



(21)申请号 201910279725.1

(22)申请日 2019.04.09

(71)申请人 上海药明生物技术有限公司

地址 200131 上海市浦东新区富特中路299号

(72)发明人 潘隽 聂思惟 吴琼 刘静静
万雅莉 郭新东 郑勇 李竞

(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627
代理人 杨剑 孙秀武

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法,其中包括表面上展示TIM-3抗原或其功能片段以及报告基因基团的免疫细胞,以及包括与CD-3抗体交联的微珠。通过混合所述免疫细胞、所述微珠、TIM-3抗体,检测报告基因基团的活性进而判断TIM-3抗体活性。该方法操作简单、灵敏度高、重复性好。

1. 一种试剂盒,其包含:

(i) 免疫细胞,所述免疫细胞的细胞表面上展示TIM-3抗原或其功能片段,以及报告基因基因;和

(ii) 微珠,所述微珠与CD-3抗体交联。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其进一步包括以下中的至少一种:

1) CD28抗体;

2) 报告基因底物。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中,所述免疫细胞包括T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞中的一种以上;优选地,所述T细胞包括Jurkat细胞、HuT-78、CEM、Molt-4、M0、H9、MJ、TALL-104、Loucy、P116、J45.01、J.RT3-T3.5、M0、H9、MJ、TALL-104、Loucy、P116、J45.01、J.RT3-T3.5中的一种以上。

4. 如权利要求1或2所述的试剂盒,所述报告基因包括氯霉素乙酰转移酶(cat)、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、葡萄糖醛酸酶(GUS)、二氢叶酸还原酶、荧光素酶、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)、荧光蛋白家族诸如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型GFP(EGFP)和去稳定EGFP、红色荧光蛋白(RFP)中的一种以上。

5. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中所述报告基因的靶启动子包括NFAT启动子、IL2启动子、PGK启动子、SV40启动子、GPC3启动子中的至少一种。

6. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中,所述微珠为磁珠,优选为超顺磁珠,优选地,所述免疫细胞和微珠的个数比例范围为100:1至1:100。

7. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其中,所述TIM-3抗原或其功能片段为人源的,优选地,所述CD-3抗体为人源的,所述CD-28抗体为人源的。

8. 一种检测TIM-3抗体活性的方法,其包括以下步骤:

a) 将免疫细胞和微珠接触,其中,所述免疫细胞的细胞表面上展示外源TIM-3抗原或其功能片段,以及所述免疫细胞能够表达报告基因;所述微珠与CD-3抗体交联;

b) 使所述免疫细胞与TIM-3抗体接触;以及

c) 测量报告基因活性。

9. 如权利要求8所述的方法,其中,在所述步骤a)中,使所述免疫细胞进一步和CD28抗体接触。

10. 如权利要求8所述的方法,其中,所述免疫细胞包括T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞中的一种以上;优选地,所述T细胞包括Jurkat细胞、HuT-78、CEM、Molt-4、M0、H9、MJ、TALL-104、Loucy、P116、J45.01、J.RT3-T3.5中的一种以上。

11. 如权利要求8所述的方法,其中,所述报告基因包括氯霉素乙酰转移酶(cat)、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、葡萄糖醛酸酶(GUS)、二氢叶酸还原酶、荧光素酶、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)、荧光蛋白家族诸如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型GFP(EGFP)和去稳定EGFP、红色荧光蛋白(RFP)中的一种以上。

12. 如权利要求8所述的方法,所述报告基因的靶启动子包括NFAT启动子、IL2启动子、PGK启动子、SV40启动子、GPC3启动子中的至少一种。

13. 如权利要求8所述的方法,其中,所述微珠为磁珠,优选为超顺磁珠,优选地,所述免

疫细胞和微珠的个数比例范围为100:1至1:100。

14. 如权利要求10所述的方法, 其中, 所述TIM-3抗原或其功能片段为人源的, 优选地, 所述CD-3抗体为人源的, 所述CD-28抗体为人源的。

15. 如权利要求1至7任一项所述试剂盒在制备用于检测TIM-3抗体的免疫细胞活化功能的产品中的应用, 优选地, 所述免疫细胞包括T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞中的一种以上。

一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法。

背景技术

[0002] T细胞免疫球蛋白及粘蛋白域蛋白.3(T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3,简称TIM-3)作为一个关键免疫检查点分子,广泛存在于Th-1辅助T细胞、细胞毒性CD8⁺T细胞、树突细胞、单核细胞、自然杀伤细胞等细胞的表面,在与其配体结合后会对免疫功能起到调节作用。现有大量研究表明,TIM-3在肿瘤引起的免疫抑制过程中起到重要作用。

[0003] T细胞的激活一般需要第一信号与第二信号同时存在。第一信号为CD3/TCR(T细胞受体)复合物与抗原呈递细胞(APC)或是其他细胞表面的抗原/MHC(主要组织相容性抗原)复合物结合后产生。第二信号为共刺激信号,主要为T细胞表面的CD28与APC表面的CD80/86结合后产生。已有文献报道,TIM-3可以通过与TCR下游的Src激酶,包括Fyn和Lck,相互作用后抑制T细胞的免疫响应,例如IL-2分泌。

[0004] 目前针对TIM-3抗体的免疫细胞例如T细胞活性功能检测需要使用原代的免疫细胞,材料来源受限同时实验流程非常复杂,整体实验通常需要5-7天,实验本身的重复性也较差。

[0005] 因此,亟需一种简单易行且灵敏度高的检测方法,本发明旨在解决该问题。

发明内容

[0006] 本发明公开了一种试剂盒,其包含:

[0007] (i) 免疫细胞,所述免疫细胞的细胞表面上展示TIM-3抗原或其功能片段,以及靶启动子依赖性的报告基因基因;

[0008] (ii) 微珠,所述微珠与CD-3抗体交联。

[0009] 在一个实施例中,所述试剂盒其进一步包括CD28抗体,其中所述CD28抗体优选为人源CD28抗体,所述CD28抗体的单次使用量为5ng至50000ng,例如,5ng、10ng、50ng、100ng、150ng、200ng、250ng、300ng、350ng、400ng、450ng、500ng、1000ng、2000ng、3000ng、4000ng、5000ng、10000ng、20000ng、30000ng、40000ng、50000ng,例如在浓度范围为0.1μg/mL至10μg/mL,使用体积为50μL的倍数,这个实施例仅是用于解释本发明,本领域技术人员应该容易理解抗体的使用浓度和体积可以根据实际进行调整。

[0010] 在一个实施例中,所述免疫细胞包括但不限于T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞中的一种以上。

[0011] 在一个具体实施例中,所述T细胞包括但不限于Jurkat细胞、HuT-78、CEM、Molt-4、M0、H9、MJ、TALL-104、Loucy、P116、J45.01、J.RT3-T3.5、M0、H9、MJ、TALL-104、Loucy、P116、J45.01、J.RT3-T3.5中的一种以上。

[0012] 在一个实施例中,所述报告基因包括但不限于氯霉素乙酰转移酶(cat)、β-半乳糖

苷酶 (LacZ)、葡萄糖醛酸酶 (GUS)、二氢叶酸还原酶、荧光素酶诸如萤火虫荧光素酶 (firefly Luciferase)、NanoLucTM 萤光素酶、海肾萤光素酶 (Renilla Luciferase)、叩头虫荧光素酶 (beetle luciferase)、分泌型碱性磷酸酶 (SEAP)、荧光蛋白家族诸如绿色荧光蛋白 (GFP)、蓝色荧光蛋白 (BFP)、增强型 GFP (EGFP) 和去稳定 EGFP、红色荧光蛋白 (RFP) 中的一种以上。

[0013] 在一个实施例中,所述试剂盒其进一步报告基因底物,例如氯霉素乙酰转移酶 (cat) 的底物氯霉素 (Chloramphenicol)、 β -半乳糖苷酶 (LacZ) 的底物 X-Gal、葡萄糖醛酸酶 (GUS) 的底物 X-Gluc、二氢叶酸还原酶的底物二氢叶酸、萤火虫荧光素酶 (firefly Luciferase) 的底物荧光素 (Luciferin)、NanoLucTM 萤光素酶的底物 furimazine 荧光素、海肾萤光素酶 (Renilla Luciferase) 的底物肠腔素 (Coelenterazine)、叩头虫荧光素酶 (beetle luciferase) 的底物 (Beetle Luciferin)、分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 的底物间硝基苯磷酸 (PNPP)。

[0014] 在一个实施例中,所述靶启动子包括 NFAT 启动子、IL2 启动子、PGK 启动子、SV40 启动子、GPC3 启动子中的至少一种。

[0015] 在一个具体实施例中,所述免疫细胞是通过将外源 TIM-3 抗原或其功能片段以及靶启动子依赖性的报告基因基团转染入目的细胞后获得的稳定表达外源 TIM-3 抗原的细胞。

[0016] 在一个实施例中,所述微珠为磁珠,优选为超顺磁珠。

[0017] 在一个实施例中,所述 TIM-3 抗原或其功能片段为人源的。

[0018] 在一个实施例中,所述 CD-3 抗体为人源的,所述 CD-28 抗体为人源的。

[0019] 在一个实施例中,其中所述 T 细胞和微珠的个数比例范围为 100:1 至 1:100,例如 90:1,80:1,70:1,60:1,50:1,40:1,30:1,20:1,10:1,1:1,1:10,1:20,1:30,1:40,1:50,1:60,1:70,1:80,1:90,优选为 10:1 至 1:10,例如 9:1,8:1,7:1,6:1,5:1,4:1,3:1,2:1,1:1,1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:8,1:9。

[0020] 另一方面,本发明提供了一种检测 TIM-3 抗体活性的方法,其包括以下步骤:

[0021] a) 将免疫细胞和微珠接触,其中,所述免疫细胞的细胞表面上展示外源 TIM-3 抗原或其功能片段,以及所述免疫细胞能够表达靶启动子依赖性的报告基因;所述微珠与 CD-3 抗体交联;

[0022] 在一个实施例中,进一步包括以下步骤中的一种以上:

[0023] b) 使所述免疫细胞与 TIM-3 抗体接触;

[0024] c) 添加荧光素酶底物,裂解;

[0025] d) 测量报告基因活性。

[0026] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种检测 TIM-3 抗体活性的方法,其包括以下步骤:

[0027] 1) 将免疫细胞和微珠接触,其中,所述免疫细胞的细胞表面上展示外源 TIM-3 抗原或其功能片段,以及所述免疫细胞能够表达靶启动子依赖性的报告基因;所述微珠与 CD-3 抗体交联;

[0028] 2) 使所述免疫细胞与 TIM-3 抗体接触;

[0029] 3) 测量报告基因活性。

[0030] 在一个实施例中,步骤3)的步骤包括读取荧光强度,绘制相对抑制强度和抗体浓度的曲线图,计算 IC_{50} 。

[0031] 在一个实施例中,在所述步骤a)中,使所述免疫细胞进一步和CD28抗体接触。

[0032] 在一个具体实施例中,在所述步骤1)中,进一步混合CD28抗体,其中所述CD28抗体优选为人源CD28抗体,所述CD28抗体的单次使用量为5ng至50000ng,例如,5ng、10ng、50ng、100ng、150ng、200ng、250ng、300ng、350ng、400ng、450ng、500ng、1000ng、2000ng、3000ng、4000ng、5000ng、10000ng、20000ng、30000ng、40000ng、50000ng,例如在浓度范围为0.1 μ g/mL至10 μ g/mL,按此使用体积为50 μ L的倍数,这个实施例仅是用于解释本发明,本领域技术人员应该容易理解抗体的使用浓度和体积可以根据实际进行调整。

[0033] 在一个实施例中,所述免疫细胞包括T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞中的一种以上。

[0034] 在一个具体实施例中,所述T细胞包括Jurkat细胞、HuT-78、CEM、Molt-4、MO、H9、MJ、TALL-104、Loucy、P116、J45.01、J.RT3-T3.5中的一种以上。

[0035] 在一个实施例中,所述报告基因包括氯霉素乙酰转移酶(cat)、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、葡萄糖醛酸酶(GUS)、二氢叶酸还原酶、荧光素酶、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)、荧光蛋白家族诸如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型GFP(EGFP)和去稳定EGFP、红色荧光蛋白(RFP)中的一种以上。

[0036] 在一个实施例中,所述靶启动子包括NFAT启动子、IL2启动子、PGK启动子、SV40启动子、GPC3启动子中的至少一种。

[0037] 在一个实施例中,所述微珠为磁珠,优选为超顺磁珠。

[0038] 在一个实施例中,所述TIM-3抗原或其功能片段为人源的。

[0039] 在一个具体实施例中,所述CD-3抗体为人源的,所述CD-28抗体为人源的。

[0040] 在一个实施例中,所述T细胞和微珠的个数比例范围为100:1至1:100。

[0041] 在一个实施例中,所述TIM-3抗体的浓度范围为0.001nM至1000nM,例如0.001nM至1000nM、0.01nM至1000nM、0.1nM至1000nM、1nM至1000nM、10nM至1000nM、100nM至1000nM。

[0042] 在一个具体实施例中,所述TIM-3抗体的浓度范围优选为20 μ g/mL至,例如20 μ g/mL、5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.3125 μ g/mL、78.125ng/mL、19.53ng/mL、4.88ng/mL、1.22ng/mL。

[0043] 又一方面,本发明进一步公开了如前所述试剂盒在制备用于检测TIM-3抗体的免疫细胞活化功能中的产品中的应用。

[0044] 在一个实施例中,所述免疫细胞包括T细胞、B细胞、NK细胞、树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞中的一种以上。

[0045] 有益效果

[0046] 使用Jurkat细胞系代替原代T细胞,减少了实验对材料的依赖程度,同时也增加了实验本身的稳定性和可重复性。

[0047] 使用检测报告基因的方法代替检测T细胞增殖效应或是细胞因子分泌作用。缩短了实验的流程同时大大提高了实验的操作便捷程度,而且在检测灵敏度上也有大幅提升。

附图说明

[0048] 图1示出转染前后Jurkat与Jurkat IL-2P Luc TIM-3FL细胞通过流式细胞术检测

的细胞表面TIM-3表达。

[0049] 图2示出流式细胞仪检测不同TIM-3抗体对细胞表面TIM-3的结合结果。

[0050] 图3示出细胞对不同TIM-3抗体的响应结果。

[0051] 图4示出使用混合淋巴反应检测细胞不同TIM-3抗体的结果。

[0052] 图5示出不同激活条件的信号窗口对比图。

[0053] 图6示出微珠处理激活Jurkat细胞后IL-2分泌水平变化的结果。

具体实施方式

[0054] 下面将通过具体描述,对本发明作进一步的说明。

[0055] 除非另有限定,本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同的含义。

[0056] 本申请中,单数形式“一个”、“该”包括复数对象,除非上下文另外清楚规定。

[0057] 如本文所用的术语“报告基因”是指一类在细胞、组织/器官或个体处于特定情况下会表达并使得其产生易于检测、且在被转染的细胞中无相似的内源性表达产物。作为报告基因,其表达产物能进行定量测定。例如,氯霉素乙酰转移酶(cat)、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、葡萄糖醛酸酶(GUS)、二氢叶酸还原酶、荧光素酶诸如萤火虫荧光素酶(firefly Luciferase)、NanoLucTM荧光素酶、海肾荧光素酶(Renilla Luciferase)、叩头虫荧光素酶(beetle luciferase)、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)、荧光蛋白家族诸如绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、增强型GFP(EGFP)和去稳定EGFP、红色荧光蛋白(RFP)等。

[0058] 如本文所用的术语“靶启动子”也指靶基因启动子,即RNA聚合酶识别、结合和开始转录的能够启动被调控基因的一段DNA序列,它含有RNA聚合酶特异性结合和转录起始所需的保守序列,启动子本身不被转录。例如,NFAT启动子、IL2启动子、PGK启动子、SV40启动子、GPC3启动子。

[0059] 如本文所用的术语“超顺磁珠”是指在外部磁场的作用下,微球可以定向移动;外部是一层包覆层,表面分布着许多活性基团,可以和细胞、蛋白质、核酸、酶等生化试剂发生偶联,进而在磁场的作用下实现分离的微珠。一般地,用于生化分析的磁性微球必须满足以下条件:1)超强的顺磁性,就是指在磁场的存在下能迅速聚集,离开磁场能够均匀分散,不出现聚集显现现象;2)合适的粒径且粒径分布范围窄,使微球有足够强的磁响应性,又不会因粒径太大而发生沉降;3)具有丰富的表面活性基团,以便微球可以和生化物质偶联,并在外磁场的作用下实现与被测样品的分离。本发明中使用的例如与CD-3抗体交联的超顺磁珠。

[0060] 如本文所用的术语“T细胞”也指T淋巴细胞(T lymphocyte),是由来源于骨髓的淋巴干细胞,在胸腺中分化、发育成熟后,通过淋巴和血液循环而分布到全身的免疫器官和组织中发挥免疫功能。分为辅助性T细胞(Helper T cells,Th),具有协助体液免疫和细胞免疫的功能;抑制性T细胞(Suppressor T cells,Ts),具有抑制细胞免疫及体液免疫的功能;效应T细胞(Effector T cells,Te),具有释放淋巴因子的功能;细胞毒性T细胞(Cytotoxic T cells,Tc),具有杀伤靶细胞的功能;迟发性变态反应T细胞(Delayed type hypersensitivity T cells,Td),有参与IV型变态反应的作用;放大T细胞(Ta),可作用于Th和Ts,有扩大免疫效果的作用;原始的或天然T细胞(Virgin or Natural T cells),他们和

抗原接触后分化成效应T细胞和记忆T细胞;以及记忆T细胞(Memory T cell, T_m),有记忆特异性抗原刺激的作用。T细胞在体内存活的时间可数月至数年。T细胞细胞株包括但不限于Jurkat细胞(外周血T淋巴细胞瘤)、HuT-78(T淋巴细胞白血病细胞)、CEM(6T-CEM,人T细胞株白血病细胞株)、Mo1t-4(人急性淋巴母细胞白血病细胞)、M0(毛细胞白血病病人(Mo)脾建立的细胞系)、H9(人T淋巴细胞株)、MJ(淋巴瘤细胞)、TALL-104(急性T淋巴细胞白血病细胞)、Loucy(人淋巴细胞系白血病)、P116(急性淋巴细胞株白血病细胞株)、J45.01(人急性T细胞白血病细胞)、J.RT3-T3.5(TCR-p链缺陷型的T细胞系)。

[0061] 如本文所用的术语“功能片段”是指本发明的TIM-3抗原的任何部分,所述部分保留其作为一部分的抗原的基本相似或相同的生物学活性和功能。

[0062] 如本文所用的术语“交联”是指抗体与微珠的固定连接,例如共价连接,本发明中使用的微珠中,所述抗体可以直接连接于微珠上,也可以通过中间物的协助连接于微珠上,例如抗体与核苷酸交联后,核苷酸与微珠结合。

[0063] 实施例

[0064] 通过以下实施例进一步说明本发明。提供实施例仅用于说明目的,并且不应被解释为以任何方式限制本发明的范围或内容。

[0065] 实施例1:hTIM-3FL(人源TIM-3的全长序列)质粒合成

[0066] 根据人TIM-3全长序列(NM 032782.3)设计引物,引物序列如下:

[0067] 前向引物F:

[0068] AGCCTCCGGACTCTAGAGGGCCGCCACCATGTTTTCACA (SEQ ID NO:1)

[0069] 反向引物R:

[0070] GTTAGCCTCCCCGTTTAACTCATGGCATTGCAAAGCGAC (SEQ ID NO:2)

[0071] 前向引物包含上游Xho I酶切识别位点,反向引物包含下游Pme I酶切识别位点。TIM-3全长基因序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成至pUC57载体。以上述质粒为模板通过PCR将人TIM-3全长序列扩增出来。PCR产物与pcDNA3.3载体(Invitrogen; K830001)经过Xho I和Pme I双酶切(NEB)后,将人TIM-3全长序列插入到pcDNA3.3载体中,构建phTIM-3FL质粒,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,序列正确。

[0072] 实施例2:稳定细胞株

[0073] 1.转染

[0074] 1)复苏Jurkat E6-1(ATCC,货号TIB-152)

[0075] 2)使用RPMI1640(Gibco,22400089)+10%胎牛血清(Excell FND500)+1%青霉素-链霉素(Hyclone SV30010)于培养箱中培养。

[0076] 3)按照Nucleofector(Lonza V4XC-1012)用户指南,使用IL-2P Luc质粒(Promega,J1656)进行转染操作。

[0077] 4)转染后细胞培养于6孔板中

[0078] 2.Jurkat IL-2P Luc稳定细胞株筛选

[0079] 1)转染完成48小时后,添加潮霉素B(Millipore 400052)进行筛选,每3-4天更换一次筛选培养基,直至空白细胞完全死亡。

[0080] 2)继续培养,直至细胞数满足下一步要求。

[0081] 3.Jurkat IL-2P Luc hTIM-3FL稳定细胞株构建及筛选

- [0082] 1) 按照Nucleofector用户指南,使用hTIM-3FL质粒进行转染操作。
- [0083] 2) 转染完成48小时后,添加灭瘟素 (Gibco A11139-03) 进行筛选,每3-4天更换一次筛选培养基,直至对照组细胞完全死亡。
- [0084] 3) 计数后将细胞密度调整为2.5个细胞/mL,并按照200 μ L/孔铺至96孔U型板中。
- [0085] 4) 继续培养,直至可见明显细胞团块产生。
- [0086] 5) 挑取每个单克隆后,进行扩大培养。
- [0087] 本领域技术人员应该能够理解,只要能够表达TIM-3的稳定细胞株,既可以符合本发明的要求,而建立TIM-3的稳定细胞株是属于常规方法,上述方法仅是一个具体实施例,并不意味着限制了本发明。
- [0088] 实施例3:转染前后Jurkat细胞表面TIM-3表达情况检测
- [0089] 计数JurkatIL-2P Luc hTIM-3FL细胞以及Jurkat细胞,调整密度为100万个细胞/ml,按照100 μ L/孔加入96孔FACS板中。
- [0090] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清。
- [0091] 1:100稀释PE标记hTIM-3抗体 (eBioscience 12-3109-42),按100 μ L/孔与96孔板中细胞进行混合,并于4 $^{\circ}$ C孵育1小时。
- [0092] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清,并添加清洗缓冲液,并重复一次。
- [0093] 使用流式细胞仪 (BD FACSCanto II) 进行荧光检测。具体结果见图1,结果显示在JurkatIL-2P Luc hTIM-3FL细胞 (箭头所指) 中表面TIM-3平均荧光强度为435,证明该细胞表面存在hTIM3表达,可用于后续研究。
- [0094] 实施例4:不同TIM-3抗体对细胞表面TIM-3的结合检测
- [0095] 计数稳定表达hTIM-3的CHO-K1细胞,调整密度为100万个细胞/mL,按照100 μ L/孔加入96孔FACS板中。
- [0096] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清。
- [0097] 梯度稀释hTIM-3抗体,起始浓度20 μ g/mL,5倍稀释,共8个浓度点,按100 μ L/孔与96孔板中细胞进行混合,并于4 $^{\circ}$ C孵育1小时。所用hTIM-3抗体均根据序列合成纯化所得,其中hTIM-mAb15为根据Jounce公司的全人源抗-TIM3抗体 (参见美国专利申请US20160200815) 序列合成获得。
- [0098] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清,并添加清洗缓冲液。
- [0099] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清。
- [0100] 重复清洗一次。
- [0101] 稀释相对应PE标记的荧光二抗 (1:150稀释),按100 μ L/孔与96孔板中细胞进行混合,并于4 $^{\circ}$ C孵育1小时。
- [0102] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清。
- [0103] 梯度稀释hTIM-3抗体,起始浓度20 μ g/ml,5倍稀释,共8个浓度点,按100 μ L/孔与96孔板中细胞进行混合,并于4 $^{\circ}$ C孵育1小时。所用hTIM-3抗体均根据序列合成纯化所得,其中hTIM-mAb15为根据Jounce公司的全人源抗-TIM3抗体 (US20160200815) 序列合成获得。
- [0104] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清,并添加清洗缓冲液。
- [0105] 4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清。
- [0106] 重复清洗一次。

[0107] 使用流式细胞仪进行荧光检测。具体结果见图2,详细数据见表1,结果表示除阴性对照 (Human IgG4K) 外,所有hTIM-3抗体均和细胞表面的TIM-3存在结合。

[0108] 表1流式细胞仪检测平均荧光强度结果

[0109]

Abs(ug/ml)	Abs (nM)	hTIM3-Ab1	hTIM3-Ab2	hTIM3-Ab3	hTIM3-mAb15	Human IgG4K
2.00E+01	1.33E+02	421000	232000	423000	467000	2346
4.00E+00	2.67E+01	427000	223000	422000	440000	1990
8.00E-01	5.33E+00	389000	194000	420000	429000	1725
1.60E-01	1.07E+00	251000	140000	350000	456000	2137

[0110]

3.20E-02	2.13E-01	109000	66200	148000	321000	1647
6.40E-03	4.27E-02	57400	32200	56500	146000	N.A.
1.28E-03	8.53E-03	41900	14600	24400	63400	N.A.
2.56E-04	1.71E-03	N.A.	7726	15800	30200	N.A.

[0111] 实施例5:TIM-3抗体对T细胞功能活化检测实例

[0112] 计数Jurkat IL-2P Luc hTIM-3FL细胞,并调整细胞密度为200万个细胞/mL,并混合CD3抗体包被Dynabeads (Dynabeads:细胞数=10:1-1:10) 以及CD28抗体 (0.1-10μg/mL),按照50μL/孔加入白色96孔板中。

[0113] 梯度稀释TIM-3抗体,起始浓度20μg/mL,4倍稀释,共8个浓度点。并按50μL/孔与96孔板中细胞进行混合。

[0114] 于二氧化碳培养箱中培养过夜后,添加50μL孔荧光素酶底物One-Glo (Promega E6110),室温裂解5分钟。

[0115] 使用PerkinElmer EnVision多功能读板器进行荧光素酶活性检测,并计算相对抑制强度,并以相对抑制强度为纵轴,抗体浓度为横轴进行作图,具体结果见图3,详细数据见表2。结果显示所检测的4个hTIM-3抗体中,除hTIM3-Ab2以外均有不同强度的抑制活性,对于不同抗体,其抑制曲线也存在一定区别。即使对于有相似结合能力的hTIM3-Ab1和hTIM3-Ab3,其抑制曲线的IC₅₀也有明显区别。这说明并非所有具有hTIM3结合能力的抗体均有抑制活性。

[0116] 表2. 荧光读值 (RLU) 及相对响应%

[0117]

Abs(ug/ml)	Abs (nM)	hTIM3-Ab1			
		RLU		Relative Induction%	
2.00E+01	1.33E+02	4520	4240	47.98302	45.01062
5.00E+00	3.33E+01	4640	4760	49.2569	50.53078
1.25E+00	8.33E+00	4680	4880	49.68153	51.80467
3.13E-01	2.08E+00	4720	6040	50.10616	64.11889
7.81E-02	5.21E-01	6560	6280	69.63908	66.66667
1.95E-02	1.30E-01	8240	6880	87.47346	73.0361
4.88E-03	3.26E-02	8680	10160	92.14438	107.8556
1.22E-03	8.14E-03	8040	10800	85.35033	114.6497
Abs(ug/ml)	Abs (nM)	hTIM3-Ab2			
		RLU		Relative Induction%	

2.00E+01	1.33E+02	7000	7240	81.77571	84.57944
5.00E+00	3.33E+01	8760	8280	102.3365	96.72897
1.25E+00	8.33E+00	8440	8560	98.59814	100
3.13E-01	2.08E+00	9080	9520	106.0748	111.215
7.81E-02	5.21E-01	9040	9280	105.6075	108.4112
1.95E-02	1.30E-01	9080	8360	106.0748	97.66356
4.88E-03	3.26E-02	9120	8600	106.5421	100.4673
1.22E-03	8.14E-03	8920	8200	104.2056	95.7944

Abs(ug/ml)	Abs (nM)	hTIM3-Ab3			
		RLU		Relative Induction%	
2.00E+01	1.33E+02	7120*	3880	77.22343*	42.08242
5.00E+00	3.33E+01	3680	4360	39.91324	47.2885
1.25E+00	8.33E+00	5720	4880	62.03904	52.92841
3.13E-01	2.08E+00	8680	8520	94.14317	92.40781
7.81E-02	5.21E-01	9560	8480	103.6876	91.97396
1.95E-02	1.30E-01	9120	9480	98.91539	102.82
4.88E-03	3.26E-02	8520	10760	92.40781	116.7028
1.22E-03	8.14E-03	7840	10600	85.03254	114.9675
Abs(ug/ml)	Abs (nM)	hTIM3-mAb15			
		RLU		Relative Induction%	
2.00E+01	1.33E+02	3480	3760	42.33577	45.74208
5.00E+00	3.33E+01	3680	3960	44.76886	48.17517
1.25E+00	8.33E+00	3800	3600	46.22871	43.79562
3.13E-01	2.08E+00	3880	3680	47.20193	44.76886
7.81E-02	5.21E-01	5040	4400	61.31387	53.52799
1.95E-02	1.30E-01	8520	7400	103.6497	90.02434
4.88E-03	3.26E-02	7360	7560	89.53771	91.9708
1.22E-03	8.14E-03	8200	8240	99.75668	100.2433
Abs(ug/ml)	Abs (nM)	Human IgG4K			
		RLU		Relative Induction%	
2.00E+01	1.33E+02	8360	7920	92.27373	87.41722
5.00E+00	3.33E+01	8680	7560	95.80573	83.4437
1.25E+00	8.33E+00	9480	9320	104.6358	102.8697
3.13E-01	2.08E+00	8280	7960	91.39072	87.85871
7.81E-02	5.21E-01	8800	8960	97.13023	98.89625
1.95E-02	1.30E-01	8080	8360	89.18321	92.27373
4.88E-03	3.26E-02	9440	8280	104.1942	91.39072
1.22E-03	8.14E-03	9160	8960	101.1038	98.89625

[0118]

[0119] 实施例6:使用混合淋巴反应检测不同TIM-3抗体的响应

[0120] 使用梯度离心法从健康捐献者全血中分离出外周血单个核细胞,并按照用户手册

使用磁珠分选CD4⁺细胞以及单核细胞。

[0121] 单核细胞通过GM-CSF和IL-4诱导分化5-7天后成为未成熟树突状细胞,后进一步诱导为成熟树突状细胞。

[0122] 成熟树突状细胞与另一捐献者的CD4⁺T细胞均匀混合并加入到96孔板中。

[0123] 梯度稀释TIM-3抗体,起始浓度100 μ g/mL,2倍稀释,共6个浓度点。其中hTIM3-huAb1为人源化后的hTIM3-Ab1。

[0124] 于二氧化碳培养箱中培养5天后取上清,检测上清中的 γ 干扰素浓度。具体结果见图4,详细数据见表3。结果显示hTIM3-Ab4可以增加CD4⁺T细胞的响应水平,而对于hTIM3-huAb1和hTIM3-mAb15,则无法使用混合淋巴反应检测到对CD4⁺T细胞响应的促进作用。这表示使用混合淋巴反应对hTIM3抗体进行功能检测的灵敏度远低于报告基因系统。

[0125] 表3上清中 γ 干扰素浓度(ng/ml)

[0126]

Abs(μ g/ml)	Abs(nM)	hTIM3-mAb1		
100.0	666.7	0.831579	0.797913	0.719533
50.0	333.3	0.779867	0.692029	1.125767*
25.0	166.7	1.067709	1.114953	0.931003
12.5	83.3	0.961492	0.662858	0.845145
6.3	41.7	0.637577	0.834438	0.5982
3.1	20.8	0.776926	0.53669	0.717302
		hTIM3-Ab4		
100.0	666.7	0.586692*	1.136011	1.224629
50.0	333.3	0.901927	0.786203	1.175094
25.0	166.7	0.907767	0.489916	0.295865*
12.5	83.3	1.35914*	0.86049	0.739779
6.3	41.7	0.813709	0.68229	1.025896
3.1	20.8	0.645736	1.153866	0.637011
		hTIM3-mAb15		
100.0	666.7	1.404826*	0.747341	0.525142
50.0	333.3	0.901739	0.976821	0.835904
25.0	166.7	0.368265	1.053418	0.61588
12.5	83.3	1.5884*	0.78262	0.547996
6.3	41.7	0.606775	0.488947	0.737567

[0127]

3.1	20.8	0.373293	0.380383	0.705534
		Human IgG4K		
100.0	666.7	0.861188	0.633488	1.109434
		No Ab		
0	0	0.72717	0.75072	1.132299

[0128] 实施例7:不同激活条件对报告基因系统检测窗口的影响

[0129] 计数Jurkat IL-2P Luc hTIM-3FL细胞,并调整细胞密度为200万个细胞/ml,并混

合CD3抗体包被Dynabeads (Dynabeads:细胞数=10:1-1:10) 以及CD28抗体 (0.1-10ug/ml), 按照50μL/孔加入白色96孔板中。

[0130] 另计数aAPC细胞, 并按照aAPC:Jurkat=1:1、1:3、和1:9的比例, 按照50ul/孔加入白色96孔板中。

[0131] 稀释TIM-3抗体, 终浓度为0.1μg/mL, 并按50μL/孔与96孔板中细胞进行混合。

[0132] 于二氧化碳培养箱中培养过夜后, 添加50μL/孔荧光素酶底物One-Glo (Promega E6110), 室温裂解5分钟。

[0133] 使用PerkinElmer EnVision多功能读板器进行荧光素酶活性检测。具体结果见图5, 详细数据见表4。并使用Unpaired t test with Welch's correction进行统计学分析, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。结果表明在不同aAPC和Jurkat比例的系统中, 使用beads激活的抑制效果均优于使用aAPC激活。

[0134] 表4不同激活条件的信号窗口原始数据

[0135]

	Human IgG4K			hTIM3.mAb15			Relative Induction%		
E:T=1:1 +a-CD28	4760	5080	5480	5360	5200	5360	104.96	101.83	104.96
E:T=1:3 +a-CD28	7960	7720	6640	7360	7440	6800	98.925	100	91.398
E:T=1:9 +a-CD28	12680	12360	14200	9840	8720	10040	75.229	66.667	76.758
Beads +a-CD28	1120	1320	960	640	640	520	56.471	56.471	45.882
No Activation	560	440	600	520	560	480	97.5	105	90

[0136] 实施例8: 使用Dynabeads激活Jurkat细胞后上清中IL-2水平的变化

[0137] 计数Jurkat IL-2P Luc hTIM-3FL细胞, 并调整细胞密度为200万个细胞/mL, 按照50μL/孔加入96孔板中。

[0138] 按照Cell:Dynabeads=16:1、4:1、和1:1的比例稀释Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco 11131D)。

[0139] 稀释TIM-3抗体, 终浓度为50μg/mL, 并按100μL/孔与96孔板中细胞进行混合。

[0140] 于二氧化碳培养箱中培养3天后吸取上清, 并用ELISA检测上清中的IL-2浓度。结果见图6, 详细数据见表5。结果表示使用检测上清中IL-2浓度的方式并无法灵敏的表示hTIM-3抗体对Jurkat的激活作用。

[0141] 表5 Jurkat细胞上清中IL-2浓度 (pg/mL)

[0142]

Cell:Dynabeads	Human IgG4K			hTIM3-Ab4			hTIM3-mAb15		
16	32	28	53	31	21	13	35	37	35
4	174	174	160	161	173	169	186	166	173
1	619	673	705	649	673	732	682	770	467

[0143] 等效

[0144] 前述实施例被认为是说明性的, 而不是对本文所述的本发明的限制。本发明的范围由所附权利要求书而不是由前述说明书表示, 并且意在将落入权利要求书的等同物的含义和范围内的所有改变包括在其中。

序列表

<110> 上海药明生物技术有限公司

<120> 一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法

<130> AJ3297PI1901

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

agcctccgga ctctagaggg ccgccaccat gttttcaca 39

<210> 2

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

gttagcctcc cccgtttaaa ctcatggcat tgcaaagcga c 41

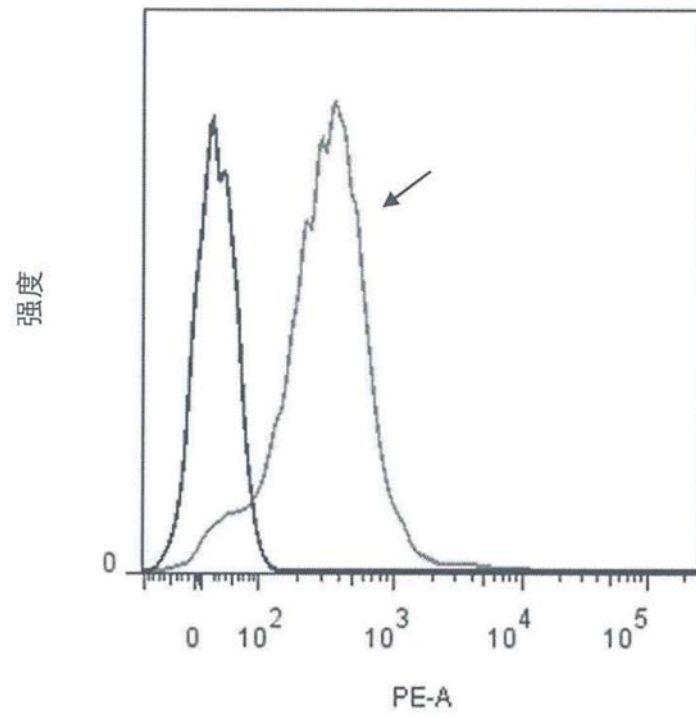


图1

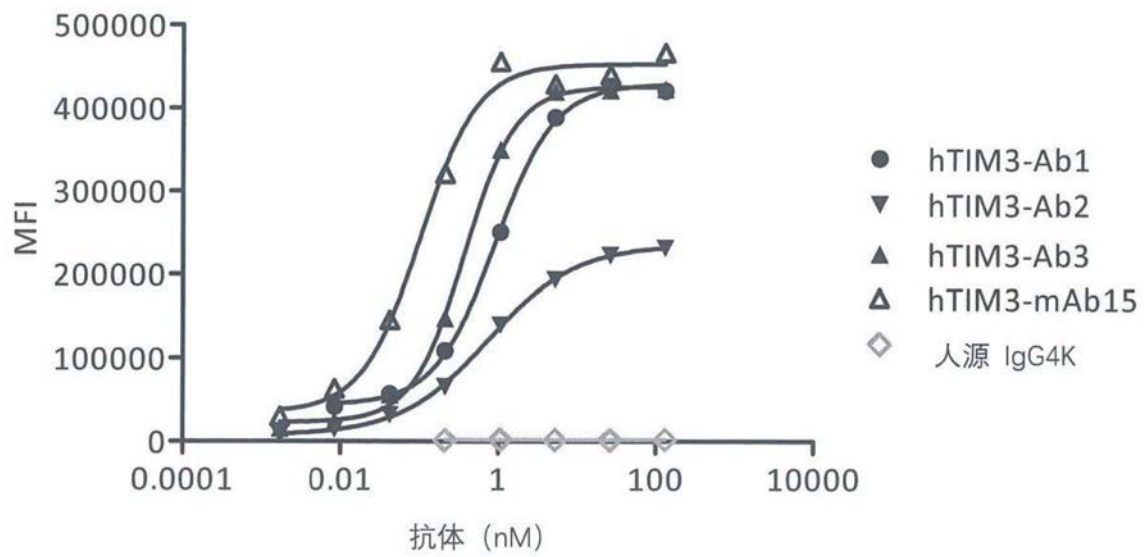


图2

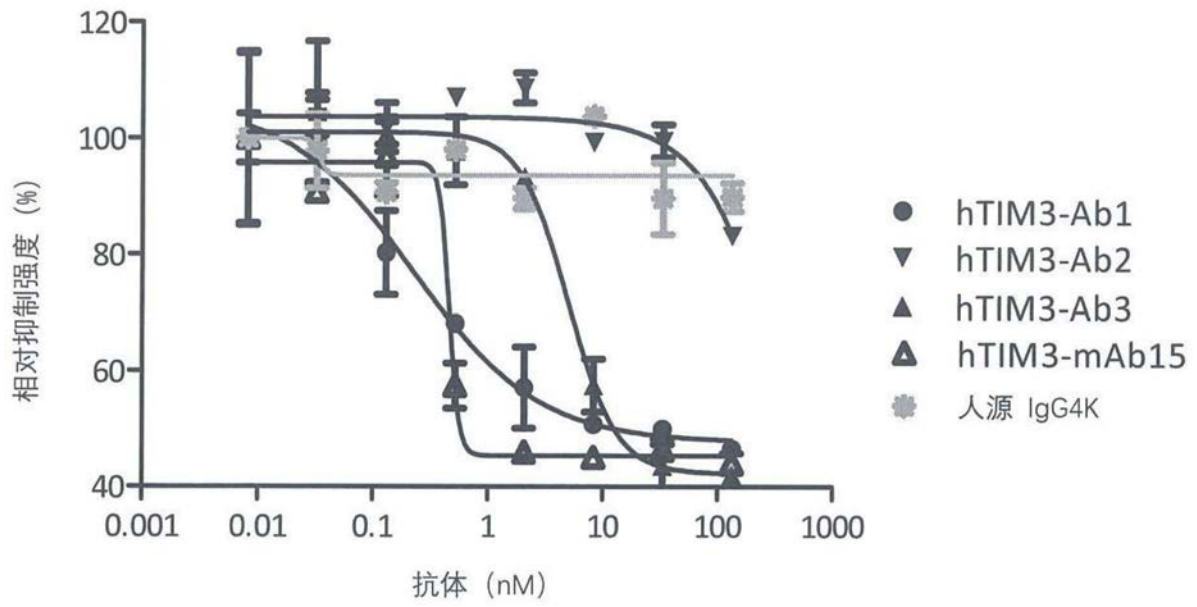


图3

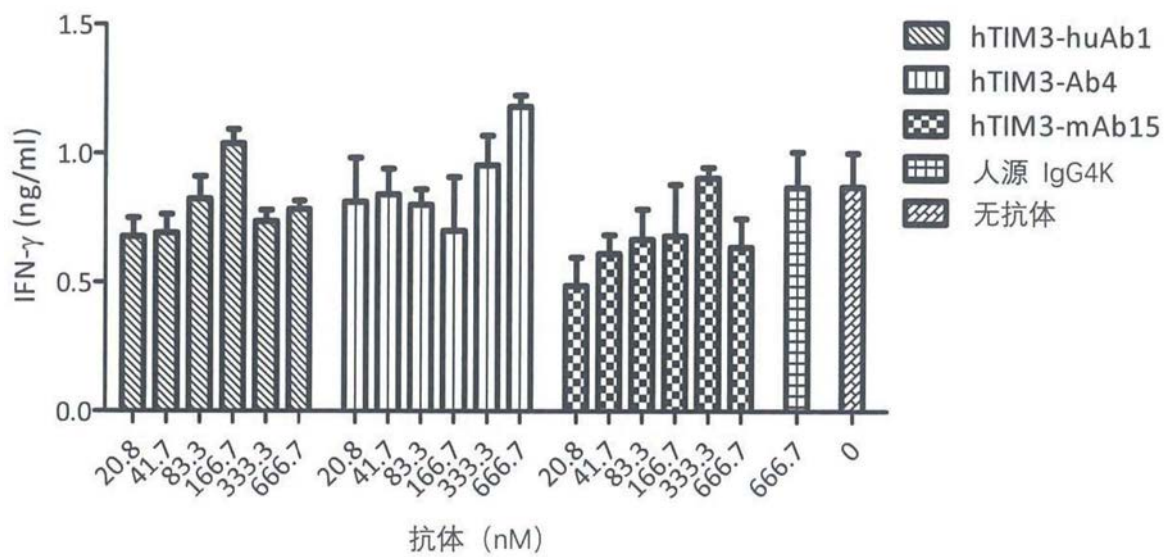


图4

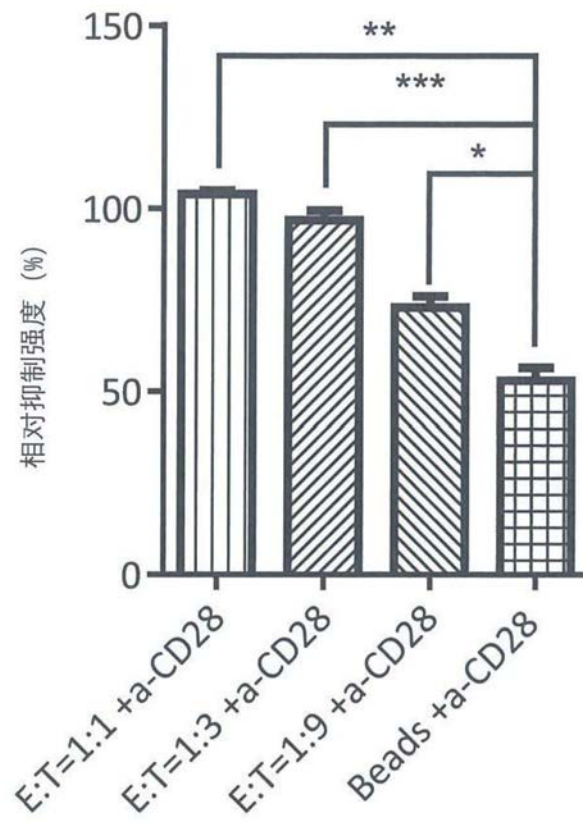


图5

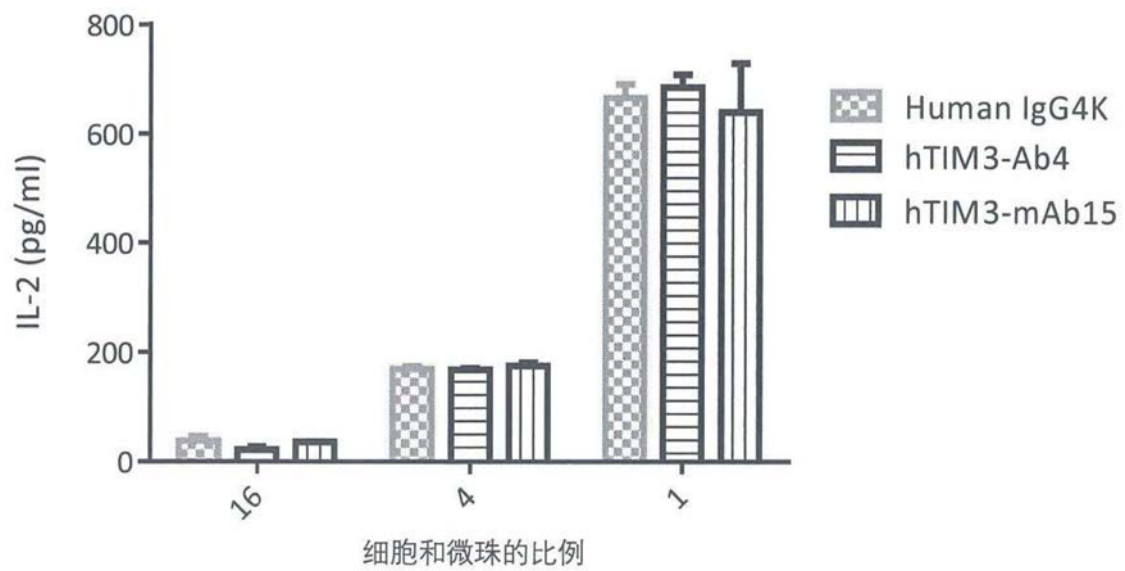


图6

专利名称(译)	一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法		
公开(公告)号	CN109975537A	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201910279725.1	申请日	2019-04-09
[标]申请(专利权)人(译)	上海药明生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海药明生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海药明生物技术有限公司		
[标]发明人	潘隽 吴琼 刘静静 郭新东 郑勇 李竞		
发明人	潘隽 聂思惟 吴琼 刘静静 万雅莉 郭新东 郑勇 李竞		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/577		
代理人(译)	杨剑 孙秀武		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测TIM-3抗体活性的试剂盒和方法，其中包括表面上展示TIM-3抗原或其功能片段以及报告基因基团的免疫细胞，以及包括与CD-3抗体交联的微珠。通过混合所述免疫细胞、所述微珠、TIM-3抗体，检测报告基因基团的活性进而判断TIM-3抗体活性。该方法操作简单、灵敏度高、重复性好。

Abs(μ g/ml)	Abs(nM)	hTIM3-Ab1	hTIM3-Ab2	hTIM3-Ab3	hTIM3-mAb15	Human IgG4K
2.00E+01	1.33E+02	421000	232000	423000	467000	2346
4.00E+00	2.67E+01	427000	223000	422000	440000	1990
8.00E-01	5.33E+00	389000	194000	420000	429000	1725
1.60E-01	1.07E+00	251000	140000	350000	456000	2137