



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110596369 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201910678193.9

(22)申请日 2019.07.25

(71)申请人 熊浩

地址 430070 湖北省武汉市洪山区西岗16
号

(72)发明人 熊浩

(74)专利代理机构 深圳迈辽知识产权代理有限公司 44525

代理人 赖耀华

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表8页

(54)发明名称

一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒,本发明提供的试剂盒中的人源化单克隆抗体能够高强度、特异性与TIM-3抗原结合,具有高效检测TIM-3相关疾病的辅助诊断作用, Tim-3是1型免疫的负调节因子, Tim-3信号传导是诱导抗原特异性耐受所必需的,而Tim-3阻断促进了自发性自身免疫的发生发展。

1. 一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒,其特征在于,将TIM-3抗体包被板制成固相抗体,所述TIM-3抗体包括:

包含SEQ ID NO:01的氨基酸序列的CDR-L1,和/或
包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的CDR-L2,和/或
包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的CDR-L3,和/或
包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的CDR-H1,和/或
包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的CDR-H2,和/或
包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的CDR-H3。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,使用所述试剂盒的方法包括:

步骤一、将样品依次加入到抗体包被的微孔中,然后加入HRP标记的酶标液形成抗体-抗原-酶标记的复合物,彻底洗涤后加入TMB显色;

步骤二、TMB在HRP酶催化下呈蓝色,加入终止溶液后呈黄色,颜色深度与TIM-3抗原含量呈正相关;

步骤三、测定溶液OD_{450nm},根据标准曲线定量计算TIM-3蛋白含量。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体选自单克隆抗体,特异性结合人TIM-3的抗体片段,包含特异性结合人TIM-3抗体片段的融合蛋白,鼠源抗体,人源化抗体,鼠源单克隆抗体,优选地,所述抗体为人源化单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体包含抗体重链可变区氨基酸序列包括如SEQ ID NO:7所示或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的VH序列。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体包含抗体轻链可变区氨基酸序列包括如SEQ ID NO:8所示或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的VL序列。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述抗体重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述抗体轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

7. 根据权利要求1-6所述任一试剂盒,其特征在于,所述抗体的生产步骤包括在培养基及合适的培养条件下培养含有表达权利要求1-6所述抗体的核苷酸序列的宿主细胞,从所述培养基中和/或所述宿主细胞中通过常规方法回收并纯化抗体和/或抗原结合片段。

8. 根据权利要求7所述试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括酶标包被板、标品、标品缓冲剂、酶标液、样品稀释液、TMB显色剂、洗涤液、终止液。

9. 根据权利要求1-8所述试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒辅助诊断肺癌胰腺癌、非小细胞肺癌、糖尿病、肾病等疾病中TIM-3蛋白高表达的疾病类型。

一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测领域,特别地涉及一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒。

背景技术

[0002] Tim-3是1型免疫的负调节因子,Tim-3信号传导是诱导抗原特异性耐受所必需的,而Tim-3阻断促进了自发性自身免疫的发生发展,C-type lectin galectin-9是Tim-3配体,这一发现巩固了Tim-3的抑制功能,因为Galectin-9触发Tim-3可诱导Tim-3+Th1细胞中的细胞死亡并改善EAE。

[0003] 另一种影响先天免疫反应的Tim-3配体是高迁移率族蛋白B1 (HMGB1),HMGB1结合将要死亡的细胞释放的DNA,并通过与晚期糖基化终产物 (RAGE) 和Toll样受体 (TLR) 结合促进先天免疫细胞的递送,从而触发先天免疫细胞活化和产生促炎细胞因子,Tim-3与HMGB1的结合可以干扰该过程,从而抑制先天免疫应答的激活。

[0004] TIM-3被发现与多种疾病相关,TIM-3在前列腺癌患者体内与CD4⁺T细胞表达水平与CD8⁺T细胞呈正相关,免疫组化检测分析TIM-3在前列腺增生上皮细胞不染色或染色较弱,而在前列腺癌中呈强染色。另一研究表明,TIM-3的表达与有无淋巴结转移、腺癌细胞分化程度、临床分期及预后相关(P<0.05)。

[0005] 如此,需要开发针对动物模型或患者生物学样品中比现有ELISA灵敏度更高,更快捷的方法以辅助诊断和预后。

发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒。

[0007] 本发明是以如下技术方案实现的:

[0008] 一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒,将TIM-3抗体包被板制成固相抗体,所述TIM-3抗体包括:

[0009] 包含SEQ ID NO:01的氨基酸序列的CDR-L1,和/或

[0010] 包含SEQ ID NO:02的氨基酸序列的CDR-L2,和/或

[0011] 包含SEQ ID NO:03的氨基酸序列的CDR-L3,和/或

[0012] 包含SEQ ID NO:04的氨基酸序列的CDR-H1,和/或

[0013] 包含SEQ ID NO:05的氨基酸序列的CDR-H2,和/或

[0014] 包含SEQ ID NO:06的氨基酸序列的CDR-H3。

[0015] 进一步地,使用所述试剂盒的方法包括:

[0016] 步骤一、将样品依次加入到抗体包被的微孔中,然后加入HRP标记的酶标液形成抗体-抗原-酶标记的复合物,彻底洗涤后加入TMB显色;

[0017] 步骤二、TMB在HRP酶催化下呈蓝色,加入终止溶液后呈黄色,颜色深度与TIM-3抗原含量呈正相关;

[0018] 步骤三、测定溶液OD450nm,根据标准曲线定量计算TIM-3蛋白含量。

[0019] 进一步地,所述抗体选自单克隆抗体,特异性结合人TIM-3的抗体片段,包含特异性结合人TIM-3抗体片段的融合蛋白,鼠源抗体,人源化抗体,鼠源单克隆抗体,优选地,所述抗体为人源化单克隆抗体。

[0020] 进一步地,所述抗体包含抗体重链可变区氨基酸序列包括如SEQ ID NO:7所示或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的VH序列。

[0021] 进一步地,所述抗体包含抗体轻链可变区氨基酸序列包括如SEQ ID NO:8所示或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少99%序列同一性的VL序列。

[0022] 优选地,所述抗体重链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,所述抗体轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0023] 进一步地,所述抗体的生产步骤包括在培养基及合适的培养条件下培养含有表达上述抗体的核苷酸序列的宿主细胞,从所述培养基中和/或所述宿主细胞中通过常规方法回收并纯化抗体和/或抗原结合片段。

[0024] 进一步地,所述试剂盒还包括酶标包被板、标品、标品缓冲剂、酶标液、样品稀释液、TMB显色剂、洗涤液、终止液。

[0025] 优选地,所述检测试剂盒辅助诊断肺癌胰腺癌、非小细胞肺癌、糖尿病、肾病等疾病中TIM-3蛋白高表达的疾病类型。

[0026] 本发明提供的试剂盒中的人源化单克隆抗体能够很好地、特异性与TIM-3抗原结合,具有高效检测TIM-3相关疾病的辅助诊断作用。

具体实施方式

[0027] 定义

[0028] 本发明术语“抗体”以最广泛的含义使用,包括各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体和抗体片段,只要它们表现出特定的抗原结合活性,本发明术语“抗体片段”是指完整抗体以外的分子,其包含结合完整抗体所结合的抗原的完整抗体的一部分,抗体片段包括但不限于Fv、Fab、Fab’、双特异性抗体、线性抗体、单链抗体分子(例如scFv)和/或由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0029] 抗体的类别是指其重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五种主要类型的抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中几种可进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于免疫球蛋白的不同类别的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0030] 本发明术语“IgG”是免疫球蛋白G(Immuno globulin G)的缩写。本发明术语“人源化”是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR对应于非人抗体的那些HVR,并且全部或基本上全部的FR对应于人抗体的那些FR。人源化抗体任选地可以包含源自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。

[0031] 抗体的结合特异性及亲和力均主要由CDR序列决定,根据成熟、公知的现有各项技术可轻易地将非CDR区域的氨基酸序列改变而获得具有相类似的生物活性的变体。本领域公知,抗原结合功能区是指可以与目标分子如抗原发生特异性相互作用的区域,其作用具有高度选择性,识别一种目标分子的序列通常不能识别其他分子序列。

[0032] 本发明术语“结合”是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用。除非另有说明,本发明所述“结合力”是指结合对成员(例如抗体和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(KD)表示,亲和力可以通过本领域已知的常用方法来测量。

[0033] 本发明术语“同一性”、“相似度”为比对序列并引入间隙以实现最大百分比序列同一性后,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。可以以本领域技术范围内的各种方式实现为了确定百分比氨基酸序列同一性的目的比对。

[0034] 研究表明TIM-3是肿瘤形成的关键因子。TIM-3浓度与糖尿病、肾病、肿瘤等疾病存在高度相关性。日前已有很多研究表明循环TIM-3水平与肿瘤负荷相具有强关联性,并提示了TIM-3水平为潜在的预后标志物显然,准确测量TIM-3对理解其在许多生物学过程中的具有潜在的重要作用。测量内源TIM-3水平的能力依赖于灵敏且特异性测定法的可获得性。针对TIM-3的基于比色法、化学发光、及荧光测定的酶联免疫吸附测定法(ELISA)已有报道。

[0035] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明作进一步地详细描述。

[0036] 实施例1:

[0037] 用6-8周龄雌性BALB/c小鼠(购自上海杰思捷实验动物有限公司)作为实验动物进行小鼠免疫试验。初次免疫使用50 μ g人TIM-3蛋白(购自北京同立海源生物科技有限公司)与完全弗氏佐剂混合形成乳剂,按0.5ml/只注射量注射小鼠腹腔,每隔2周用25 μ g人TIM-3蛋白与不完全福氏佐剂充分混合形成乳液进行加强免疫,加强免疫三次,末次免疫1周后,收集小鼠静脉血并分离血清,通过ELISA方法测量抗体效价并选择具有高效价的小鼠细胞制备杂交瘤制备单脾细胞悬液。

[0038] 收集对数生长的骨髓瘤细胞(SP2/0)制备免疫脾细胞悬液,将骨髓瘤细胞与脾细胞按1:5的比例混合在一起,用不完全培养液洗涤后离心8分钟弃上清,将细胞沉淀置于40℃水浴中预热,向细胞沉淀中加入预热至40℃的PEG-4000溶液1ml,出现颗粒后1min内向反应液中加入25ml预热至40℃的不完全培养基以终止反应。静置后加入2ml HAT培养基,轻吹沉淀细胞使其悬浮混匀,之后补充HAT培养基至离心管内的脾细胞浓度达到 1.5×10^7 /ml,将上述细胞悬浮液分装至96孔板培养并观察,待细胞表面积达到孔板面积1/2以上时,吸出上清液样品供抗体检测。

[0039] 实施例2:

[0040] 筛选杂交瘤培养上清液的抗人TIM-3抗体。具体地,用缓冲液在96孔高吸附酶标板上包被人TIM-3(购自北京同立海源生物科技有限公司),包被量100 μ L每孔,之后用缓冲液洗涤3次后;用含1%BSA的缓冲液阻断并于25℃孵育1h,阻断量280 μ L/孔,孵育完成后缓冲液洗涤3次,分别向1-90号孔中加入75 μ L上清液样品(S1-S85)以及阳性血清(对照,CK1-5),25℃孵育1小时,缓冲液洗涤5次;每孔加入100 μ L以比例1/10000稀释于含1%BSA缓冲液里的抗小鼠IgG抗体,所述抗小鼠IgG抗体被辣根过氧化物酶标记,25℃孵育1小时,缓冲液洗涤5次;每孔加入100 μ L比色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),30℃显色10min后终止显色反应,在酶标仪上读取450nm处的吸光度,根据OD450nm的强弱选取能够分泌人TIM-3结合抗体的阳性克隆。

[0041] 实施例3:

[0042] 将筛选得到的同时具有抗原结合活性以及抗原中和活性的克隆,进行抗体DNA序列的测定。首先按照说明书使用RNA prep Pure试剂盒(Tiagen)提取细胞mRNA。之后使用Quant Script RT试剂盒(Tiagen)合成cDNA第一链。将逆转录产生的cDNA第一链用于后续PCR反应,将PCR扩增得到的目的条带克隆到pGEM-T载体中,挑取单克隆由南京金斯瑞生物科技有限公司完成测序。

[0043] 经过PCR扩增得到抗体轻链可变区和抗体重链可变区,排除骨架区序列后即可得到其互补决定区序列;其中轻链的三个互补决定区CDR-L1氨基酸序列如SEQ ID NO:1;CDR-L2氨基酸序列如SEQ ID NO:2;CDR-L3的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;重链的三个互补决定区CDR-H1氨基酸序列如SEQ ID NO:4;CDR-H2氨基酸序列如SEQ ID NO:5;CDR-H3氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示;抗体轻链恒定区氨基酸序列来源自鼠源IgVH4-21*07、抗体重链恒定区序列鼠源IgVH2-09*01,轻链全长序列为将抗体轻链可变区和轻链恒定区连接即得;重链全长序列为将抗体重链可变区和重链恒定区连接即得,将上述可变区序列及恒定区序列分别克隆到真核细胞表达载体TL10-11中(载体骨架pEGFP-N1,购自上海吉满生物)。将抗体轻链及抗体重链表达载体转染293F细胞系(购自上海纪宁生物科技)。转染前一天接种细胞,转染当天将细胞离心收集细胞,将细胞重悬于新鲜的表达培养基中,细胞密度为 1.5×10^7 细胞/mL。按照转染体积加入质粒,终浓度为39.1 μ g/mL,加入线性聚乙烯亚胺至终浓度为45 μ g/mL。将上述混合物放入细胞培养箱37 $^{\circ}$ C培养1小时,之后向培养液中加入新鲜培养基至终体积为20倍转染体积,继续培养5~6天后收集上清。

[0044] 实施例4:

[0045] 检测实施例1获得的抗人TIM-3鼠源单抗(以下简称OM-anti-TIM-3)与其抗原结合的动力学常数。利用仪器光学表面等离子体共振技术来检测偶联包被在生物芯片上的分子与待测分子之间的结合和解离。简要地,将OM-anti-TIM-3溶于的醋酸钠缓冲溶液(pH 5.0)中并偶联到CM芯片上,用1M乙醇胺封闭。结合阶段将不同浓度的OM-anti-TIM-3以27 μ L/min的速度注入2.5min,在解离阶段用PBS缓冲溶液以27 μ L/min的速度注入8min,结合动力学常数和解离动力学常数通过Biacore 3000软件进行分析计算。OM-anti-TIM-3的结合动力学常数为4.77E+04 (1/Ms)、解离动力学常数为1.64E-05 (1/s)、解离平衡常数为0.01 (nM)。

[0046] 实施例5:

[0047] 人源化形式的抗人TIM-3抗体参考Molecule Immunol的制备方法制备,在Germline数据库中选取与OM-anti-TIM-3非CDR区匹配最好的人源化模板,其中重链可变区的模板为人源IgVH4-28*03,轻链可变区的模板为人源IGKV1-16*02,将鼠源抗体CDR区移植到选择的人源化模板上,替换得到人源化抗体重链可变区,氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,替换得到人源化抗体轻链可变区,氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。通过序列比对选择适合位点进行回复突变,获得的重链可变区氨基酸序列(VH)及轻链可变区氨基酸序列(VL)如表1所示。

[0048] 表1. 回复突变获得的氨基酸序列**[0049]**

VH	SEQ ID NO
ORI	SEQ ID NO:7
MeH-037	SEQ ID NO:9

MeH-012	SEQ ID NO:10
VL	SEQ ID NO
ORI	SEQ ID NO:8
MeL-005	SEQ ID NO:11
MeL-058	SEQ ID NO:12

[0050] 将人源化的抗人TIM-3单抗的重链可变区 (SEQ ID NO:7-10) 与人抗体IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO:13) 连接, 分别得到对应的重链全长序列。将人源化的抗人TIM-3单抗的轻链可变区 (SEQ ID NO:11-12) 与人抗体Kappa轻链的恒定区 (SEQ ID NO:14) 连接, 分别得到对应的轻链全长序列, 将上述所有重链全长序列与轻链全长序列组合得到人源化抗体全长序列, 经酶切连接入TL10-11 (载体骨架pEGFP-N1) 载体中。

[0051] 实施例6:

[0052] 检测获得的人源化TIM-3单抗 (ORI:SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8, MeH-037:SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:11, MeH-012:SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:12) 与抗原TIM-3结合的动力学常数, 利用仪器光学表面等离子体共振技术来检测偶联包被在生物芯片上的分子与待测分子之间的结合和解离。方法同实施例4, 人源化TIM-3单抗的结合动力学常数、解离动力学常数和解离平衡常数如表2所示, 由结果可见, 人源化TIM-3单抗与其抗原结合能力强。

[0053] 表2. 人源化TIM-3单抗与其抗原结合的动力学常数

	检测样品	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (Nm)
[0054]	ORI	2.94E+07	1.84E-02	0.02
	MeH-037	2.91E+04	1.66E-02	0.02
	MeH-012	3.29E+03	1.46E-04	0.01

[0055] 实施例7:

[0056] 为了确定ORI、MeH-037和MeH-012单抗的热稳定性, 将ORI、MeH-037和MeH-012样品置于40℃高温条件下, 在第2周、第3周分别取样进行SE-HPLC检测以观察热稳定性, 测试采用色谱法, 流动相为磷酸盐缓冲液 (0.1mol/L), 硫酸钠缓冲液 (0.1mol/L, pH6.7); 流速为0.6mL/min; 色谱柱温度为27℃; 样品池温度4℃; 检测波长280nm; 用缓冲液稀释样品至2mg/mL上样, 体积20μL, 用面积归一化法计算主峰比例处理数据, 人源化TIM-3单抗热稳定性测试结果如表3所示。

[0057] 表3. 人源化TIM-3单抗热稳定性测试结果

	人源化 TIM-3 单抗	SE-HPLC (%)		
		T0	Week 2	Week 3
[0058]	ORI	98.83	97.73	95.56
	MeH-037	97.58	96.67	94.37
	MeH-012	98.33	98.13	98.02

[0059] 热稳定性测试表明ORI、MeH-037和MeH-012单抗均显示出了很好且相当的稳定性。

[0060] 实施例8:

[0061] 上述2条氨基酸序列 (ORI, MeH-012) 均可分别用于制备检测试剂盒, 具体方法为, 将抗体包被板制成固相抗体, 往包被抗体的微孔中依次加入样品, 再加入HRP标记的酶标液, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物TMB显色, TMB在HRP酶的催化

下转化成蓝色,并在终止液作用下转化为黄色,颜色深浅与TIM-3含量成正相关,利用酶标仪测定450nm波长下OD,通过标曲计算TIM-3含量,本试剂盒采用新型人源化TIM-3单抗,与人TIM-3结合能力更强,结合速率更高,可用于快速、准确的TIM-3含量检测,为辅助诊断TIM-3相关疾病提供更灵敏、准确的数据,如表4所示,试剂盒具体地包括下表所述成分,保存条件为4℃。

[0062] 表4. 人TIM-3高灵敏检测试剂盒

[0063]

试剂盒组成	96孔
酶标包被板	1×96规格
TMB显色剂	5mL×2管
洗涤液	10mL×2管
终止液	5mL×2管
标品 (500pg/mL)	1mL×2管
标品缓冲剂	10mL×1管
酶标液	1mL×2管
样品稀释液	10mL×1管

[0064] 以上所揭露的仅为本发明较佳实施例而已,当然不能以此来限定本发明之权利范围,因此依本发明权利要求所作的等同变化,仍属本发明所涵盖的范围。

序列表

<110> 熊浩

<120> 一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒

<160> 14

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> CDR1-L

<400> 1

Gly Asp Asp Asn Arg Met Phe

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> CDR2-L

<400> 2

Asn Asn His Arg Ser Gln Asn Lys His Val

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> CDR3-L

<400> 3

Ala Lys Ser His Gly Pro Met Glu Asp

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> CDR1-H

<400> 4

Ala Val Thr Gln Asp Phe Trp Pro

1 5

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> CDR2-H

<400> 5

Gln Pro Glu His Gly Val Thr Arg Met Gln

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> CDR3-H

<400> 6

Val Glu Trp Val Asp Ala Cys Glu Ala Val

1 5 10

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> ORI VH

<400> 7

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Leu Ile Tyr Gln Ala Arg Glu

1 5 10 15

Thr Ala Val Thr Gln Asp Phe Trp Pro Trp Gln Cys Thr Ala Met Met

20 25 30

Trp	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Trp	Cys	Phe	Met	Gly	Ile	Asn	Cys	Gln
35				40				45							
Pro	Glu	His	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Gln	Tyr	Pro	Glu	Pro	His	Ser	Cys
50				55				60							
Glu	Arg	Ala	Pro	Val	Ser	Ile	Met	Cys	Cys	His	Gln	His	His	Trp	Thr
65				70				75				80			
Asp	Asn	Cys	Phe	Asp	Val	Thr	Trp	Ile	Ile	Arg	Asn	Val	Glu	Trp	Val
				85				90				95			
Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Val	Pro	Lys	Arg	Trp	Asn	Thr	Ala	Lys	Met	Leu
				100				105				110			
Thr	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp	Met							
115				120											

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> ORI VL

<400> 8

Trp	Leu	Met	Gly	Phe	Lys	Gln	Cys	Trp	Asp	Trp	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys
1		5		10		15									
Gly	Asp	Asp	Asn	Arg	Met	Phe	Trp	Glu	Asn	Glu	Gln	His	Tyr	Pro	Met
20				25				30							
Phe	Gln	Leu	Met	Glu	Phe	Glu	Pro	Ala	Asp	Asp	Ala	Trp	Asn	Asn	His
35				40				45							
Arg	Ser	Gln	Asn	Lys	His	Val	Val	Gln	Phe	Ser	Ala	Trp	Pro	Phe	Trp
50				55				60							
Leu	Ala	Gly	Ser	Thr	Thr	Trp	Lys	Asp	Ile	Arg	Met	Ile	Ser	Arg	Lys
65				70				75				80			
Cys	Arg	Cys	Ser	Ala	Lys	Ser	His	Gly	Pro	Met	Glu	Asp	Arg	Pro	Cys
				85				90				95			
Asn	Trp	Phe	Met	Tyr	Ala	Thr	Thr	Gly	Leu	Ser	Phe	Arg	Asp	Gly	Asn
				100				105				110			
Ile	Tyr	Asn	Asn												
115															

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> MeH-037 VH

<400> 9

Ala	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Arg	Glu
1				5					10					15	
Thr	Ala	Val	Thr	Gln	Asp	Phe	Trp	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Ala	Met	Met
			20					25					30		
Trp	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Gly	Cys	Phe	Met	Gly	Ile	Asn	Cys	Gln
		35					40					45			
Pro	Glu	His	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Gln	Tyr	Pro	Glu	Pro	His	Ser	Cys
		50				55					60				
Glu	Arg	Ala	Pro	Val	Ser	Ile	Met	Cys	Cys	His	Gln	His	His	Trp	Thr
65					70					75				80	
Asp	Asn	Cys	Phe	Asp	Val	Thr	Trp	Ile	Ile	Arg	Asn	Val	Glu	Trp	Val
				85					90				95		
Asp	Ala	Cys	Glu	Ala	Val	Pro	Lys	Arg	Trp	Asn	Thr	Ala	His	Met	His
			100					105					110		
Thr	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp	Met							
			115					120							

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> MeH-012 VH

<400> 10

Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Arg	His
1				5					10					15	
Thr	Ala	Val	Thr	Gln	Asp	Phe	Trp	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Ala	Met	Met
			20					25					30		
Trp	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Trp	Cys	Phe	Leu	Ala	Ile	Asn	Cys	Gln
		35					40					45			
Pro	Glu	His	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Gln	Tyr	Asp	Glu	Pro	His	Ser	Cys
		50				55					60				
Glu	Arg	Ala	Pro	Val	Ser	Ile	Met	Cys	Cys	His	Gln	His	His	Trp	Thr
65					70					75				80	

Asp Asn Cys Phe Asp Val Thr His Ile Ile Arg Asn Val Glu Trp Val
85 90 95
Asp Ala Cys Glu Ala Val Pro Lys Arg Trp Asn Thr Ala Lys Met Leu
100 105 110
Thr Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met
115 120

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> MeH-037 VL

<400> 11

Trp Leu Met Gly Phe Lys Gln Cys Asp Asp Trp Ile Thr Leu Tyr Cys
1 5 10 15
Gly Asp Asp Asn Arg Met Phe Trp Glu Asn Glu Gln His Tyr Pro Met
20 25 30
Phe Gln Leu Met Glu Phe Glu Pro Ala Asp Asp Ala Lys Asn Asn His
35 40 45
Arg Ser Gln Asn Lys His Val Val Gln Phe Ser Ala Trp Pro Phe Trp
50 55 60
Leu Ala Gly Ser Thr Thr Trp Lys Asp Ile Arg Met Ile Ser Arg Lys
65 70 75 80
Cys Arg Cys Ser Ala Lys Ser His Gly Pro Met Glu Asp Arg Pro Cys
85 90 95
Asn Trp Phe Met Tyr Ala Thr Thr Gly Leu Ser Phe Arg Asp Gly Asn
100 105 110
Ile Tyr Ala Asn
115

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> UNSURE

<223> MeH-012VL

<400> 12

Asn Leu Met Gly Phe Lys Gln Cys Trp Asp Glu Ile Thr Leu Tyr Cys

1	5	10	15
Gly Asp Asp Asn Arg Met Phe Trp Glu Asn Glu Gln His Tyr Pro Met			
20	25	30	
Phe Gln Leu Met Glu Phe Glu Pro Ala Asp Asp Ala Trp Asn Asn His			
35	40	45	
Arg Ser Gln Asn Lys His Val Val Gln Phe Ser Ala Gln Pro Phe Trp			
50	55	60	
Leu Ala Gly Ser Cys Thr Trp Lys Asp Ile Arg Met Ile Ser Arg Lys			
65	70	75	80
Cys Arg Cys Ser Ala Lys Ser His Gly Pro Met Glu Asp Arg Pro Cys			
85	90	95	
Asn Trp Phe Met Tyr Ala Thr Thr Gly Leu Ser Phe Arg Asp Gly Asn			
100	105	110	
Ile Tyr Phe Asn			
115			
<210> 13			
<211> 329			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 13			
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser			
1	5	10	15
Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe			
20	25	30	
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly			
35	40	45	
Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu			
50	55	60	
Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr			
65	70	75	80
Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys			
85	90	95	
Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
100	105	110	
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
115	120	125	
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
130	135	140	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			

145	150	155	160
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	165	170	175
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	180	185	190
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
	195	200	205
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	210	215	220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
225	230	235	240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
	245	250	255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
	260	265	270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
	275	280	285
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
	290	295	300
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
305	310	315	320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325		

<210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro			
1	5	10	15
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu			
	20	25	30
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn			
	35	40	45
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser			
	50	55	60
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala			
65	70	75	80
Asp Tyr Glu Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly			

				85					90				95
Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
			100					105					110

专利名称(译)	一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒		
公开(公告)号	CN110596369A	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN201910678193.9	申请日	2019-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	熊浩		
申请(专利权)人(译)	熊浩		
当前申请(专利权)人(译)	熊浩		
[标]发明人	熊浩		
发明人	熊浩		
IPC分类号	G01N33/535 G01N21/78 G01N30/02 G01N33/574 C07K16/28		
CPC分类号	C07K16/2803 C07K16/2818 G01N21/78 G01N30/02 G01N33/535 G01N33/57434		
代理人(译)	赖耀华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测人TIM-3表达水平的试剂盒，本发明提供的试剂盒中的人源化单克隆抗体能够高强度、特异性与TIM-3抗原结合，具有高效检测TIM-3相关疾病的辅助诊断作用，Tim-3是1型免疫的负调节因子，Tim-3信号传导是诱导抗原特异性耐受所必需的，而Tim-3阻断促进了自发性自身免疫的发生发展。