identification and Mechanism Analysis of Photodegradation Impurities from Brivudine WU X F, QIAN X P*, LIU L
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.016



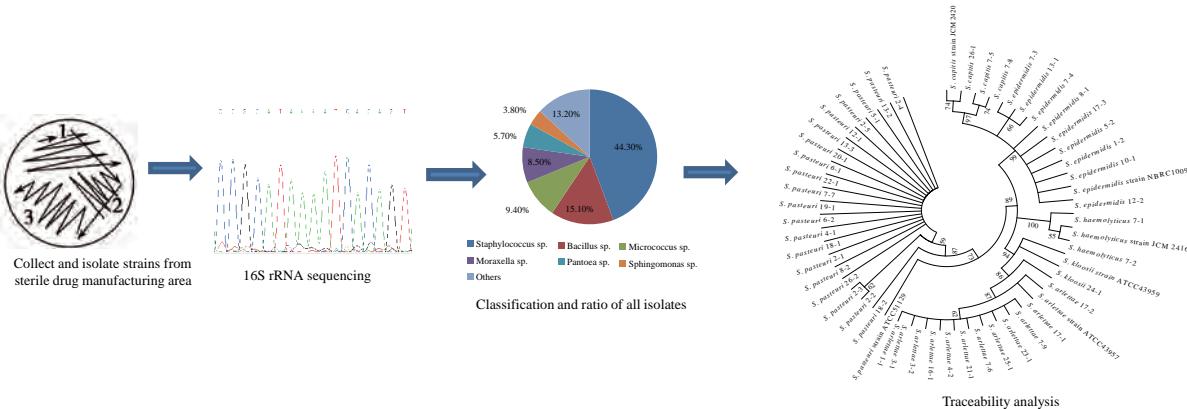
1335 无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析

刘卫德, 刘绪平*, 熊骏, 李彦霖, 章瑛

Identification and Traceability Analysis of Environmental Bacteria in Clean Room of Sterile Drug Manufacturing

LIU W D, LIU X P*, XIONG J, LI Y L, ZHANG Y

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.017

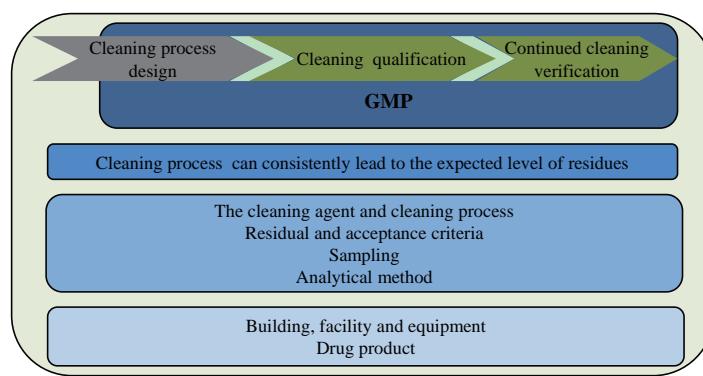


1341 药品生产中清洁验证的生命周期探讨

Comment to the Life Cycle of Cleaning Validation

ZHAI T W

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.018



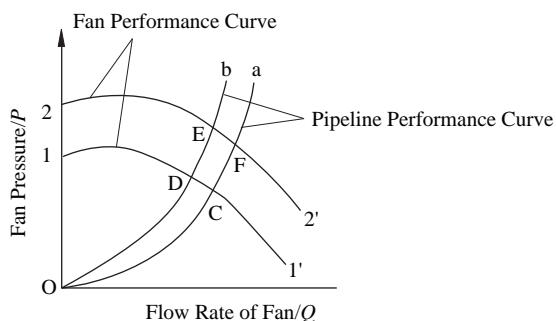
1348 抖袋过程对流化床稳定运行影响的研究与分析

马少栋, 孙健, 方策, 吴国桥

Research and Analysis on Effect of Shaking Bag System on Stable Operation of Fluid Bed

MA S D, SUN J, FANG C, WU G Q

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.019



1352 无菌药品包装完整性研究

Research of Sterile Products Packaging Integrity

FENG E F

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.020

- 1358 关于推动互联网+药品监管的思考·····袁 林
Perspective on Facilitating Internet + Drug Post-marketing Regulation·····YUAN L
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.021

- 1361 欧盟地区生物类似药可互换性政策与管理实践研究·····
·····里扎·阿德列提别克, 蒋 蓉, 邵 蓉*
Interchangeability Policy and Management Practice of Biosimilars in the EU·····
·····LIZHA A, JIANG R, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.022

- 1367 我国体外诊断试剂产业发展现状、问题及对策·····徐芳萍, 黄慧媛, 褚淑贞*
Development Status and Problems of IVD Reagent Industry in China·····
·····XU F P, HUANG H Y, CHU S Z*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.023

- 1374 2019年上半年我国医药工业经济运行情况分析·····郭 文, 钟一鸣, 周 斌*
Economic Operation of Chinese Pharmaceutical Industry from January to June 2019·····
·····GUO W, ZHONG Y M, ZHOU B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.024

· 其他 ·

广告索引(1284)

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2019年第50卷 第11期 11月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.11 November 10, 2019

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	刘玲玲	Executive Editor	LIU Lingling
出 版 单 位	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62126987, 62473200	Tel	021-62126987, 62473200
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	ouyy@pharmadl.com	E-mail	ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*146*zh*P*20.00* *24*2019-11

2019年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255
CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205
国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

抗 A β 和 AL 双抗原的单克隆抗体亲和力与活性检测方法的建立

白婧怡¹, 边延林¹, 马步勇², 张宝红¹, 朱建伟^{1*}

(1. 上海交通大学药学院, 细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心, 上海 200240; 2. 美国国立卫生研究院, 马里兰州 21702)

摘要: 随着靶向 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 和淀粉样蛋白轻链 (amyloid light chain, AL) 单克隆抗体的开发, 建立一种有效的抗 A β 和 AL 单克隆抗体亲和力及其生物活性检测方法十分必要。Crenezumab 是基于 A β 靶点研制的 IgG4 型全人源化抗 A β 单克隆抗体, 对 A β 寡聚体具有较强的亲和力。前期计算机方法模拟抗体抗原分子结合试验证实, 可能设计 1 种新型的抗体对 2 种抗原均有结合力和生物活性。本文基于研发同时具备抗 A β 和 AL 2 种抗原新型抗体的需求出发, 以 Crenezumab 为例, 建立间接 ELISA 方法, 并用该方法分别检测 Crenezumab 抗体对 A β 寡聚体和 AL 纤维的亲和力。进一步建立 SH-SY5Y 细胞活性实验方法和 ThT 荧光分析方法, 分别检测 Crenezumab 对 A β 和 AL 抗原的生物活性。本研究建立的检测方法可为同时靶向 A β 和 AL 的抗体的药学初步研究提供检测方法。

关键词: 单克隆抗体; β -淀粉样蛋白; 淀粉样蛋白轻链; 亲和力; 生物活性

中图分类号: TQ464.7 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)11-1290-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.010

Establishment of Affinity and Bioactivity Analysis Methods for Monoclonal Antibody Targeting A β and AL

BAI Jingyi¹, BIAN Yanlin¹, MA Buyong², ZHANG Baohong¹, ZHU Jianwei^{1*}

(1. Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody, MOE, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; 2. National Institutes of Health, Maryland 21702)

ABSTRACT: With the development of monoclonal antibodies targeting β -amyloid (A β) and amyloid light chain (AL), it is necessary to establish effective analytical methods for the anti- A β and AL antibody affinity and bioactivity assay. In this report we have used Crenezumab, a fully humanized IgG4 anti-A β monoclonal antibody (mAb) with relatively high affinity to A β oligomers, as a model to establish ELISA and cell based activity assays. Our previous research of antigen-antibody binding simulation using computational method indicated that it was possible to mutate the existing mAb to generate novel antibody mutants with modified affinity and bioactivity to the A β and AL, which may create novel mAbs targeting both antigens. To facilitate screening the novel antibodies targeting both A β and AL, we established indirect ELISA method for quick affinity measurement of the mAb to A β oligomers and AL fibrils. The results demonstrated assay reproducibility and reliability. Furthermore, cytotoxicity assay in SH-SY5Y neuroblastoma cell line and ThT fluorescence test were established for the antibody bioactivity detection to A β and AL to show cell toxicity of Crenezumab to A β 42 oligomers and inhibitory effect of AL fibrillogenesis by Crenezumab. So, both critical methods were successfully established and be applied to the screening and preliminary bioactivity assay of novel monoclonal antibodies targeting A β and AL.

Key Words: monoclonal antibody; β -amyloid; amyloid light chain; affinity; bioactivity

收稿日期: 2019-04-13

作者简介: 白婧怡(1993—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 微生物学与生化药学。

E-mail: nicolebai0828@163.com

通信联系人: 朱建伟(1956—), 男, 教授, 博士生导师, 从事生物技术制药研究与开发。

Tel: 021-34208024

E-mail: jianweiz@sjtu.edu.cn

淀粉样病变是一种细胞外不溶性蛋白沉积于人体的脑、心、肝、胰腺、肾、肺等重要器官组织的病理过程, 可引起组织器官的结构损伤和功能障碍, 是一种可以由多种因素和机制所导致的疾病^[1]。A β 和 AL 均为淀粉样纤维化聚集物的主要成分, 与

淀粉样病变的发病机制相关，两者在人体组织器官中的错误折叠和沉积可能导致局部性或系统性淀粉样病变^[2]。因此，Aβ 和 AL 如今已经成为治疗此类疾病的作用靶点。目前，开发以 Aβ 或 AL 为靶点的抗体药物被视为治疗淀粉样病变的潜在有效临床方案，此类抗体的应用可以实现对淀粉样蛋白聚集体的清除或抑制其聚集过程，降低其对细胞的毒性作用，从而达到治疗疾病的效果。近年来，已有较多临床或临床前靶向淀粉样蛋白抗体的免疫治疗研究报道^[3—5]。

Crenezumab 是美国 Genentech 公司研发的一种具有 IgG4 型抗体骨架结构的全人源化单克隆抗体药物，其主要的识别位点是寡聚态、纤维态的 Aβ，而对 Aβ 单体分子结合较弱。我们前期利用计算机方法进行了抗原 - 抗体结合模拟实验，对 Aβ、AL 的分子结构及抗原 - 抗体的识别位点进行了研究^[6—7]。结果表明，有望在 Crenezumab 的基础上进行改造，开发出对 Aβ 和 AL 两种抗原均有亲和力和生物活性的新型单克隆抗体。开发同时抗 Aβ 和 AL 单克隆抗体具有良好的临床应用前景，因此，建立一套准确有效的抗原 - 抗体亲和力和抗体生物活性检测方法十分重要。本研究基于新型靶向 Aβ 和 AL 单克隆抗体的开发需求，以 Crenezumab 为例，成功建立了抗 Aβ 和 AL 单克隆抗体的亲和力和生物活性检测方法。

1 仪器与材料

1.1 实验材料

Crenezumab 序列根据专利序列合成，抗体为本实验室制备；Aβ42 多肽与 AL 多肽由吉尔生化（上海）有限公司合成，序列如下：

Aβ42 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI
GLMVGGVVIA,

AL DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVL；

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 细胞购于 ATCC。

1.2 仪器与试剂

LRH-70F 型生化培养仪（上海天呈仪器制造有限公司）；CO₂ 细胞培养箱（美国 ThermoFisher Scientific 公司）；多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；超声波细胞粉碎机（宁

波新芝生物科技有限公司）；细胞计数仪（中国瑞云生物技术有限公司）；倒置显微镜（日本 Nikon 公司）。

HRP 标记驴抗人 IgG₁ 单克隆抗体购自美国 Jackson 公司；CCK-8 试剂盒购自东仁化学科技（上海）有限公司；六氟异丙醇、二甲亚砜（DMSO）、硫黄素 T 均购自上海麦克林公司；DMEM 培养基、FBS、细胞培养双抗、胰酶均购自美国 Gibco 公司。

2 方法和结果

2.1 Aβ42 寡聚体和 AL 纤维的制备

Aβ42 寡聚体由 Aβ42 单体制备合成。向 1 mg Aβ42 合成多肽干粉中加入 1 ml 冰预冷的六氟异丙醇（1,1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol, HFIP），室温孵育 60 min 使 Aβ42 溶解完全。将溶解后的多肽按照每 1 管 150 μl 分装后重新放回冰上，放置 5 ~ 10 min 后移至通风橱内，打开盖子使 HFIP 挥发。用氮气吹干残余 HFIP，管底形成透明的 Aβ 肽膜。将每管中的肽膜用 6 μl 新鲜无水的 DMSO 完全溶解，并用磷酸缓冲盐溶液（PBS）稀释至多肽浓度为 100 μmol/L。将以上溶液置 4 °C 孵育 24 h，4 °C 离心（13 000×g）并收取上清。

AL 纤维由 AL 单体制备合成。将 1 mg AL 合成多肽干粉溶于 1 ml 含有 0.1% 叠氮化钠的 PBS 中，得到浓度为 1 mg/ml 的溶液。经 0.2 μm 滤膜过滤，除去已经形成的 AL 聚集体。将溶液置 15 ml 离心管中，置摇床以 37 °C、225 r/min 条件孵育 14 d，室温离心（20 800×g）30 min，PBS 重悬，用超声波细胞粉碎仪以 200 W 功率、2 秒的停顿时间间隔持续超声 5 min，使 AL 纤维均匀分散于 PBS 中。

2.2 抗体亲和力的 ELISA 法检测

Aβ42 寡聚体和 AL 纤维制备完成后，以 Crenezumab 抗体为例，用 ELISA 方法检测 Crenezumab 对 Aβ42 寡聚体和 AL 纤维 2 种抗原的亲和力。

ELISA 法检测抗体亲和力的方法如下。用 0.05 mol/L、pH 9.6 的碳酸盐包被缓冲液稀释制备好的 Aβ42 寡聚体或 AL 纤维，使其浓度为 500 ng/ml，向每个 96 孔板的反应孔中加入 100 μl，4 °C 过夜进行抗原包被。d2 弃去孔内溶液，加入 300 μl 磷酸

盐 Tween 缓冲液 (PBST, PBS+0.5% Tween 20) 洗涤。向每孔内加入 100 μl 的 1% 牛血清白蛋白 (BSA), 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置封闭 1 h。封闭结束后, 用 PBST 反复洗涤 3 次。用 PBS 将待检抗体进行梯度稀释, 向每孔中加入 100 μl 待检样品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置孵育 2 h。孵育结束后, 用 PBST 反复洗涤 3~4 次; 用 0.1% 的 BSA 稀释 HRP 标记驴抗人 IgG γ 单克隆抗体 (1:3000), 每孔加入 100 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 孵育结束后, 用 PBST 洗涤, 向加样孔中加入 100 μl 四甲基联苯胺 (TMB) 工作液, 避光、室温放置显色 10~30 min。每孔加入 100 μl 终止液 (2 mol/L 硫酸), 轻轻叩击板子, 使孔中液体充分混匀, 颜色由蓝色变为黄色。30 min 内使用酶标仪检测 450 和 630 nm 波长处的 OD 值, 用 2 个波长处测得的 OD 值相减, 得到最终结果 $\text{OD}_{(450-630)}$ 。

ELISA 结果如图 1A 和图 1B 所示 (Bar 值代表 ELISA 测量复孔间的 SEM 值)。本实验中建立的 ELISA 检测原理是将 Crenezumab 作为一抗, HRP 标记抗体作为二抗, 当酶标二抗与 Crenezumab 进行结合后加入 TMB 工作液显色, 从而根据显色深浅定性分析 Crenezumab 与抗原的结合能力。图 1 显示, 当抗原、抗体浓度一定时, 对应以 A β 42 寡聚体为抗原的 ELISA 检测 OD 值高于以 AL 纤维为抗原的检测 OD 值, 说明 Crenezumab 与 A β 42 寡聚体和 AL 纤维均具有亲和力, 并且对 A β 42 寡聚体的亲和力更强。同时, 所建立的 ELISA 方法中抗原包被量和抗体稀释倍数适合, 方法具有较好的敏

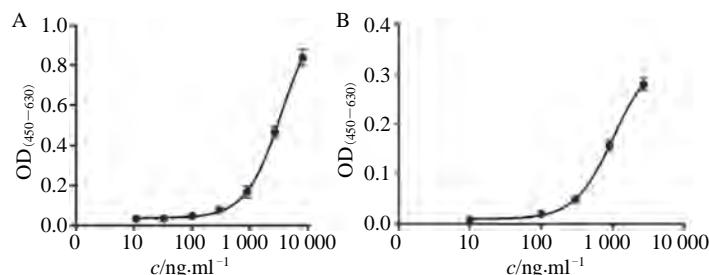
感性和特异性, 复孔误差值较小, 重复性高。

2.3 抗体对 A β 42 寡聚体的生物活性检测

A β 多肽的寡聚体形式对 SH-SY5Y 细胞的毒性作用已有文献报道^[8~9], 因此建立 SH-SY5Y 细胞实验模型进行细胞活性实验, 目的是通过检测 Crenezumab 的加入对 A β 42 寡聚体产生的细胞毒性的影响来分析抗体对 A β 42 寡聚体形成产生的抑制作用, 从而检测抗体对 A β 的生物活性。

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 在添加 10% (v/v) FBS、1% (v/v) 细胞培养双抗的 DMEM 培养基中培养, 每 2~3 d 按照 1:3 进行细胞传代。细胞活性试验开始前, 进行细胞活力检测和细胞计数, 当测得细胞活率达到 95% 以上时, 进行细胞活性实验。用 SH-SY5Y 细胞的完全培养基将细胞重新悬浮, 使细胞密度为 5×10^4 cells/ml, 以 100 μl 体积进行细胞铺板, 使细胞 96 孔板每孔平均约 5000 个细胞, 每孔培养体积为 100 μl 。将 96 孔板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 中培养过夜 (16~20 h), 使细胞贴壁。

在 4 $\mu\text{mol/L}$ A β 42 寡聚体作用浓度条件下, 检测不同浓度梯度下 Crenezumab 抗体对 A β 42 细胞毒性作用的抑制效果。将 SH-SY5Y 细胞以每孔 5000 cells 的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后吸弃培养基, 用 DMEM 培养基配 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 A β 42 寡聚体稀释液, 向孔板每孔内各加入 100 μl 。用 PBS 缓冲液稀释 Crenezumab 抗体, 将一定体积的抗体各浓度稀释液分别加入已含有 4 $\mu\text{mol/L}$ A β 42 寡聚体 100 μl 的孔中, 至抗体浓度为 0.5、0.1、0.05、



A : 抗体对 A β 42 寡聚体的亲和力检测, B : 抗体对 AL 纤维的亲和力检测

图 1 Crenezumab 抗体亲和力 ELISA 检测

Fig.1 Affinity Analysis of Crenezumab by ELISA

0.02 mg/ml 共 4 个梯度。设置空白对照，并设置 3 个复孔。将孔板置 37 °C、5% CO₂ 中继续培养 48 h。孵育结束后，用 CCK-8 试剂盒测定细胞活力，试验结果见图 2 (Bar 值代表 CCK-8 测量复孔间的 SEM 值，采用配对学生 t 检验进行统计学分析)。由图中可以看出，Crenezumab 的加入相比空白对照显著降低了 Aβ42 寡聚体的 SH-SY5Y 细胞毒性作用，并呈现出一定的量效依赖性，说明抗体对 Aβ 多肽的体外聚集具有抑制作用，对 Aβ 具有生物活性。

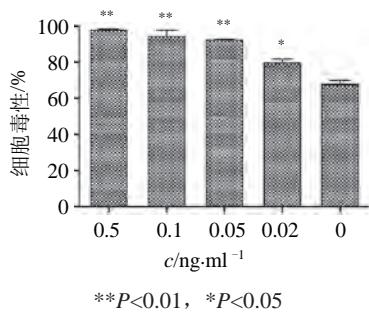


图 2 Crenezumab 对 Aβ42 寡聚体的细胞活性检测
Fig.2 Cell Toxicity Assays of Crenezumab to Aβ42 Oligomers

2.4 抗体对 AL 纤维的生物活性检测

荧光染料硫代黄素 T (ThT) 具有可以与淀粉样蛋白纤维中的反向平行的 β 折叠结构特异性结合的特点。当其与 β 折叠结合时，可以在 450 nm 处被激发，在 482 nm 处产生荧光信号，而未结合的 ThT 则不会产生荧光信号^[10]。由于这一特征，ThT 可被应用于淀粉样蛋白的鉴定和定量测定，从而研究淀粉样蛋白在体外的纤维化过程。

将 1 ml 新鲜配制的 PBSA (含 0.05% 叠氮化钠) 加入装有 1 mg AL 多肽干粉的离心管中，使多肽干粉完全溶解，制备浓度为 1 mg/ml 的 AL 单体。溶解后，经 0.22 μm 滤膜过滤除去已经形成的纤维沉淀，将多肽溶液分装后贮存于 -80 °C。试验开始前，用 PBSA 将 AL 单体稀释为 0.4 mg/ml，置冰上备用。向每个 1.5 ml EP 管中分别加入 100 μl 0.4 mg/ml 的 AL 溶液和 100 μl 不同浓度梯度的不同抗体稀释液，使管内 AL 单体终浓度为 0.2 mg/ml，抗体梯度浓度分别为 2、1、0.5 $\mu\text{mol/L}$ ，并设置阴性对照。将全

部 EP 管均置于 37 °C、240 r/min 摆床中，连续反应 72 h。

用超纯水将 ThT 粉末避光溶解完全，制得 2 mmol/L 的 ThT 溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤除去未溶解杂质，分装贮存于 -20 °C。72 h 反应结束后，用超纯水将 ThT 溶液稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$ ，并分别取一定体积的反应产物加入 ThT 溶液，使其与 ThT 的摩尔浓度之比约为 1 : 2，以防止荧光染料出现猝灭或灵敏度降低现象。吹打混匀后在室温条件下避光放置 30 min。取 96 孔黑壁透明底低吸附半区板，将孵育后的每种反应产物 AL 纤维与 ThT 的混合液向孔板中每孔加入 50 μl ，设置 3 个复孔。打开多功能酶标仪，设定激发波长为 450 nm，发射波长为 482 nm，选择底部测量模式，每孔数据读取 5 次，后将 96 孔板放入酶标仪开始读数，结果见图 3 (Bar 值代表 CCK-8 测量复孔间的 SEM 值，采用配对学生 t 检验进行统计学分析)。由图中可以看出，加入 Crenezumab 抗体的试验组荧光检测值相比加入 PBS 的对照组荧光检测值有显著降低，说明抗体能够有效抑制 AL 单体在体外的纤维化过程，且呈现出量效依赖性。当抗体浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时，ThT 荧光检测值与对照组相比出现小幅度上升，该结果与在其他利用 ThT 荧光检测法间接检测淀粉样蛋白聚集结果相符，推测当抗体浓度较低时，其加入无法有效抑制 AL 的纤维化过程，且可能导致其与 AL 的结合结构暴露出更多的 β 折叠结构，导致 ThT 荧光检测值的小幅上升^[11]。

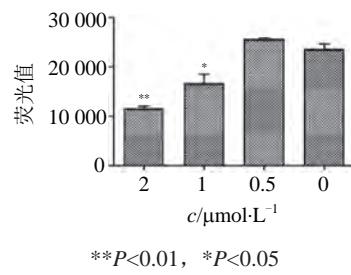


图 3 ThT 荧光法检测 Crenezumab 对 AL 纤维形成的抑制作用
Fig.3 Inhibition of AL Fibrillogenesis by Crenezumab Measured with ThT Fluorescence

3 讨论

本研究以 Crenezumab 为例, 建立了抗 A β 和 AL 单克隆抗体的抗原 - 抗体亲和力和抗体生物活性检测方法。检测抗体对抗原的亲和力普遍应用的试验方法是 ELISA 和 SPR 法。SPR 法具有更高的灵敏度和准确性, 能够实现抗体 - 抗原分子相互作用响应值的实时监控, 但价格较为昂贵。ELISA 方法更加经济、高效, 可以用于高通量的抗原 - 抗体亲和力筛选。Ultsch 等利用 SPR 法分别检测了 Crenezumab 对 A β 单体和寡聚体 2 种抗原的亲和力^[12], 结果与此前发表的 ELISA 法结果一致。对比 2 种方法, SPR 法更加显著地体现出 Crenezumab 对 2 种抗原的亲和力差异, 且可定量分析抗体对 2 种抗原的亲和力常数 (KD), 说明 SPR 法具有更高的灵敏度。但由于 ELISA 法具有更加经济、简便的优势, 本研究使用了快速有效的间接 ELISA 法, 进行 Crenezumab 抗体对 A 寡聚体和 AL 纤维的亲和力检测, 结果表明 Crenezumab 对 A β 42 寡聚体和 AL 纤维均具有亲和力。进一步, 通过建立 SH-SY5Y 细胞活性试验方法和 ThT 荧光分析方法, 检测 Crenezumab 对 A β 和 AL 抗原的生物活性。尚未见报道有关抗 AL 抗体体外活性研究的细胞模型, 动物体内试验为检测抗体生物活性的主要方法^[13-14]。因此, 为了初步检测抗体对 AL 纤维的生物活性, 利用 ThT 荧光染料与淀粉样蛋白纤维中的 β 折叠结构选择性结合的特性, 通过测定 ThT 在与 AL 体外纤维化产物结合后在 450 nm 处激发, 482 nm 处发射条件下的荧光值, 进行 AL 体外成纤维试验, 间接检测 AL 纤维的生成情况。生物活性试验结果表明, Crenezumab 对 A β 和 AL 均表现出生物活性, 在一定程度上能够抑制 A β 42 和 AL 多肽的体外聚集过程。本研究建立了简单快捷的初步亲和力和体外生物活性的检测方法, 可以有效提高抗 A β 和 AL 单克隆抗体的初步检测效率, 快速筛选具有开发潜力的候选治疗药物, 为候选药物的体内试验, 例如向 BALB/c 小鼠体内注射人源 AL 或 ATTR 提取物^[15]等研究提供候选药物的快速筛选方法。

对于淀粉样病变的临床治疗方案, 靶向淀粉样蛋白的抗体药物的使用提供了一种新型思路, 其目的是清除或减少器官或组织中的病理性蛋白纤维沉积。本研究中描述的抗体 - 抗原亲和力与生物活性检测方法特异性强、灵敏度高、误差范围小, 可被应用于新型靶向 A β 和 AL 两种抗原的单克隆抗体的开发研究, 为此类抗体的药学初步研究提供检测方法参考。

参考文献:

- [1] AGUZZI A, O'CONNOR T. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(3): 237-248.
- [2] SANCHORAWALA V. Light-chain(AL) amyloidosis: diagnosis and treatment [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1(6): 1331-1341.
- [3] RENZ M, TORRES R, DOLAN P J, et al. 2A4 binds soluble and insoluble light chain aggregates from AL amyloidosis patients and promotes clearance of amyloid deposits by phagocytosis [J]. *Amyloid*, 2016, 23(3): 168-177.
- [4] SALLOWAY S, HONIGBERG L A, CHO W, et al. Amyloid positron emission tomography and cerebrospinal fluid results from a crenuzumab anti-amyloid-beta antibody double-blind, placebo-controlled, randomized phase II study in mild-to-moderate Alzheimer's disease(BLAZE) [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2018, 10(1): 96.
- [5] GERTZ M A, LANDAU H, COMENZO R L, et al. First-in-human phase I /II study of NEOD001 in patients with light chain amyloidosis and persistent organ dysfunction [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(10): 1097-1103.
- [6] ZHAO J, NUSSINOV R, MA B Y. Mechanisms of recognition of amyloid-beta(A β) monomer, oligomer, and fibril by homologous antibodies [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(44): 18325-18343.
- [7] ZHAO J, ZHANG B, ZHU J, et al. Structure and energetic basis of overrepresented lambda light chain in systemic light chain amyloidosis patients [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(6 Pt B): 2294-2303.
- [8] KOSEOGLU M M, OZDILEK B A, DJAKBAROVA U, et al. Targeting ras activity prevented amyloid beta-induced aberrant neuronal cell cycle re-entry and death [J]. *Curr*

- Alzheimer Res*, 2016, **13**(11): 1267-1276.
- [9] MURAKAMI K, SUZUKI T, HANAKI M, et al. Synthesis and characterization of the amyloid beta40 dimer model with a linker at position 30 adjacent to the intermolecular beta-sheet region [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **466**(3): 463-467.
- [10] NAIKI H, HIGUCHI K, HOSOKAWA M, et al. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1 [J]. *Anal Biochem*, 1989, **177**(2): 244-249.
- [11] ACERRA N, KAD N M, CHERUVARA H, et al. Intracellular selection of peptide inhibitors that target disulphide-bridged Abeta42 oligomers [J]. *Protein Sci*, 2014, **23**(9): 1262-1274.
- [12] ULTSCH M, LI B, MAURER T, et al. Structure of crenazumab complex with A β shows loss of beta-hairpin [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 39374.
- [13] LEVITES Y, O'NUALLAIN B, PULIGEDDA R D, et al. A human monoclonal IgG that binds A β assemblies and diverse amyloids exhibits anti-amyloid activities *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2015, **35**(16): 6265-6276.
- [14] NUVOLONE M, MERLINI G. Emerging therapeutic targets currently under investigation for the treatment of systemic amyloidosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, **21**(12): 1095-1110.
- [15] O'NUALLAIN B, HRNCIC R, WALL J S, et al. Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera [J]. *J Immunol*, 2006, **176**(11): 7071-7078.

(上接第1289页)

参考文献:

- [1] 郑为. 氨基糖苷类抗生素研究的新进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2005, **26**(3): 101-109.
- [2] 滕慧, 张亚雄. 新霉素研究进展[J]. 三峡大学学报, 2008, **30**(2): 94-98.
- [3] 王小亮, 张秉华. 曲安奈德新霉素贴膏的质量评价[J]. 中国抗生素杂志, 2018, **42**(3): 324-329.
- [4] 中华人民共和国农业部. 饲料药物添加剂使用规范农业部公告第168号[S]. 北京: 国家标准出版社, 2001.
- [5] 高喜良. 几种常见的新型抗生素饲料添加剂[J]. 山西农业, 2001, **10**(6): 34-35.
- [6] 王欣放, 王雅静. 如何提高抗生素效价管碟测定法的准确性[J]. 中国当代医药, 2015, **22**(8): 182-183.
- [7] 黄结, 韦涛. 3种稀释液制备的菌悬液存活时限比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, **25**(12): 1948-1951.
- [8] 蒋惠岚. 管碟法测定抗生素效价的影响因素及控制方法[J]. 中国兽药杂志, 2011, **45**(8): 53-55.
- [9] 吕虹静. 探讨抗生素微生物检定法的误差因素及解决对策[J]. 中国城乡企业卫生, 2015, **30**(1): 88-89.
- [10] 刘英. 管碟法测定抗生素效价中的影响因素[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, **33**(8): 80-81.
- [11] 崔春英. 实用抗生素微生物检定技术[M]. 河南: 河南科技技术出版社, 2007.
- [12] 李光辉, 郭卫芸, 高雪丽, 等. 2013~2015年金黄色葡萄球菌食物中毒事件特征分析[J]. 食品研究与开发, 2018, **39**(6): 200-203.
- [13] 管程程, 于美美, 高伟, 等. 金黄色葡萄球菌的致病和耐药机制研究进展[J]. 实验与检验医学, 2017, **35**(1): 1-4.